

JANAINA APARECIDA DE OLIVEIRA RODRIGUES

Produção de anticorpos monoclonais para uma proteinase ácida extracelular (aspartil proteinase) de *Candida spp.*

Tese apresentada ao curso de Biologia Buco Dental, à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração de Microbiologia e Imunologia.

**PIRACICABA
2004**

JANAINA APARECIDA DE OLIVEIRA RODRIGUES

Produção de anticorpos monoclonais para uma proteinase ácida extracelular (aspartil proteinase) de *Candida spp.*

Tese apresentada ao curso de Biologia e Patologia Buco Dental, à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Dagmar Ruth-Stach Machado

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Prof. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

Prof. Dra. Tais Maria Bauab

**PIRACICABA
2004**

Ficha Catalográfica

R618p

Rodrigues, Janaina Aparecida de Oliveira.

Produção de anticorpos monoclonais para uma proteinase ácida extracelular (aspartil proteinase) de *Candida spp.* / Janaina Aparecida de Oliveira Rodrigues. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. ix, 71f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ensaio imunoenzimático. 2. Híbridomas. 3. Immunoblotting. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Dedico este trabalho aos meus pais **Lucila e João Manoel**, pelo amor e por sempre me incentivarem nos momentos difíceis.

Ao meu irmão **Antônio Carlos**, sempre em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus sobrinhos Carlos Eduardo e Julia, e meus irmãos Juliana, Janice, João Carlos e Jane pelo apoio.

Ao Professor Doutor José Francisco Höfling pela orientação, oportunidade e apoio durante a realização deste trabalho.

À professora Doutora Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro pela participação ativa e direta no desenvolvimento desse trabalho, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e pela amizade.

Ao professor Doutor Ricardo Antunes Azevedo por permitir que a parte de purificação da enzima, fosse desenvolvido em seu laboratório, meu especial agradecimento.

À Professora Doutora Silvana Pereira Barros, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco Dental pelo incentivo.

Aos Professores Doutores, Dagmar Ruth-Stach Machado, Tais Maria Bauab, Ricardo Antunes Azevedo, Renata de Oliveira Mattos Graner por aceitarem participar da banca examinadora, para a avaliação deste trabalho.

Ao professor Doutor Edgard Graner, pelas sugestões neste trabalho.

À técnica, Dirce Gabriel, do Laboratório de Inflamação e Imunologia celular, do Instituto de Biologia/UNICAMP, pela amizade e treinamento no laboratório.

À Professora Doutora Claudete Rodrigues de Paula por ceder parte das cepas empregadas neste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia – FOP-UNICAMP, Wilma C. Ferraz, e Anderson Laerte Teixeira, pelo suporte técnico prestado e pela amizade.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP, pela aprovação do auxílio à pesquisa, pois sem estes órgãos financiadores o presente trabalho não teria se realizado.

Ao Marcio, Sílvia e Luis Octavio, meus agradecimentos, pela amizade e constante estímulo.

Às estagiárias Suelen e Cristiane, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia-FOP/UNICAMP, pela colaboração.

Aos bioteristas da FOP – UNICAMP, Feliciano e Wanderlei, pela manutenção e cuidados com os camundongos utilizados no início desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica de plantas-ESALQ/USP, em especial ao Prof. Dr. Leandro Ferreira de Aguiar, e aos alunos Renato Ferreira e Priscila.

Aos meus colegas do laboratório de Inflamação e Imunologia Celular-Instituto de Biologia/UNICAMP, pela colaboração recebida neste período de convívio.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia – FOP/UNICAMP, meus agradecimentos.

À todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização desse trabalho.

Ao meu amigo de sempre, Alexandre Partel (*In memoriam*).

SUMÁRIO	Página
RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	07
3. PROPOSIÇÃO.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. Cepas.....	21
4.2. Manutenção das cepas.....	23
4.3. Teste de proteinase.....	23
4.3.1. Leitura dos resultados do teste de proteinase.....	24
4.3.2. Interpretação dos resultados do teste de proteinase.....	24
4.4. Purificação da enzima.....	25
4.4.1. Ensaio da atividade enzimática e ensaio de inibição da enzima.....	26
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	26
4.5.1. Coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata (dois minigéis)..	27
4.6. Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (Zimograma).....	28
4.7. Animais de experimentação.....	29
4.8. Antígeno.....	29
4.9. Imunização de camundongos BALB/c.....	29
4.10. Ensaio imunoenzimáticos (ELISA).....	30
4.11. Células de camundongos.....	31
4.11.1 Preparo da camada de macrófagos peritoneais de camundongos (<i>feeder-layer</i>).....	31
4.11.2. Preparo das células esplênicas.....	32
4.11.3. Preparo das células de mieloma.....	32
4.12. Fusão Celular.....	33

4.13. Seleção dos hibridomas.....	34
4.14. Clonagem das culturas de hibridomas.....	35
4.15. Expansão e criopreservação dos hibridomas.....	35
4.16. Determinação dos isótipos de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais.	36
4.17. Produção de ascite.....	37
4.18. Reatividade dos anticorpos monoclonais (AcMo).....	37
4.21.1. <i>Western Blotting</i>	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Detecção enzimática.....	39
5.2. Purificação da enzima.....	40
5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	42
5.4. Eletroforese de gel “nativo” de poliacrilamida (Zimograma).....	42
5.5. Inibidor de proteinase.....	44
5.6. Otimização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA).....	45
5.7. Seleção dos hibridomas.....	46
5.8. Resultado da clonagem.....	47
5.9. Isotipagem dos anticorpos.....	48
5.10. Ascites.....	49
5.11. <i>Western blotting</i>	50
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	71

RESUMO

A candidíase é a mais comum infecção fúngica em humanos e pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Candida*. A proteinase ácida extracelular liberada por essas leveduras vem sendo considerada o seu principal fator de virulência. Os anticorpos monoclonais (AcMo) obtidos pela tecnologia dos hibridomas têm sido amplamente empregados na detecção e identificação de patógenos relacionados com doenças humanas. Com base nesses conhecimentos, a proposta do presente trabalho foi a purificação de uma proteinase ácida extracelular de *Candida* para a produção de AcMo específicos. Para selecionar uma amostra produtora dessa enzima, foram examinadas 27 cepas de leveduras pertencentes à micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia-FOP/UNICAMP, Piracicaba/SP, envolvendo seis espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*) e uma cepa extragenérica de *S. cerevisiae*. Essas cepas foram testadas em meio indutor (ágar/YNB-2%BSA), comparando-se as atividades enzimáticas exibidas pelas mesmas. Vinte e cinco cepas apresentaram um elevado índice de atividade proteolítica (I=3), degradando as proteínas presentes no meio. A cepa 12-A (sorotipo A) de *C. albicans* foi selecionada para a obtenção da enzima por ser a cepa melhor caracterizada sorologicamente entre as estudadas. O processo de purificação da proteinase dessa amostra envolveu as etapas de precipitação com sulfato de amônio (75%), cromatografia em coluna de troca iônica (DEAE) e de exclusão molecular (12/30 HR), resultando na obtenção de uma fração protéica de 41 kDa em SDS-PAGE, com atividade enzimática específica de 204,09 U/mg sobre BSA. A atividade enzimática da fração purificada foi reduzida em cerca de 44,23 % pelo tratamento com pepstatina A, um inibidor de proteinases do tipo pepsina, na proporção (proteinase:inibidor) de 10:1 (m/m). Nos zimogramas em gel de poliacrilamida com a enzima não desnaturada, observou-se degradação de BSA, mas não de colágeno. O conjunto desses resultados sugere que a proteinase purificada é uma aspartil proteinase. A imunização de camundongos BALB/c com a proteinase purificada permitiu a obtenção de anticorpos policlonais capazes de revelar a enzima por ELISA. A fusão das células esplênicas dos camundongos imunizados e o mieloma SP2-Ag14/0 (SP2/0) resultou na obtenção de 4 famílias de hibridomas (1D6,

1B1, 2A6 e 2D2) secretores de AcMo com especificidade para a proteinase ácida de *C. albicans*. Após clonagem por diluição limitante, foram obtidos 13 clones secretores de AcMo do isotipo IgG1, de cadeia leve kappa (κ). Sete culturas de hibridomas também secretam IgG1(κ), porém não foi possível descartar a possibilidade de existência de um segundo clone nas culturas, secretores de anticorpos IgM (κ) ou (λ) lambda e IgG2a (κ). Os treze AcMo obtidos foram capazes de revelar a enzima de *C. albicans* por *western blotting*, reconhecendo a proteína de 41 kDa presente nas preparações do extrato bruto de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (cepa 778) e da fração purificada de *C. albicans*. A definição dos epítopos reconhecidos pelos AcMo obtidos será objeto de investigação futura, de modo a permitir a utilização dos anticorpos em ensaios imunoenzimáticos de detecção/captura de antígenos presentes, em amostras de *Candida spp* isoladas de casos clínicos.

ABSTRACT

Candidosis is the most common fungal infection in humans and is caused by different species of *Candida*. As a virulence factor, the genus *Candida* has an extracellular acidic proteinase, and through hybridoma technology, which has been extensively used to detect and identify pathogens related to human diseases, this proteinase has been used as an antigen to prepare antibodies. Therefore, based upon the literature, the objective of this study was to purify an extracellular enzyme from *Candida* for the production of monoclonal antibodies (MAbs). This study analyzed 27 yeast strains from the laboratory culture collection at the FOP/UNICAMP, Piracicaba, SP. Six different *Candida* species were tested (*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. dubliniensis*) and a *S. cerevisiae* standard strain. These organisms were cultured in an induction agar medium (YNB-0,2%BSA) and the levels of their extracellular acid proteinases were compared. Twenty five strains showed a high index of proteolysis activity (I=3) through the BSA breakdown. The *C. albicans* 12-A strain (sorotype A) was selected to obtain the extracellular enzyme. The acid proteinase was purified by ammonium precipitation (75%), DEAE ion-exchange chromatography followed by molecular sieve chromatography (12/30 HR). The molecular mass of the homogenous enzyme fraction was 41 kDa by SDS-PAGE, and had specific enzymatic activity of 204.09 U/mg for BSA. Its enzymatic activity was reduced approximately by 44,23 % when treated with pepstain A, which is a pepsin-type inhibitor, at 10:1 m/m (proteinase:inhibitor). Zymogram polyacrylamide gels showed BSA degradation, but not with gelatinized collagen when utilizing non-denatured enzyme. These data suggested that this extracellular acid proteinase was aspartyl proteinase. Polyclonal antibodies were produced by immunizing BALB/c mice with the purified acid proteinase, and this enzyme was revealed through ELISA. Through the hybridoma procedure, fused spleen cells from mice immunized with the enzyme, and the SP2-Ag14/0 (SP2/0) myeloma showed four MAbs secretion clone families (1D6, 1B1, 2A6 and 2D2) with specificity to an acid proteinase from *C. albicans*. From the 20 expanded clones, 13 secreted MAb IgG1 isotype kappa-type light chains. The other seven also secreted IgG1 kappa-type chains. However, these cultures might also have had a

second clone, which secreted IgM isotype antibodies with kappa- or lambda- type chains, and IgG2a kappa-type chain. All 13 MAbs had the enzyme from *C. albicans* revealed through Western blot, which showed a 41-kDa protein present in the crude extract from *C. albicans* and *C. dubliniensis* (standard strain 778), and from the purified fraction through the chromatography procedures used. The definition of the epitopes recognized by the MAb obtained in this study will be the subject of future research to allow the utilization of antibodies in immunoenzymatic assays for the detection/capture of antigen present in samples containing *Candida spp* isolated from clinical patients.

1. INTRODUÇÃO

Diferentes espécies de fungos causam infecção de órgãos de forma disseminada ou invasiva, cuja incidência tem aumentado nos últimos anos com o crescente número de pacientes imunocomprometidos, e com a introdução de antimicóticos de amplo espectro, ministrados de forma generalizada no tratamento dessas infecções (Fox, 1993). Em condições normais, o organismo mantém esses agentes microbianos como comensais, entretanto, alterações locais ou sistêmicas, favorecem o desenvolvimento de sua ação patogênica ao homem, principalmente leveduras do gênero *Candida* (Aly *et al.*, 1975).

A candidíase é a mais comum infecção fúngica em humanos, causada por diferentes espécies do gênero *Candida*, portanto, a necessidade de correta identificação e um diagnóstico rápido desses microrganismos podem determinar uma terapia antifúngica imediata e mais eficaz no combate à doença, uma vez que algumas espécies de *Candida* têm se mostrado resistente ao tratamento com alguns antimicóticos (Marcilla *et al.*, 1999).

Os mecanismos pelos quais os microrganismos do gênero *Candida* causam doença em pacientes debilitados são pouco conhecidos. Vários fatores que contribuem à patogenicidade dessas espécies de leveduras foram sugeridos, tais como, a habilidade de formarem hifas, a capacidade de aderência a mucosa, a presença de substâncias semelhantes a endotoxinas e secreção de enzimas hidrolíticas (Odds, 1979; Shimizu, 1988). Enzimas extracelulares são uma importante classe de proteínas sintetizadas por células microbianas, podendo atuar independentemente das mesmas se condições apropriadas forem mantidas.

Algumas espécies de leveduras do gênero *Candida* secretam proteinases ácidas com capacidade para degradar diversas proteínas do hospedeiro (Ruchel *et al.*, 1983; Negi *et al.*, 1984; Kaminishi *et al.*, 1986), podendo ter um efeito patogênico, dependendo das condições do organismo. Com isso, sistemas baseados na expressão e na atividade dessas enzimas têm sido empregados para a identificação de *C. albicans* (Perry *et al.*, 1990; Dealler, 1991), além dos testes morfológicos e fisiológicos convencionais.

A biotecnologia é um ramo de conhecimento científico que faz uso de sistemas celulares para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e social. Entre esses sistemas celulares, os hibridomas, secretores de anticorpos monoclonais (AcMo)

contra agentes microbianos são de grande interesse biotecnológico. Os AcMo têm sido amplamente empregados na detecção e caracterização imunoquímica de diversos componentes celulares, em testes imunodiagnósticos e na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas, entre outros usos (Milstein, 1980).

Desta forma, o objetivo do presente trabalho de pesquisa, foi a purificação de uma proteinase ácida extracelular de uma cepa do gênero *Candida*, secretada para o meio extracelular, visando a produção de AcMo a serem utilizados na detecção específica desta enzima, em ensaios imunoenzimáticos (ELISA), com ênfase no imunodiagnóstico das patologias causadas por esses organismos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Diferentes espécies de leveduras estão presentes na cavidade oral e trato digestivo como microrganismos comensais, entretanto alterações locais ou sistêmicas podem levar esses microrganismos a causar doenças infecciosas ao homem, de forma disseminada ou invasiva (Aly *et al.*, 1975), cuja incidência tem aumentado nos últimos anos com o crescente número de pacientes imunocomprometidos, pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos invasivos (Jarvis & Martone, 1992) e com a introdução de antimicóticos de amplo espectro, ministrados de forma generalizada no tratamento dessas infecções (Fox, 1993).

O gênero *Candida* compreende um extenso grupo de leveduras que podem ser encontradas em diversos ecossistemas, coexistindo de forma saprofítica ou provocando sérias patologias. Há muito tempo a ocorrência dessas leveduras na cavidade oral tem sido descrita e seu papel como agente etiológico de diversas patologias da cavidade oral permanece indiscutível até hoje, contudo, atualmente esse grupo de microrganismos vem recebendo maior atenção por parte dos microbiologistas. Amostras de leveduras do gênero *Candida* têm sido isoladas de indivíduos sadios (Moreira *et al.*, 2001) ou de crianças e adultos, em doenças que se apresentam na cavidade oral, como cárie de esmalte (Hodson & Craig, 1972) cárie de raiz (Lynch & Beighton, 1994) e doença periodontal (Martins *et al.*, 2002), embora o papel das leveduras na etiologia destas doenças permaneça desconhecido.

A candidíase é a mais comum infecção fúngica presente em humanos e cerca de 80% das espécies encontradas em candidíases pertencem às espécies, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e *C. guilliermondii*. Inúmeros fatores predisponentes podem facilitar o desenvolvimento desses microrganismos tais como, a transição da forma de levedura para filamentos prolongados (hifas), variabilidade antigênica, xerostomia, imunomodulação da defesa do hospedeiro, processos terapêuticos, pacientes imunodeficientes, após intervenção cirúrgica invasiva, desnutrição e problemas de absorção de nutrientes, imaturidade do sistema imunológico em crianças, higiene oral deficiente, antibioticoterapia sistêmica prolongada e distúrbios endócrinos - gravidez, tratamento com corticosteróides, hipoparatiroidismo e diabetes mellitus (Lacaz, 1980).

Segundo Horn *et al.* (1985) e Kwon-Chung & Bennett (1992), *C. albicans* é considerada um dos patógenos mais importantes, podendo levar pacientes imunocomprometidos a uma candidíase severa, sendo que a taxa de mortalidade desses pacientes com infecções sistêmicas por *C. albicans*, é maior que a taxa de mortalidade encontrada em pacientes com septicemia bacteriana (Komshian *et al.*, 1989; Wey *et al.*, 1988). Isto ocorre, devido à dificuldade de diagnóstico e tratamento, em ambos os casos. Muitos pacientes podem abrigar mais de uma espécie de *Candida* ao mesmo tempo sendo que em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos essa ocorrência é mais comum (Odds, 1987) e a correta identificação desses microrganismos é um fator determinante no tratamento dos pacientes, uma vez que algumas espécies de *Candida* têm se mostrado resistente ao tratamento com antimicóticos de amplo espectro (Marcilla *et al.*, 1999), portanto a identificação ao nível de espécie torna-se cada vez mais necessária, uma vez que isolados de *C. krusei*, assim como alguns isolados de *Candida dubliniensis* (um patógeno oportunista emergente presente em candidíase oral de pacientes HIV⁺), por exemplo, têm se mostrado resistente ao tratamento com fluconazol (Coleman, 1999), um antimicótico ministrado de forma generalizada para tratamento de candidíase bucal.

A determinação de uma classificação sistemática de isolados de *Candida* foi inicialmente desenvolvida a partir de conhecimentos prévios acerca da fisiologia e bioquímica dessas leveduras. A identificação de *C. albicans* pode ser baseada no teste de produção de tubo germinativo pela levedura à 37 °C na presença de soro normal. Apesar de ser uma técnica simples, apresenta a desvantagem de ser afetada pelas condições do laboratório e sujeita à preparação do técnico que realiza o teste (Salkin *et al.*, 1987; Fenn *et al.*, 1996), contudo testes como induzir a formação de tubo germinativo de *C. albicans*, identificam somente a presença deste fungo, que apesar de representar grande porcentagem dos isolados de cavidade bucal, nem sempre é a espécie predominante. Testes de formação de estruturas celulares típicas, como clamidósporos e filamentos ramificados (pseudohifas ou hifas verdadeiras) ainda são empregados nos laboratórios de pesquisa, desta forma, *C. albicans* pode ser diferenciada das demais espécies, pelo fato desta produzir esporos (clamidósporos) terminais globosos, de parede espessa e geralmente em grande número (Lacaz, 1980), com abundante pseudomicélio decorrente da não separação de blastósporos

gemulantes, e em culturas velhas pode-se encontrar micélio verdadeiro. Esse último autor acrescenta ainda, que *C. stellatoidea* pode ser diferenciada de *C. albicans*, embora que com certa dificuldade, pelo fato da primeira apresentar escassa produção de clamidósporo, que quando presentes, encontram-se dispostos em cadeias de dois a três esporos. Samaranayake & MacFarlane (1990), acrescentam que algumas linhagens de *C. tropicalis*, eventualmente podem apresentar pequena formação de clamidósporos terminais periformes. Outras espécies não produzem tal estrutura.

Sistemas baseados na atividade enzimática têm sido avaliados para identificação de *C. albicans* (Perry *et al.*, 1990; Dealler, 1991), como por exemplo, a técnica de eletroforese de enzimas constitutivas (*multilocus enzyme electrophoresis* - MLEE) em gel de amido que permite a análise de isoenzimas (múltiplas formas de uma enzima ocorrendo numa única espécie) ou aloenzimas, em função da presença de diferentes *loci* codificadores de diferentes versões de uma enzima ou da existência de múltiplos alelos em um *locus*, respectivamente (Prakash *et al.*, 1969). A o se estudar a expressão e atividade enzimática, pode-se avaliar parâmetros como homozigose, heterozigose, variação nas massas moleculares e cargas iônicas das isoenzimas, que conferem características polimórficas entre dois ou mais alelos e mesmo entre genes distantes, que codifiquem diferentes formas moleculares da mesma enzima. Essa metodologia foi apontada por Pujol *et al.* (1997), principalmente para leveduras, como sendo um método de maior reprodutibilidade, quando comparada com métodos baseados na reação da polimerase em cadeia (PCR) e alta capacidade discriminatória entre linhagens de uma mesma espécie de *Candida* (Lehmann *et al.*, 1989a; Lehmann *et al.*, 1989b; Lacher & Lehmann, 1991; Lehmann *et al.*, 1991; Lehmann *et al.*, 1993; Caugant & Sandven, 1993; Doebbeling *et al.*, 1993; Boerlin *et al.*, 1995; Le Guennec *et al.*, 1995; Arnavielhe *et al.*, 1996; Boerlin *et al.*, 1996), contudo, existe relativamente pouca informação disponível acerca do emprego dessa metodologia como determinante de diversidade interespecífica e como agente agrupante de isolados clínicos em seus respectivos *taxa* espécie-específicos.

Considerando-se que a membrana da célula do hospedeiro consiste de lipídios e proteínas e são, portanto susceptíveis a destruições enzimáticas (Bailey *et al.*, 1995; Kaminishi, 1995), estudos baseados na atividade enzimática de uma proteinase ácida

extracelular, denominada proteinase A, descrita pela primeira vez em *C. albicans* por Staib, em 1964, relatam que esta pode degradar proteínas em microambientes ácidos. Algumas espécies de leveduras do gênero *Candida* secretam proteinases ácidas que podem degradar proteínas do hospedeiro, incluindo albumina, colágeno, imunoglobulinas, queratina e hemoglobina (Ruchel, 1981; Ruchel *et al.*, 1983; Negi *et al.*, 1984; Kaminishi *et al.*, 1986), portanto, podem ter um efeito patogênico, dependendo das condições do organismo. Existem relatos de que, os fatores de virulência de *C. albicans* estão relacionados com a produção de hialuronidase, condroitina sulfatase, proteinases e fosfolipases (Ruchel *et al.*, 1983; Shimizu, 1990), observando-se uma atividade proteolítica importante na maioria das espécies patogênicas de *Candida*. Em comum com muitas espécies de fungos, *C. albicans* é uma levedura oportunista de grande interesse médico e acredita-se que o principal fator de virulência, seja as proteinases ácidas extracelulares, secretadas por tais microrganismos (Odds, 1985; Odds, 1987). Evidências deste papel têm sido provadas por experimentos realizados em camundongos, demonstrando que a deficiência na proteinase aspártica tem sido bem correlacionada com um baixo nível de virulência de algumas cepas de *C. albicans* (Macdonald, & Odds, 1983; Kwon-Chung *et al.*, 1985; Kondoh *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1990). A proteinase parece facilitar a aderência, crescimento e invasão desses microrganismos pela pele e mucosas (Klots *et al.*, 1983; Negi *et al.*, 1984; Tsuboi. *et al.*, 1985). Estes microrganismos possuem proteinases homólogas (relacionadas evolutivamente e realizam a mesma função em espécies diferentes), que geralmente têm cadeias polipeptídicas idêntica, ou quase idênticas, em tamanho.

Todas as enzimas proteolíticas conhecidas pertencem a quatro classes principais: as zinco-proteases, serino-proteases, tiol-proteases (cisteína-proteases ou ainda proteases sulfidrílicas) e as proteases carboxilas. As aspartil proteinases (aspartato proteinase) são enzimas proteolíticas da classe de proteases carboxílicas ou proteases ácidas, que degradam algumas proteínas humanas e de microrganismos, seu sítio ativo apresenta-se no resíduo ácido aspártico da enzima (Mihalyi, 1972). Parece haver um número limitado de modos eficazes de catálise da clivagem de ligações peptídicas. Por exemplo, na cristalografia com raio-X da pepsina, mostra que centro ativo dessa proteína contém uma molécula de água flanqueada por dois aspartatos (Stryer, 1996). Pepsina é uma

proteínase ácida (aspartil proteínase), sendo a principal enzima do suco gástrico, e seu sítio ativo se localiza no resíduo ácido aspártico da enzima. A pepsina degrada o pepsinogênio em 41 resíduos mais 13 resíduos N-terminal (Mihalyi, 1972). As aspartil proteínases de eucariotos possuem mais que 22 kD. A protease do vírus HIV-1 parece muito com a pepsina e com outras aspartil proteínases de eucariotes. Estudos cristalográficos com raios-X revelam que a protease do HIV-1 é um dímero simétrico, com um par de aspartato na interface das subunidades. Sendo que, o grau de semelhança é especialmente alto na vizinhança do centro ativo (Stryer, L., 1996).

A maioria das aspartil proteases é inibida por concentrações muito baixas de uma proteína com peso molecular de 685,9 g denominada pepstatina A, um peptídio microbiano isolado de *Streptomyces species* (Actinomyces), uma bactéria anaeróbia, Gram positiva e comensal da cavidade oral. Essa proteína tem propriedade inibidora de atividade enzimática de proteases do vírus HIV1 e outras proteases aspárticas como pepsina e principais enzimas do suco gástrico, renina, catépsina D, quimosina e muitas outras proteases ácidas de microrganismos como a protease A de levedura (Stryer, 1996; Boehringer Mannheim, 1998).

Estudos prévios, sobre a atividade proteolítica dessas exoenzimas realizados por Ruchel *et al.* 1983 e Macdonald (1984) demonstraram que algumas amostras de *C. albicans*, apresentaram-se fortemente proteolíticas, seguidas por *C. tropicalis* em menor extensão, sendo que moderada atividade proteolítica foi detectada em amostras de *C. parapsilosis*. A proteínase ácida extracelular de *C. albicans* tem sido parcialmente caracterizada por vários investigadores (Ruchel, 1981; Negi, 1984; Kaminishi, 1986; Ray *et al.*, 1991; Morrison, 1993), sendo um polipeptídio único com massa molecular entre 40 a 45 kDa com atividade enzimática em pH ácido, geralmente essa enzima é inativada em pH neutro e irreversivelmente desnaturada em condições alcalinas (pH 7,5 a 8,5), mas uma caracterização mais adequada tem sido dificultada, por não se conseguir total purificação da enzima. Dois grupos de pesquisadores, Remold *et al.* (1968) e Shimizu *et al.* (1987), demonstraram que a proteínase aspártica de *C. albicans* possui peso molecular de 43 kDa. A produção da enzima é induzida em um meio mínimo, contendo proteínas como única fonte de nitrogênio (Crandall & Edwards, 1987; Shimizu *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1990), e a

glicose, também contribui para induzir a produção desta enzima (Samaranayake *et al.*, 1984).

Trabalhos realizados por Homma *et al.* (1992) mostraram que existem duas formas intracelulares de proteinase ácida, uma proteína de 43 kDa e outra de 45 kDa detectadas por “imunoblotting”, usando um soro produzido em coelhos pela imunização com a proteinase extracelular (EPR). Baseado nesses resultados, a proteína intracelular de 43 kDa foi considerada ser a mesma forma secretada para o meio extracelular, e a proteína de 45 kDa (CRM-EPR) encontrada apenas no citoplasma pode ser a forma precursora de EPR. As proteínas de 43 kDa e de 45 kDa foram recuperadas em frações da membrana solubilizadas com Triton – X 100, mas a proteína de 43 kDa aparece também na fração citoplasmática. Os resultados sugerem que EPR não está firmemente ancorada na membrana, sendo facilmente liberada da estrutura como é esperado de uma enzima secretada enquanto que a CRM-EPR está fortemente associada às estruturas da membrana.

Estudos com o genoma de *C. albicans* realizados por Monod *et al.* (1994) e Niimi *et al.* (1997) demonstraram que esse microrganismo possui uma família de genes com cerca de 10 genes que codificam diferentes aspartil proteinases (SAP). A expressão gênica de cada SAP parece estar relacionada as condições do ambiente onde a levedura se encontra, portanto as SAP 1 e 3 estão presentes em pacientes com candidíase oral ou em pacientes HIV⁺ com candidíase da orofaringe, causando danos ao epitélio da mucosa oral (Schaller *et al.*, 1999), enquanto que as SAP 1 e 2 estão freqüentemente expressas em candidíase vaginal (De Bernardis *et al.*, 1999). Diferentes SAP possuem variações de pH ótimo para sua atividade (Borg Von Zepelin *et al.*, 1998), sendo que a SAP 2 atua melhor em pH 4,0 e as SAP 4, 5 e 6 são ativas em pH fisiológico, e a SAP 3 é pouco ativa em pH 2,0. Isto sugere que essa variação na atividade proteolítica relacionada com o pH, pode ser um determinante na adaptação das SAP de *C. albicans* em diferentes ambientes do hospedeiro. Além disso, a capacidade dessa espécie de produzir ácidos em ambientes circunvizinhos propicia um pH ótimo para atividade dessas enzimas durante a infecção da mucosa ou da cavidade oral (Hube & Naglik, 2001).

O uso de testes imunológicos com antissoros específicos tem sido descritos empregando-se anticorpos policlonais (Taguchi *et al.*, 1979; Shinoda *et al.*, 1981), e/ou

anticorpos monoclonais (Brawner & Cutler, 1984; Hopwood *et al.*, 1986; Miyakawa *et al.*, 1986; Polonelli & Morace, 1986; Cassone *et al.*, 1988; Chafin *et al.*, 1988; Guinet *et al.*, 1991;), porém estes testes são desprovidos de especificidade ou não foram comercialmente avaliados (Marcilla, 1999).

Um trabalho realizado por (Rodrigues *et al.*, 2004), utilizando ELISA indireto, mostrou que os anticorpos policlonais produzidos contra antígenos protéicos intracelulares de cepas de *C. albicans* isoladas de cavidade bucal, apresentaram um alto grau de reação cruzada com cinco espécies de *Candida*, quando comparadas, confirmando a necessidade da produção de anticorpos monoclonais para a identificação e caracterização dessas leveduras.

A obtenção de anticorpos homogêneos e de especificidade definida foi um desafio para os imunologistas durante décadas, dada a dificuldade da análise química detalhada de anticorpos separados de soros imunes (Krause, 1970). Alguns sucessos limitados foram alcançados com proteínas monoclonais, derivadas de mielomas, cujas especificidades antigênicas puderam ser identificadas posteriormente (Potter, 1977).

Cotton & Milstein (1973), construíram híbridos entre células de mieloma de rato e células de mieloma de camundongo, para entender o controle genético da síntese de anticorpos. Em seus trabalhos, ficou demonstrado que a fusão de duas células secretoras de anticorpos, resultava na produção de híbridos capazes de secretar imunoglobulinas de ambas as espécies, separadamente. A formação de moléculas de imunoglobulinas híbridas também foi verificada. Esse fenômeno demonstrou que, a exclusão alélica para a síntese de imunoglobulinas, ocorria em estágio anterior ao desenvolvimento do linfócito B.

Esses experimentos, apesar de permitirem os estudos pretendidos pelos autores, ainda não forneciam um método geral de construção de uma linhagem celular contínua, que secretasse anticorpos de especificidade conhecida.

Esse problema foi resolvido quando Köhler & Milstein (1975), descreveram uma técnica de hibridização de células de mieloma e de linfócitos B normais, estes últimos obtidos de animais previamente imunizados, para produzir linhagens celulares contínuas, capazes de secretar anticorpos específicos, para o antígeno usado na imunização do doador dos linfócitos B. Este fornece a capacidade de produzir anticorpos específicos, enquanto

que, a célula de mieloma proporciona a habilidade de crescer indefinidamente em cultura e de secretar imunoglobulina continuamente. Experimentos de fusão com célula de mieloma que não produz anticorpo garante que o mesmo secretado pelas células híbridas provenha apenas dos linfócitos B imunes.

Além da utilização de células de mieloma não secretoras de anticorpos, essa técnica foi melhorada quando surgiram linhagens derivadas do mieloma MOPC-21 (obtido pela administração de óleo mineral em camundongos BALB/c), deficientes para enzimas da via alternativa de síntese de ácidos nucléicos [*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (HGPRT) ou *thymidine kinase* (TK)]. Híbridos formados com esse tipo de célula de mieloma podiam ser selecionados na presença do meio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) uma vez que, a aminopterina bloqueia a principal via de síntese de ácidos nucléicos (Abbas *et al.*, 2002). Sabia-se que as células esplênicas sobreviveriam apenas por poucos dias em cultura e que as células de mieloma seriam negativamente selecionadas no meio HAT, sendo esperada a sobrevivência apenas dos híbridos que herdassem dos parentais a expressão da enzima HGPRT ou TK (provenientes das células esplênicas) e a característica de imortalidade em cultura (células de mieloma).

Os primeiros experimentos de fusão de Köhler & Milstein (1975), foram mediados pelo vírus Sendai, e os híbridos foram selecionados pela sua capacidade de crescimento em meio seletivo HAT e reatividade com o antígeno. As linhagens celulares obtidas foram capazes de formar tumores, quando injetadas em camundongos histocompatíveis, e estes tumores são agora conhecidos como hibridomas.

Subseqüentemente, várias outras linhagens de mieloma de camundongo se mostraram apropriadas para uso na técnica de fusão celular, para a obtenção de hibridomas (Zola, 1995). O vírus Sendai utilizado na etapa de fusão celular foi logo substituído pelo polietileno glicol - PEG (Pontecorvo, 1976). Mas, exceto por essas modificações, o procedimento básico de obtenção de hibridomas continua o mesmo até hoje.

Sem dúvida, a descoberta de Köhler & Milstein (1975), teve um grande impacto na ciência. Pela primeira vez, quantidades ilimitadas de anticorpos específicos e homogêneos, reconhecendo apenas um sítio antigênico, poderiam ser selecionados e produzidos, mesmo se o antígeno imunizante fosse fracamente imunogênico ou impuro.

Para lidar com essa situação, era apenas necessário um método apropriado de imunização e de detecção do anticorpo, com as propriedades desejadas. Portanto, a primeira etapa necessária para produzir anticorpos monoclonais, é o esquema de imunização utilizado.

Os animais podem fazer anticorpos contra uma variedade de estruturas moleculares, mas geralmente, não fazem anticorpos para antígenos próprios e, também, não reconhecem moléculas muito pequenas, denominadas haptenos. Essas moléculas devem ser conjugadas a uma molécula carreadora para induzir uma resposta imunológica.

Existem muitos protocolos de imunização que podem ser empregados para essa finalidade. Geralmente, antígenos na forma agregada são mais imunogênicos que proteínas monoméricas. Antígenos solúveis são considerados bons imunógenos, quando associados a um adjuvante (Bennett *et al.*, 1992), por exemplo, o adjuvante completo de Freund (ACF).

Outra importante etapa para a obtenção de anticorpos monoclonais, é a escolha de um método de detecção adequado, para selecionar os hibridomas secretores do anticorpo desejado. É importante que nesses métodos, sejam empregados antígenos puros para evitar que anticorpos contra possíveis impurezas, presentes no material empregado na imunização, sejam revelados no teste de detecção.

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 de superfície dos 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 desse tipo de reagente, foi possível caracterizar fenotipicamente as diferentes subpopulações de linfócitos T e as células acessórias do sistema imune, bem como detectar e quantificar os fatores biologicamente ativos, isto é as citocinas, liberadas por essas populações celulares (Parnes, 1989; Arai *et al.*, 1990; Miceli & Parnes, 1993). O recrutamento celular durante as respostas imunes e inflamatórias, são outros exemplos de estudos que se beneficiaram do uso de anticorpos monoclonais específicos (Kupper, 1990; Bevilacqua, 1993). Técnicas baseadas em anticorpos

monoclonais são amplamente utilizadas em outros ramos da medicina e biologia como, dosagens hormonais e na identificação de patógenos relacionados com doenças humanas, veterinárias ou vegetais. Dentro da indústria alimentícia, os anticorpos monoclonais têm sido importantes na detecção de alimentos adulterados (Zola, 1995).

Uma maneira de se obter uma massa maior de anticorpos monoclonais produzidos, bastante empregada em laboratórios de pesquisa, é através da produção de líquido ascítico em animais injetados, intraperitonealmente, com os hibridomas. Cerca de 10 dias após a injeção do hibridoma, cada animal libera ao redor de 5-10 mL de líquido ascítico, contendo cerca de 10 a 40 mg/mL de anticorpo monoclonal (Harlow & Lane, 1988). Esse procedimento, a despeito de ser ainda bastante difundido, apresenta alguns inconvenientes de ordem operacional, além de causar desconforto e, a seguir, a morte do animal utilizado, sendo pelas últimas razões uma prática condenada em diversos países.

Um dos principais problemas de ordem operacional de se produzir massa de anticorpos monoclonais através da indução de ascite, diz respeito a necessidade de se trabalhar com animais histocompatíveis com as células que deram origem aos hibridomas. Essa necessidade implica em se ter disponível, um número relativamente grande de espécies e/ou raças de animais de laboratório, para serem empregados como recipientes dos diferentes hibridomas que se deseja produzir em laboratório, ou aqueles disponíveis comercialmente.

Hibridomas secretores de anticorpos de interesse podem ser cultivados em frascos apropriados de cultivo, de tamanhos variados, contendo os meios de cultura convencionais para células de mamífero, acrescidos de soro fetal bovino. Nesses meios, os hibridomas secretam os anticorpos monoclonais em quantidades que variam de 20 µg a 1,0 mg/mL de proteína de anticorpo (Harlow & Lane, 1988).

As técnicas de Engenharia Bioquímica desenvolvidas para o cultivo submerso de microrganismos, contribuíram em grande medida, para um rápido avanço no estabelecimento da produção de anticorpos monoclonais em larga escala (Bailey & Ollis, 1977). O crescimento de hibridomas em cultivo submerso para a produção de anticorpos monoclonais foi sugerido pela primeira vez por Kohler & Milstein (1975). Em contraste com a metodologia tradicional, a principal vantagem do cultivo submerso em biorreatores,

é a possibilidade de se fazer a ampliação de escala do processo, tornando virtualmente ilimitado, o suprimento de qualquer tipo de anticorpo monoclonal expresso por um dado hibridoma. Porém, 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. Anticorpos para antígenos de superfície de células em suspensão podem ser rapidamente detectados por técnicas de imunofluorescência, enquanto que, técnicas imunoenzimáticas do tipo ELISA, são excelentes para a detecção de anticorpos produzidos contra 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, mas não em outros.

O uso potencial dos anticorpos monoclonais como reagentes biológicos, foi amplamente difundido e apreciado, levando a um rápido crescimento em diferentes áreas da ciência. Mas, sem dúvida, a sua utilização para detecção de produtos biológicos, através de ensaios imunoenzimáticos, resultou em enorme benefício para o avanço em diversas áreas do conhecimento. Na grande maioria dos casos os anticorpos monoclonais são detectados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

Os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), desenvolvidos na década de 70 por Engvall & Perlmann (1971, 1972) e Van Weemen & Schurs (1971, 1972) citados por Voller *et al.*, (1976), foram bastante beneficiados com o advento dos anticorpos monoclonais.

Um ensaio do tipo ELISA pode ser configurado de diferentes maneiras. A configuração de escolha dependerá da natureza da amostra a ser analisada, da disponibilidade dos reagentes necessários, e principalmente da precisão e sensibilidade requeridas. Em muitas situações, não é necessário ter uma medida precisa da concentração da substância de interesse, por exemplo, na detecção de hibridomas secretores do anticorpo de interesse ou em testes de rotina de amostras de alimentos, para verificar a presença de determinados aditivos. Sob essas circunstâncias, pode ser suficiente apenas, uma resposta do tipo positiva ou negativa. Para outras situações, torna-se necessário o desenvolvimento

de ensaios de alta precisão e sensibilidade (Kemeny, 1991).

Nos ensaios chamados ELISA indiretos um antígeno é ligado diretamente à placa; a amostra contendo o anticorpo a ser dosado é adicionada e o anticorpo que se ligou ao antígeno da placa é subsequentemente detectado pela adição de um segundo anticorpo capaz de reconhecer o anticorpo presente na amostra, marcado com uma enzima. Esse segundo anticorpo é dito anticorpo de detecção. Nem sempre o anticorpo de detecção, é o anticorpo marcado com a enzima. Em alguns casos, um segundo anticorpo anti-imunoglobulina, direcionado contra o anticorpo de detecção, pode ser marcado com a enzima e ser utilizado na revelação das reações antígeno-anticorpo.

Pesquisadores como Na *et al.* (1999a), desenvolveram um diagnóstico sorológico de candidíase invasiva, baseado na detecção de um antígeno, aspartil proteinase secretada circulante (SAP) de *C. albicans*, comparando três diferentes técnicas de (ELISAs), sendo que o primeiro ELISA foi padronizado para a detecção de anticorpos anti-SAP, e os outros dois, ELISA de captura de antígeno e ELISA de inibição para detecção de antígeno SAP circulante com anticorpo monoclonal (CAP1). Os autores utilizaram 33 amostras de soro de pacientes com candidíase invasiva causada por *C. albicans*, 12 pacientes com aspergilose e 13 indivíduos saudáveis. Amostras do soro de 31 dos 33 pacientes tinham antígeno SAP detectável nas concentrações de 6,3 a 19 ng/mL, mostrando que o ELISA de inibição com anticorpo monoclonal CAP1 foi efetivo na detecção de antígeno SAP circulante, e que este ensaio pode ser útil para diagnóstico e monitoramento do tratamento de candidíase invasiva.

Da mesma forma, os resultados dos estudos de Marcilla *et al.* (1999), confirmam que um anticorpo monoclonal, 3H8, que reconhece epítomos de manoproteína da parede celular de *C. albicans*, é um potente instrumento de identificação desse microrganismo por diferentes técnicas, já que se observou que outros anticorpos produzidos - que reagem exclusivamente contra a porção carboidrato da manoproteínas - também reagem com outras espécies de *Candida* (Calderone & Braun, 1991, Iranzo *et al.*, 1994). O uso do 3H8, no Bichro-latex *albicans* kit, que é um sistema rápido de identificação de colônias, mostrou ser este, altamente específico para *C. albicans*, atingindo de 99,87 a 100% de especificidade, dependendo do estudo (Dromer *et al.*, 1996; Freydière *et al.*, 1997;

Quindós *et al.*, 1997; Robert *et al.*, 1994). Ainda Marcilla *et al.* (1999), mostraram que mesmo, nos casos em que se suspeitava candidíase sistêmica, mas culturas de sangue apresentavam resultados negativos (Jones, 1990), o anticorpo monoclonal 3H8 pode ser útil no diagnóstico de candidíase. Assim, a identificação histológica é um método de escolha em alguns casos, e a utilidade dos anticorpos monoclonais específicos, tal como o 3H8, pode ser útil na detecção de *C. albicans* no tecido por imunofluorescência ou imunohistoquímica.

De modo geral, os estudos presentes na literatura, que envolvem o emprego de anticorpos monoclonais, no diagnóstico e monitoramento de candidíases e outras doenças causadas por microrganismos, indicam, serem estes, instrumentos específicos de identificação de antígenos solúveis e celulares de muitos organismos, demonstrando o seu alto potencial, como reagentes biológicos no estudo das relações parasita-hospedeiro. Pesquisas adicionais, que venham a ampliar, ainda mais, o entendimento desses mecanismos imunológicos, serão, sem dúvida, importantes para o avanço científico nessa área de conhecimento, razão de nosso trabalho de tese.

3. PROPOSIÇÃO:

Para alcançar os objetivos explicitados foram propostas as seguintes etapas de trabalho:

1. Avaliar as cepas de *Candida spp*, que se encontram preservadas na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP, visando a escolha de cepas boas e más produtoras da proteinase ácida extracelular.
2. Produção e purificação de proteinase ácida extracelular das cepas de *Candida spp*.
3. Caracterizar a atividade biológica da(s) enzima(s) purificada(s).
4. Obter anticorpos policlonais e monoclonais específicos para a proteinase purificada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepas

No presente trabalho, foram empregadas 27 cepas de leveduras: 8 linhagens de *Candida spp* de características conhecidas (linhagens tipo), 1 linhagem tipo de *Saccharomyces cerevisiae*, 18 isolados de cavidade oral previamente identificadas, e se encontram disponíveis na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP (Tabela 1). Nove das 27 cepas de leveduras da micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP/SP), foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Claudete Rodrigues de Paula, sendo 2 cepas: ICB-158 (*C. albicans*) e ICB-159 (*C. dubliniensis*) não produtoras de proteinase ácida. Doze linhagens isoladas da cavidade oral proveniente de pacientes clinicamente saudáveis foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC/UNESP), e 6 linhagens tipo de leveduras obtidas do banco de células (*Centraalbureau voor Schimmelcultures* - CBS), foram cedidas pela Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas.

Tabela 1
Relação das espécies empregadas nos experimentos.

Número	Origem	Espécie	Código da cepa
1	Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”	<i>C. albicans</i>	CBS-562 ^a
2	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. albicans</i>	12-A (sorotipo A) ^g
3	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. albicans</i>	156-B (sorotipo B)
4	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. albicans</i>	97-a
5	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. albicans</i>	F-72
6	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. albicans</i>	E-37
7	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. albicans</i>	FCF-405
8	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. albicans</i>	FCF-152
9	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. albicans</i>	ICB-158
10	Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”	<i>C. tropicalis</i>	CBS-94 ^b
11	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. tropicalis</i>	1-b
12	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. tropicalis</i>	FCF-430
13	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. tropicalis</i>	Ct-4
14	Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”	<i>C. guilliermondii</i>	CBS-566 ^c
15	Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”	<i>C. parapsilosis</i>	CBS-604 ^d
16	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. parapsilosis</i>	17-b
17	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. parapsilosis</i>	21-c
18	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. parapsilosis</i>	7-a
19	Laboratório de Microbiologia da FOSJC/UNESP	<i>C. parapsilosis</i>	4-c
20	Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”	<i>C. krusei</i>	CBS-573 ^e
21	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. dubliniensis</i>	777 ^h
22	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. dubliniensis</i>	778 ⁱ
23	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. dubliniensis</i>	ICB-08
24	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. dubliniensis</i>	ICB-07
25	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. dubliniensis</i>	ICB-159
26	Laboratório de Micologia-ICB/USP/SP	<i>C. dubliniensis</i>	ICB-33
27	Fundação Tropical de pesquisas e Tecnologia “André Tosello”	<i>S. cerevisiae</i>	CBS-1171 ^f

a, b, c, d, e - Linhagens de *Candida spp.* Empregadas como tipo padrão obtidas de bancos de células (*Centraalbureau voor Schimmelcultures* - CBS, Baarn, Netherlads) e **f** – Linhagem tipo extragenérica, *Sacharomyces cerevisiae*, proveniente do banco CBS.

g - Linhagem tipo de *C. albicans* (Sorotipo A) procedente do “The London School of Hygiene & Tropical Medicine, Inglaterra”

h, i - Linhagens tipo padrão de *C. dubliniensis* obtidas de bancos de células (*American Type Culture Collection* – ATCC).

4.2. Manutenção das cepas

As linhagens foram mantidas durante toda a execução dos experimentos em duas coleções:

- Na primeira, as amostras foram semeadas em meio completo para levedura (YPD) ágar, como estabelecido por Neder (1992), contendo 20 g de dextrose (Merck), 20 g de peptona (Merck), 10 g de extrato de levedura (Merck) e 20 g de ágar (Merck) por litro, em tubos de rosca (13x100 mm) e levadas à estufa a 30 °C durante 24-72 horas, para o desenvolvimento celular. Após o crescimento, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante 30 dias, quando a coleção foi então renovada.

- Na outra coleção as amostras foram mantidas em tubos de rosca (13x100 mm) contendo meio YPD ágar, e recobertas com óleo mineral estéril, à temperatura ambiente. Esta coleção foi renovada a cada seis meses.

4.3. Teste de proteinase

Cepas padrão e isolados da cavidade oral do gênero *Candida* foram previamente testadas em relação à capacidade de produção de proteinase, com base na detecção do halo de degradação no meio de cultura.

As cepas foram inoculadas em meio BSA-YNB ágar, contendo 0,2% de albumina – BSA (Sigma), 1,45g de *Yeast Nitrogen Base*, sem sulfato de amônio, e sem aminoácidos, como fontes de nitrogênio (Difco), 20g de glucose (Merck) e 20g de ágar (Merck), por litro. A solução de ágar foi autoclavada, ajustado o pH do meio líquido, BSA-YNB para pH 4,0 e filtrado com membrana de 0,22 µm estéril. A solução autoclavada foi resfriada a uma temperatura de 45 °C, misturada ao meio líquido estéril e distribuída em placas de petri, com volume de 20 mL. Após a solidificação da mistura, foi semeada 1 amostra de levedura por placa, com carimbo circular. Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas à 37 °C num período de 3 dias.

A presença da enzima foi detectada pela formação de um halo opaco de degradação da albumina, presente no meio de cultura, ao redor da colônia da levedura.

4.3.1. Leitura dos resultados do teste de proteinase

A leitura dos resultados do teste de proteinase em meio sólido, foi realizada após o período de 3 dias de incubação, tendo como resultado positivo a formação de um halo em torno da colônia que foi medido em mm, e negativo, pela ausência do mesmo.

A atividade enzimática (Pz), foi medida de acordo com a técnica de Price *et al.* (1982), onde foi observada uma zona opaca no meio ao redor de cada colônia, utilizando-se a razão entre o diâmetro da colônia (dc), e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp). Os resultados de Pz foram considerados da seguinte maneira (Tabela 2):

Tabela 2
Índice de atividade enzimática

Índice	Intervalo de Pz	Atividade Enzimática
1	$Pz = 1,0$	Ausência de atividade enzimática
2	$1,0 > Pz \geq 0,64$	Atividade enzimática positiva
3	$Pz < 0,64$	Atividade enzimática fortemente positiva

4.3.2. Interpretação dos resultados do teste de proteinase

A atividade enzimática dada pela relação, medidas da zona de degradação do meio e da colônia da amostra analisada, é indicada pelo índice 1, 2 ou 3 – atividade enzimática da proteinase negativa, positiva ou fortemente positiva, respectivamente. Se houvesse diferença na atividade enzimática, a cepa com atividade fortemente positiva detectada no halo, seria selecionada para a purificação de antígeno e produção de anticorpos monoclonais.

4.4. Purificação da enzima

A amostra selecionada para a purificação enzimática foi reativada em meio YPD ágar, por 18 h a 30 °C, e a seguir as células foram cultivadas em meio líquido YPD, para obter uma grande massa celular até a fase log, com o crescimento celular acompanhado pela leitura da densidade óptica (D.O.), até que atingisse D.O. = 1,0 a 660 nm, onde então as células de levedura seriam transferidas para outro meio líquido BSA-YNB, e incubadas por aproximadamente 48 h (Homma *et al.*, 1992), quando a densidade óptica (D.O.) atingisse D.O. = 2,0. Neste estágio, as células foram removidas por centrifugação à 10.000 rpm em centrífuga refrigerada (Beckman), por 10 minutos, a 4 °C. A cultura foi filtrada, utilizando-se membrana de 0,22 µm de 18 mm (Millipore-Millex), para remoção de debris celulares de levedura restante no meio. Em seguida, o sobrenadante filtrado foi precipitado com sulfato de amônio (Synth) a 75%, e um precipitado protéico foi coletado por nova centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos.

Com a finalidade de eliminar o sulfato de amônia presente no precipitado, este foi desalinizado em coluna *Sephadex* G-25 com 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6,5). O material desalinizado foi aplicado a uma coluna de sefarose DEAE (Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com o mesmo tampão, em um fluxo de 1,0 mL/min. A fim de definir em que faixa de molaridade a enzima eluia as proteínas adsorvidas, foram submetidas à resina em “stepwise,” com soluções de 100, 200, 300 e 500 mM de NaCl, sendo o eluato coletado num coletor de frações (RediFrac-Pharmacia). As coletas foram padronizadas em 3,0 mL/frasco, e a saída das proteínas foi monitorada por um equipamento com luz ultravioleta a 280 nm (Econo UV Monitor-BioRad), acoplado com um densitômetro (Model 1325 Econo Recorder-BioRad), que registrava os picos de saída das frações protéicas. Confirmou-se também a saída de proteínas, pela leitura de uma alíquota dos tubos, em espectrofotômetro a 280 nm (Na *et al.*, 1997). A atividade enzimática foi testada com as frações coletadas, conforme citado no ítem 4.4.1.

Com os resultados obtidos fez-se um gradiente de NaCl na faixa de molaridade que apresentou atividade enzimática no sistema “stepwise”. A coleta foi realizada como

citado anteriormente, e as frações contendo o máximo de atividade enzimática foram misturadas, dialisadas contra água deionizada e liofilizadas.

Cinco miligramas da enzima parcialmente purificados foram ressuspendidos em 240 μ L de tampão Tris-NaCl (25 mM de Tris, contendo 10 mM de NaCl, acertado para o pH 7,0 com HCl concentrado) e aplicados em uma coluna de filtração em gel pré-empacotada com malha de agarose de volume $V_c=23,562$ mL (Superose 12/30 HR – Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com duas vezes o volume da coluna (47,124 mL), com tampão Tris-NaCl (pH 7,0), num fluxo de 0,5 mL/min e ligada ao HPLC (*High Performace Liquid Chromatography-ÄKTA-purifier*), associado ao software UNICORN 3.00, e editor de texto (Software Windows NT 4.00), monitorado por 3 comprimentos de onda, a 280, 220 nm e 210 nm.

As frações foram coletadas a 0,5 ml por tubo, passando-se o volume de uma vez e meia o volume da coluna, garantindo-se assim, a coleta de todo o material aplicado. Para uma alta resolução da amostra, não se aplicou mais de 1,0% (240 μ L) do volume da coluna, contendo no máximo 5 mg de proteína. Finalmente, as frações que apresentaram atividade enzimática, foram utilizadas como antígeno.

A cada etapa, alíquotas das amostras foram reservadas para a dosagem da concentração protéica, determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1975). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 595nm, empregando-se como branco, o reagente do kit da Bio-Rad, diluente das amostras.

Na tentativa de se fazer um outro acompanhamento para se observar quais frações poderiam apresentar a enzima, foi feito um teste em meio BSA-YNB/ágar em placas de petri, contendo orifícios de 3 mm, pipetando-se 40 μ L das frações obtidas, permanecendo sob incubação por 3 dias a 30 °C.

4.4.1. Ensaio da atividade enzimática e ensaio de inibição da enzima

A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro, pela digestão de BSA como substrato, de acordo com Crandall & Edwards (1987). Para cada 30 μ L de

solução enzimática, foi acrescentado 270 μL de BSA a 1 % (w/v), em 50 mM de tampão KCl (acertando o pH 2,5 com HCl concentrado) e incubada em banho-maria a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 2h. A reação foi bloqueada pela adição de 700 μL de ácido tricloroacético (TCA), a 10% (w/v) e o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos, a 4 $^{\circ}\text{C}$. A quantidade de proteólise do sobrenadante foi determinada, medindo-se a absorbância a 280 nm. Alguns ensaios de atividade enzimática foram realizados na presença de pepstatina A (1,46 μM), um inibidor de proteinase, como indicado por Na *et al.* (1997).

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A homogeneidade da fração purificada foi verificada através de eletroforese (SDS-PAGE) em gel com 10% de poliacrilamida (Laemmli, 1970), usando-se como referência, um padrão de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight Standard* - LMW, Pharmacia Biotech: Fosforilase b-97 kDa, Albumina de soro bovino-66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrase carbônica-30 kDa, Inibidor de tripsina-20,1 kDa e Lisozima-14,4 kDa). O restante dos materiais foram mantidos a -70 $^{\circ}\text{C}$, até o momento do uso. Os volumes das amostras, foram homogeneizados com tampão de amostra redutor (Sigma) na proporção 1:1, aquecidos por 5 minutos em banho-maria e centrifugados rapidamente antes da aplicação aos géis. A corrida eletroforética para dois géis de 0,75 mm durou aproximadamente 2 horas a 30mA (0,030 A) constante, até que o corante azul começasse a sair do gel. Os géis foram corados com nitrato de prata.

4.5.1. Coloração de gel de poliacrilamida por nitrato de prata (dois minigéis)

A coloração dos géis foi feita segundo a metodologia de Blum *et al.* (1987) modificada. Após a corrida eletroforética, os géis foram transferidos para cubas plásticas com tampa contendo 100 mL de solução fixadora (40% de etanol 96 $^{\circ}$ GL P.A. - Chemco, 10% de ácido acético - Synth). Deixou-se a temperatura ambiente por 15h sob agitação e a seguir lavou-se rapidamente os géis com H₂O deionizada.

Os géis foram transferidos para 125 mL de solução encubadora (8,5 g de acetato de sódio - Synth, 37,5 mL de etanol, 1,5 g de Tiosulfato de sódio - Synth, 1,3 mL de glutaraldeído a 25 % (adicionado somente na hora do uso). Após 20 min a solução incubadora foi retirada e fez-se três lavagens sucessivas de 15 min com água deionizada.

A seguir, os géis foram adicionados a 125 mL de uma solução de prata (0,125g de Nitrato de Prata - Merck, 25µL de Formaldeído - Merck (adicionado somente na hora do uso)) por 20min e a seguir, lavou-se novamente os géis.

Os géis foram transferidos para 125 mL de solução reveladora (3,125g de Carbonato de sódio - Synth, 12,5µL de Formaldeído (adicionado somente na hora do uso)) e encubou-se até o aparecimento das bandas. A solução reveladora foi substituída por 125 mL de solução bloqueadora (1,825g de sódio EDTA - Reagen) por 10 minutos. Lavou-se os géis em água corrente por 2h e estes foram conservados em glicerol 10%.

Durante cada passo do processo de coloração em nitrato de prata os géis foram mantidos sob agitação para melhor revelação.

4.6. Atividade enzimática em gel de poliacrilamida (Zimograma)

Foram feitos em géis de 10% de poliacrilamida (SDS-PAGE), copolimerizados com 1,6 mg/mL de gelatina ou albumina. Antes do término da corrida eletroforética, preparou-se uma solução aquosa de Triton X-100 a 2% (Sigma), o tampão de ativação (0,36 g 10 mM Tris-HCl, 0,17 g, 5 mM CaCl₂ em 300 mL H₂O deionizada, pH 8,0), e o tampão de ativação (1,11 g 50 mM KCl-HCl em 300 mL H₂O deionizada, pH 2,5). Para a solução de Triton X-100, 400 mL de água deionizada, foi aquecida por 1 minuto no forno microondas, adicionando-se 8 mL de Triton X-100 (substância viscosa) e homogeneizando obtendo-se uma solução turva. Em seguida, os géis, foram submersos em 200 mL de Triton X-100, permanecendo sob agitação por 20 min, para retirada do dodecil sulfato de sódio (SDS). Desprezou-se as soluções e repetiu-se o processo. Finalmente, desprezou-se a solução novamente, adicionando-se o tampão de ativação nos respectivos géis, mantendo-os em estufa a 37°C por 16 h.

Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Blue (metanol 50%, ácido acético 10% e coomassie blue 0,1%) por 50 min, e descorados em solução aquosa de metanol 50%, até quando as bandas em branco fossem observadas.

4.7. Animais de experimentação

Camundongos singênicos *specific pathogen free* (SPF), da linhagem BALB/c e camundongos *nudes* das linhagens BALB/c, machos ou fêmeas, de 8 a 10 semanas de idade, foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia da UNICAMP, monitorado em ambiente com temperatura e fotoperíodo controlados, e com água e ração em livre demanda, durante todo o período de experimentação.

4.8. Antígeno

Foi utilizado antígeno obtido de proteínas extracelulares da levedura crescida em meio líquido, e esse material foi submetido à uma seqüência de purificação, como precipitação com sulfato de amônio e utilização de colunas de troca iônica e de gel filtração, a fim de obter uma proteinase extracelular pura, a ser usada como antígeno na imunização de camundongos, nos ensaios imunoenzimáticos e *western blotting*.

4.9. Imunização de camundongos BALB/c

Camundongos BALB/c foram imunizados intraperitonealmente, com uma dose de 100 µg de proteinase ácida purificada emulsionada v/v em 50% de adjuvante completo de Freund (ACF, Sigma) diluído em solução salina 0,15M. Após 20 e 30 dias da primeira injeção, foram administradas doses de reforço com 50 µg de antígeno diluído em solução salina. No 33^o dia após o início da imunização os camundongos foram sangrados pelo plexo

orbital, para a separação do soro imune que foi titulado em testes de ELISA. Soros pré-imunes, obtidos de sangue coletado dos animais antes da inoculação da primeira dose do antígeno, foram utilizados como controles negativos nos testes de “dot blot” e ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

4.10. Ensaios imunoenzimáticos – ELISA

Os testes de ELISA foram previamente padronizados, pela diluição do antígeno e titulação dos soros obtidos, resultando-se nas concentrações e diluições ótimas, para a experimentação futura.

Os ensaios para a detecção dos soros foram realizados em placas de poliestireno (Greiner), de 96 poços de fundo chato. Cada placa foi sensibilizada com 50µl/poço, de uma solução contendo o antígeno, na concentração de 2µg/mL, em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M, pH 9,2 e, a placa foi incubada por 1 hora, a 37 °C, em câmara úmida, e a seguir, mantida a 4°C, *overnight*. O excesso de antígeno não adsorvido foi removido, e a placa lavada três vezes com PBS-Tween, pH 7,2. Após a secagem da placa, por inversão sobre papel absorvente, adicionou-se (a cada poço) 200µl de uma solução de PBS-Molico 5% e incubou-se por uma hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagem, adicionou-se diluições seriadas dos soros em PBS-Molico 2%. Seguiu-se a incubação da placa por 1 hora, a 37°C, em câmara úmida. Após mais um ciclo de lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário, o conjugado anti-imunoglobulina G (α -IgG) de camundongo marcado com peroxidase, diluído a 1:6.000 em PBS-Molico 2%. Após nova incubação de 1 hora a 37°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas e secas por inversão. O substrato utilizado para reação foi 1 pastilha de orto-fenilenodiamina (OPD) diluído em tampão de OPD (citrato-fosfato de sódio 0,05M, pH 5,0) e H₂O₂ a 3% (este último é colocado imediatamente na hora da revelação), no escuro por 30 minutos, e a revelação foi bloqueada com 25µL/poço de uma de solução de 4N H₂SO₄ (Merck) procedendo-se a leitura em leitor de microplaca (Multiskan MS, Labsystems), a 492 nm. Como branco, foi utilizado um poço

adicionado com antígeno, PBS-Molico a 5%, o anticorpo secundário, o substrato e o bloqueador da reação.

4.11. Células de camundongos

Células de mieloma murino da linhagem SP2-Ag 14/0 (Shulman *et al.*, 1978), foram utilizadas para o experimento de fusão com células B provenientes do baço de camundongos imunizados, e macrófagos peritoneais de camundongos normais foram utilizados para o *feeder layer* das placas de cultura de 24 e 96 poços.

4.11.1. Preparo da camada de macrófagos peritoneais de camundongos (*feeder-layer*)

Células normais da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, foram assepticamente obtidas para o preparo do *feeder-layer* de macrófagos. Para a coleta das células peritoneais, os camundongos foram sacrificados com éter etílico e mergulhados em uma solução de álcool a 70% (v:v). Em fluxo laminar, a membrana peritoneal foi exposta e cada cavidade foi inoculada com seringa, 5 mL de meio HAT (meio RPMI-1640 (Sigma) completo [10% de soro fetal bovino (Nutricell), 2g/L de bicarbonato de Sódio (Sigma), 2g/L de HEPES ((*N*-[2-Hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]) Sigma) e 2μL/L de 2 β-mercaptoetanol, (Merck)], contendo 0,136mg/L de hipoxantina (Sigma), 0,03mg/L de aminopterina (Sigma) e 0,038mg/L de timidina (Sigma)). Após massagem suave do abdômen dos animais, o líquido carregando as células peritoneais foi aspirado e a suspensão celular obtida foi transferida para tubos estéreis (Corning), que foram mantidos em banho de gelo. Esse material foi lavado por centrifugação a 1.500 rpm por 10 min, e ressuspenso em 1 mL de meio.

Uma pequena alíquota da suspensão foi diluída 20 vezes em solução de Turck (2% de ácido acético em água e gotas de azul de metileno a 1%), para a determinação da concentração celular, através de contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, a

concentração celular foi ajustada e as células foram distribuídas em 4 placas de plástico estéril de 24 poços, fundo chato (Corning), na densidade de 1×10^5 células/0,5mL/poço. Em seguida, as placas foram incubadas durante 48 horas a 37°C, em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Para os procedimentos de clonagem dos hibridomas, placas de 96 poços da mesma procedência, contendo *feeder-layer*, foram preparadas de maneira semelhante, exceto que, cada poço recebeu 50µL de uma suspensão de células do lavado peritoneal contendo 5×10^4 células/mL.

4.11.2. Preparo das células esplênicas

Os dois animais previamente imunizados com a enzima, foram sacrificados com éter etílico e mergulhados em seguida, em uma solução de etanol a 70% (v:v). Em fluxo laminar, as cavidades abdominais dos animais foram expostas assepticamente para a remoção dos baços, os quais foram colocados em um recipiente contendo aproximadamente 15 mL de meio RPMI-1640, sem soro.

Os órgãos foram triturados e, com a ajuda de uma peneira estéril, as suspensões celulares obtidas, foram transferidas para um tubo de centrifuga estéril (Corning). Lavou-se as células por 2 vezes com salina Fazekas (PBS, pH 7,2, contendo 0,4g/L de cloreto de Potássio, 2g/L de glicose e 0,01g/L de vermelho de fenol), centrifugando-se a 200 x g e ressuspendeu-se as células em salina Fasekas. Uma pequena quantidade da suspensão celular foi retirada para contagem em câmara de Neubauer, e para a determinação da viabilidade celular, pelo método de exclusão do corante azul de Tripán (0,04%), na proporção 1:1 (amostra:corante).

4.11.3. Preparo das células de mieloma

As células de mieloma SP2-Ag 14/0 foram adequadamente descongeladas e, posteriormente, cultivadas em 250 mL de meio RPMI-1640 completo, acrescido de 0,125mg/L de 8-azaguanina (Sigma), para impedir a sobrevivência de possíveis revertentes para a mutação da enzima HGPRT. As culturas foram incubadas em atmosfera de 5% de

CO₂ e 95% de umidade relativa a 37°C. A seguir, as células foram repicadas e subcultivadas na presença de meio completo. Aproximadamente 18 horas após o repique, as células foram coletadas dos frascos de cultivo e transferidas para tubos estéreis para serem sedimentadas por centrifugação a 1.500 rpm durante 10 minutos, a 20°C. O sedimento obtido foi ressuscitado em salina Fazekas e uma alíquota foi retirada para a determinação da concentração e viabilidade celular.

4.12. Fusão Celular

No experimento de fusão celular, foi empregado o protocolo descrito por Fazekas De St Groth & Scheideger (1980).

Nesta etapa, 10 mL da suspensão de células esplênicas de camundongos BALB/c, previamente imunizados com o antígeno, contendo 1×10^8 células, e 10 mL de suspensão de células de mieloma SP2 Ag14/0 (Shulman *et al.*, 1978), contendo 2 a 3×10^7 células, ambas as suspensões com viabilidade acima de 90%, foram reunidas em um tubo cônico de material plástico e estéril (Corning). Em seguida, o volume da mistura de suspensões celulares foi completado para 50 mL com salina e este material foi centrifugado a 1.500 rpm, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular obtido foi ressuscitado em 1,0 mL de uma solução de polietileno glicol (PEG-1500, Merck), o qual foi adicionado gota a gota, sob agitação constante durante 1 minuto, à temperatura ambiente. O tubo contendo a suspensão foi transferido para um banho-maria a 37°C e mantido durante 90 segundos sob agitação. Em fluxo laminar, foram adicionados, vagarosamente, 20 mL de salina de Fazekas: 1 mL em 30 segundos, 3 mL em 30 segundos, e o restante em 60 segundos. O volume da suspensão foi completado para 50 mL com a salina de Fazekas e a mistura foi mantida em repouso por 5 minutos. Em seguida, esta suspensão foi centrifugada a 1.500 rpm, por 10 minutos, e o sedimento celular obtido foi ressuscitado em 50 mL de meio RPMI-1640 completo, para uma segunda etapa de centrifugação, semelhante à anterior. Finalmente, as células foram ressuscitadas em 100 mL de meio HAT e distribuídas em 4 placas de 24 poços (1 mL por poço) já contendo *feder-*

layer de macrófagos. As placas foram mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa.

4.13. Seleção dos hibridomas

Aproximadamente 10 dias após o experimento de fusão celular, o sobrenadante de cada poço com crescimento de clones, foi testado para a detecção das culturas contendo os híbridos secretores de anticorpos anti-proteinase. Para esta finalidade, foram utilizados testes de ELISA, nos quais a enzima foi empregada como antígenos. Os ensaios foram conduzidos em placas de poliestireno (Greiner) de 96 poços, fundo chato, previamente sensibilizadas com um dos antígenos, na concentração de 2 µg/mL, 10µg/mL e 20 µg/mL (50µL/poço), em tampão carbonato-bicarbonato de sódio, 0,05M, pH 9,2 (50µL/poço). As placas contendo os antígenos foram incubadas durante 1 hora a 37°C e *overnight* a 4°C, em câmara úmida. Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween. Para o bloqueio de possíveis sítios de ligação ainda disponíveis nas placas, as mesmas foram incubadas a 37°C, em câmara úmida, durante 1 hora com 200µl/poço de uma solução de PBS-Molico 5%. Após a etapa de bloqueio, as placas foram novamente lavadas com PBS-Tween, como descrito anteriormente. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora, a 37°C em câmara úmida, com amostras (50µl/poço) em duplicata, dos diferentes sobrenadantes de cultura a serem testados. Como controle positivo, foi utilizado o *pool* de soro colhido de camundongos imunizados com a enzima, diluído seriadamente na razão 2, entre 100 e 12.800 vezes, em PBS-Molico 2%. Como controle negativo foi utilizado soro pré-imune de camundongo BALB/c, diluído seriadamente na razão 2, entre 100 e 800 vezes. Após o mesmo procedimento de lavagem utilizado anteriormente, as placas foram incubadas por 1 hora, a 37°C em câmara úmida, com 50µL/poço de uma solução de IgG de coelho anti-Imunoglobulina de camundongo (preparada no laboratório), conjugada com HRPO (Sigma) na diluição de 1:6.000 em PBS-Molico 2%. Após mais um novo ciclo de lavagem, a revelação da reação foi feita pela adição de 50µL de substrato cromogênico, 2mg de ortofenilenodiamina – OPD (Sigma) em 5,0mL de tampão citrato-fosfato de sódio

0,05M, pH 5,0, e 0,03% de H₂O₂ (Merck). Ao final de uma incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro, a catálise do substrato foi interrompida pela adição de 25µL/poço de uma solução de ácido sulfúrico 4N H₂SO₄ (Merck). A leitura colorimétrica foi realizada a 492nm, em leitor de ELISA (Multiskan MS, Labsystems), usando como branco os poços contendo antígeno, PBS-Molico a 5%, o anticorpo secundário, substrato cromogênico e o bloqueador da reação.

As culturas foram consideradas secretoras de anticorpos anti-proteinase quando as densidades ópticas (D.O.) dos sobrenadantes, foram iguais ou imediatamente superiores a quatro vezes a média das densidades ópticas do controle negativo.

4.14. Clonagem das culturas de hibridomas

As culturas das placas de fusão (24 poços), secretoras dos anticorpos de interesse, foram clonadas através da técnica de diluição limitante. Para isso, a concentração celular das culturas, cujos sobrenadantes apresentaram os melhores resultados nos testes de ELISA, foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer, permitindo o preparo de suspensões celulares em meio HT (meio RPMI completo, com 0,136mg/L de hipoxantina e 0,038mg/L de timidina), contendo 200 células em 5 mL de cada cultura. Cada uma das suspensões foi semeada em uma placa de 96 poços (50µL/poço), contendo *feeder-layer* de macrófagos, previamente preparado como descrito no item 4.11.1. Desta forma, foram preparadas placas de clonagem com células na densidade de 2 células/poço. As placas de clonagem foram transferidas para incubadora com atmosfera de 5% de CO₂, com 95% de umidade relativa, a 37°C, e permaneceram incubadas no máximo 20 dias. Os poços que apresentaram crescimento de um único clone tiveram seus respectivos sobrenadantes testados por ELISA, como descrito anteriormente.

4.15. Expansão e criopreservação dos hibridomas

As culturas contendo hibridomas secretores de anticorpos, anti-proteinase, foram expandidas através de subcultivos em frascos de cultura (T-25, Corning), na presença

de meio RPMI-1640 completo, e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, a 37°C. Após o crescimento de até 60 a 80%, as culturas que permaneceram secretoras dos anticorpos de interesse, 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 1.500 rpm por 10 minutos, o sedimento celular obtido foi ressuspensão em meio de congelamento (RPMI-1640 completo contendo 10% de DMSO) em volumes suficientes, obtendo-se suspensões de 1,0 – 2,0 x 10⁶ células/mL. As suspensões obtidas foram transferidas para criotubos, apropriados para o congelamento de células (1mL/frasco) os quais foram transferidos, imediatamente, para um freezer a –80°C, mantidos em estante de papelão apropriada. Cerca de 24 horas após o congelamento a –80°C, os tubos foram transferidos para reservatórios de criopreservação, contendo nitrogênio líquido. De cada clone, foram estocadas entre 5 e 6 ampolas.

4.16. Determinação dos isotipo de imunoglobulinas dos anticorpos monoclonais

Para a determinação das classes e subclasses de imunoglobulinas, produzidas pelos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais de camundongos (culturas submetidas à clonagem), os sobrenadantes de cultura coletados dos frascos de cultivo foram testados em placas de poliestireno por ELISA, através do kit (ImunoPure Monoclonal Antibody Isotyping kit I - HRP/ABTS, Pierce), contra anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo produzidos em coelhos (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA e anti-IgM, e cadeias leves, anti-kappa e anti-lambda (armazenados em tampão fosfato (PBS), pH 7,4, contendo 1% BSA e 0,05% de azida sódica), de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados como controle negativo, o soro normal de coelho, anticorpos monoclonais IgG1 de camundongos, como controle positivo, e o substrato ABTS (2,2-azino-di[3-ethyl benzthiazoline sulfonic acid], presentes no kit. Ao final da reação, foi feita a leitura a 405 nm, considerando o controle positivo com uma faixa de densidade óptica (D.O.) de 0,8 a 1,2.

4.17. Produção de ascite

Camundongos BALB/c, foram injetados intraperitonealmente com 0,5mL de óleo mineral (Nujol, Schering-Plough), de acordo com indicações de Léo *et al.* (2000). Após, aproximadamente, 7 dias da injeção do Nujol, 5 animais receberam, pela mesma via, uma injeção de 0,5mL de suspensão contendo $0,50 \times 10^6$ células de um hibridoma secretor do anticorpo monoclonal. Para cada clone, foram empregados 5 animais, e decorridos 10 dias da injeção dos hibridomas, a grande maioria dos animais injetados apresentavam desenvolvimento de tumor ascítico, dos quais foram coletados cerca de 20mL de ascite por punção peritoneal. Estas foram coletadas e processadas, sendo que os *debris* celulares e o óleo mineral, foram separados das ascites por centrifugação a 3.500 rpm, durante 15 minutos, a 20°C. As ascites límpidas e livres de células foram armazenadas a -20°C, até o momento do uso.

4.18. Reatividade dos anticorpos monoclonais (AcMo)

A reatividade dos AcMo frente às proteinases extracelulares de *Candida spp.* foi testada por *western blotting*, utilizando-se três diferentes preparações antigênicas: proteinase ácida purificada de *C. albicans*, extrato bruto de *C. albicans* e extrato bruto de *C. dubliniensis*.

4.18.1. Western Blotting

Após a separação eletroforética das amostras de *Candida spp.* por SDS-PAGE, realizada como descrito no item 4.5, as proteínas foram transferidas eletroforicamente para membranas de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979), utilizando-se o sistema de transferência “Mini Protean II” (Bio-Rad). Brevemente, as proteínas foram transferidas para a nitrocelulose (S&S) de 0,45 µm aplicando-se 100 V por 2 h em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% Metanol, pH 8,1). Após a eletroforese as

membranas foram rapidamente coradas com Ponceau S (Sigma) a 0,5 % em 1% de ácido acético, a fim de verificar a eficiência da transferência.

Em seguida, as fitas de nitrocelulose foram incubadas com PBS pH 7,4 contendo 5 % de leite desnatado (Molico, Nestlé) e 0,05 % Tween 20 (PBS-T-Mo) por 1 h a temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios ligantes de proteínas.

Após a remoção do bloqueador por lavagens sucessivas das membranas com PBS-T, as fitas de nitrocelulose foram imersas em solução contendo os anticorpos específicos diluídos apropriadamente em PBS-T-Mo (sobrenadantes de cultura contendo AcMo diluídos 1:2 e ascites contendo AcMo diluídos 1:50) e incubados por 1 h a temperatura ambiente e 18 h a 4 °C. Em seguida, as fitas foram lavadas com PBS-T (3 lavagens) e então incubadas por 2 h a temp. ambiente com o anticorpo secundário, a anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído a 1:250 em PBS-T-Mo. Após a remoção do conjugado por lavagens sucessivas com PBS-T, as reações foram reveladas pela adição do substrato-cromógeno (0,03% de H₂O₂ e 0,5 mg/mL de 3,3'-diaminobenzidina em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4). A reação foi interrompida por lavagens das tiras de nitrocelulose com água corrente logo após o aparecimento das bandas coradas.

5. RESULTADOS

5.1. Detecção enzimática:

Os níveis de proteinase foram analisados, utilizando-se o meio de cultura YNB-0,2% BSA, inoculado com as 27 cepas de leveduras: 8 cepas de *Candida* padrão, 1 cepa de *S. cerevisiae*, e 16 isolados da cavidade oral produtoras de proteinase ácida e 2 cepas não produtoras de proteinase, pela observação do halo de degradação da albumina presente no meio. As placas foram incubadas à 37 °C, num período de 3 dias.

A exceção das cepas ICB-158 (*C. albicans*) e ICB-159 (*C. dubliniensis*), as demais cepas de *Candida spp* testadas apresentaram níveis igualmente elevados de atividade da proteinase ácida extracelular, quando cultivadas em meio sólido contendo BSA e YNB, conforme ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3
Índice de atividade enzimática.

Cepa	Pz	Índice	Atividade Enzimática
12-A, 156-B, CBS-562, 97-a, F-72, E-37, FCF-405, FCF-152, 778, 777, ICB-07, ICB-08, ICB-33, CBS-604, 17-b, 21-c, 7-a, 4-c, CBS-94, 1-b, FCF-430, Ct-4, CBS-573, CBS-566 e CBS-1171	< 0,64	3	Fortemente positiva
ICB-158 e ICB-159	= 1	1	Ausência de atividade enzimática

Desta forma, a cepa 12-A, linhagem de *C. albicans* (Figura 1) foi escolhida para a produção da proteinase ácida extracelular em meio líquido, para sua posterior purificação, por ser a cepa melhor caracterizada sorologicamente entre as amostras testadas (Melo, 2000).



Figura 1 - Halo de degradação de proteinase ácida extracelular de *C. albicans* (12-A), após 72 horas de incubação em meio indutor.

5.2. Purificação da enzima

A purificação de uma proteinase extracelular do sobrenadante de cultura de *C. albicans*, (cepa 12-A), se deu por meio de precipitação com sulfato de amônio, seguido de diversas etapas cromatográficas, como indicado no ítem 4.4 do material e métodos.

Inicialmente, o material desalinizado, foi utilizado para eluição das proteínas, por 4 diferentes concentrações de NaCl (100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM) em coluna de troca iônica-DEAE, revelando apenas um pico de atividade proteolítica, em aproximadamente 9 frações eluídas a 300 mM de NaCl, cuja atividade enzimática foi considerada positiva, entre os valores maiores que 0,03 de densidade óptica (D.O.) a 280 nm.

A concentração protéica dos frascos foi monitorada por luz ultravioleta (UV), e lida a 280 nm, em espectrofotômetro, originando os picos de valores de D.O. indicados na (Tabela 4).

Tabela 4**Densidade Óptica a 280 nm das proteínas eluídas em “Stepwise”.**

Eluição em NaCl	Densidade Óptica
UNBOUND	2,063
100 mM	2,537
200 mM	2,950
300 mM	0,993
500 mM	0,248

Dois litros de meio (BSA-YNB) inoculado com a cepa 12-A de *C. albicans*, foi preparado novamente, e aplicado na coluna. Retirou-se proteínas com 150 mM de NaCl, e em seguida com um gradiente linear de 150 mM a 400 mM de NaCl, coletando-se, em média, 70 frações de 3 mL por tubo, detectando-se atividade enzimática somente em 11 frações.

Esse material foi misturado, dialisado, liofilizado, ressuspensão em 240 µL de tampão Tris-NaCl, e aplicado na coluna de gel filtração associada ao HPLC, obtendo-se 39 tubos, coletados em frações de 0,5 mL por tubo, com um único pico proteico de atividade enzimática, em aproximadamente 7 tubos.

Os rendimentos obtidos após as várias etapas de purificação estão resumidos na (Tabela 5).

Tabela 5**Esquema de purificação de uma proteinase ácida de *C. albicans*.**

	Volume (mL)	Total de Proteína (mg)	Total de Atividade (U)	Atividade Específica (U/mg)
C.F.¹	2.000,0	32,98	40.666,67	1.233,07
A.S.²	70,0	25,98	3.343,64	128,70
DEAE³	33,0	6,61	1.292,16	195,48
Gel⁴	3,5	1,80	349,09	204,09

¹ Cultura Filtrada² Precipitação com sulfato de amônio³ Coluna de troca iônica⁴ Coluna de agarose associada ao HPLC

5.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

No resultado do monitoramento das frações enzimáticas, obtidas no gradiente linear e HPLC, por eletroforese em sistema desnaturante onde as proteínas são separadas por massa molecular e carga de superfície, obteve-se uma fração protéica no gel corado com prata, com peso molecular de aproximadamente 41 kDa, como mostra a (Figura 2).

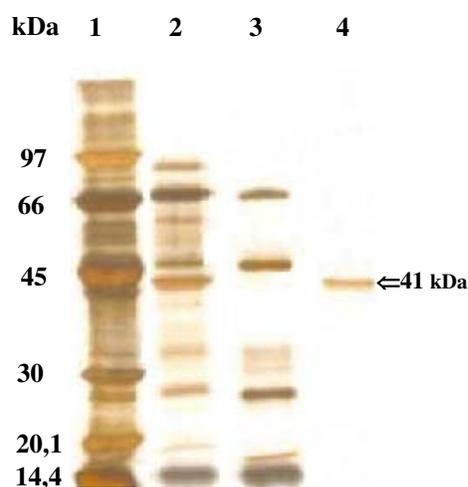


Figura 2 – Gel SDS-PAGE de proteínas extracelulares de *C. albicans* a cada etapa de purificação. 1) Marcador de massa molecular, 2) Sobrenadante de cultura de *C. albicans*, 3) Proteínas não adsorvidas à DEAE e 4) Proteína Purificada no HPLC.

5.4. Eletroforese de gel “nativo” de poliacrilamida (Zimagrama)

Os testes de atividade enzimática em gel de poliacrilamida copolimerizados com BSA ou gelatina (Figuras 3 e 4), demonstraram que o BSA é degradado pela enzima pura, apenas em tampão KCl-HCl, pH 2,5, mas não em tampão Tris-HCl, pH 8,0, porém o colágeno não é degradado pela enzima na presença de nenhum dos tampões testados. A enzima presente no gel “nativo”, mostra aproximadamente 43 kDa.

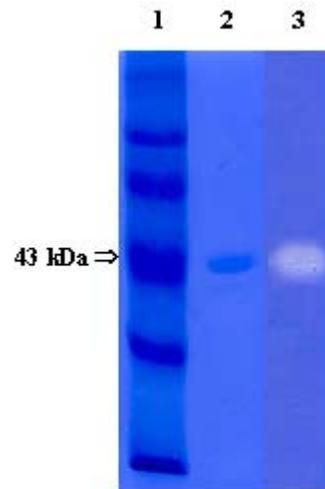


Figura 3 – Atividade enzimática em gel “nativo” copolimerizado com BSA, sobre a proteína purificada. 1) Marcador de massa molecular 2) Na presença de tampão Tris-HCl/CaCl₂, pH 8,0, 3) Na presença de tampão KCl-HCl, pH 2,5).

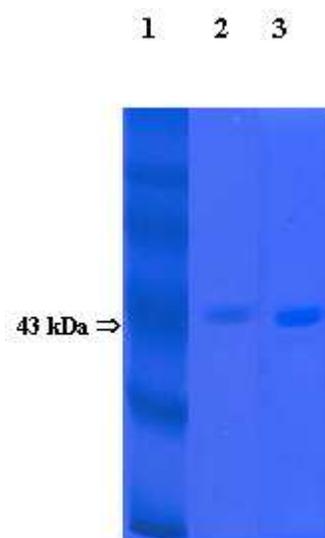


Figura 4 – Atividade enzimática em gel “nativo” copolimerizado com gelatina, sobre a proteína purificada. 1) Marcador de massa molecular, 2) Na presença de tampão Tris-HCl/CaCl₂, pH 8,0. e 3) Na presença de tampão KCl-HCl, pH 2,5).

5.5. Inibidor de proteinase

A atividade enzimática da fração purificada foi reduzida em cerca de 44,23 % e inibida em cerca de 55,77% pelo tratamento com pepstatina A, um inibidor de proteinases do tipo pepsina, na proporção proteinase:inibidor de 10:1 (m/m), como demonstra a (Tabela 6).

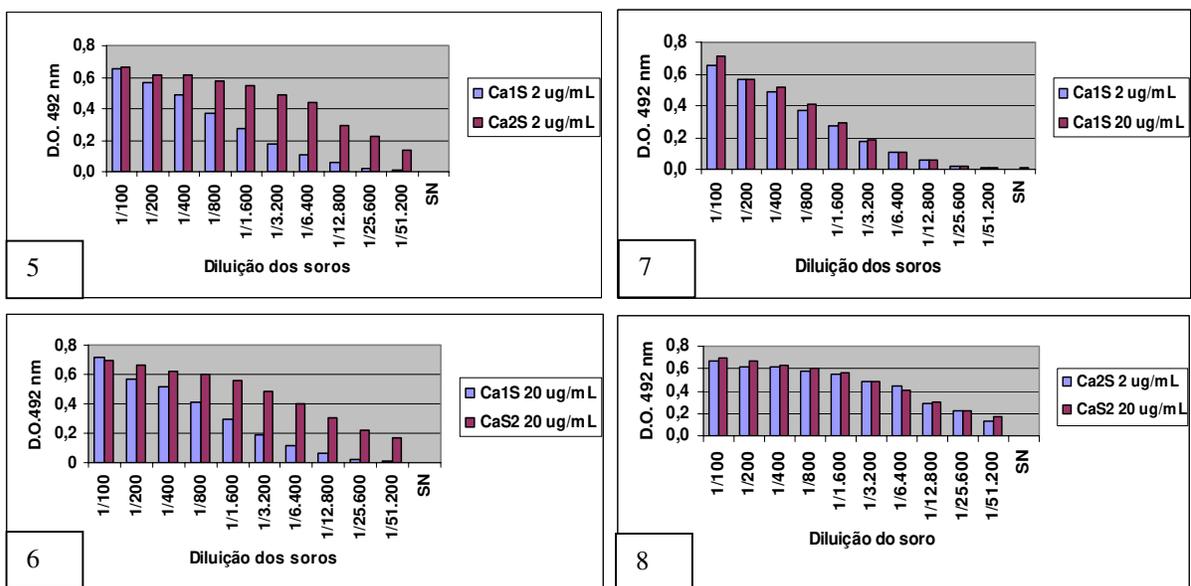
Tabela 6

Efeito da pepstatina A sobre a atividade da proteinase ácida de *C. albicans*.

Amostra	Enzima purificada (2,32 µg/mL)	Pepstatina A (1,46 µM)	Atividade Enzimática (U)	Atividade Relativa (%)
1	+	+	0,96	44,23
2	+	-	2,17	100,00

5.6. Otimização dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

O processo de imunização utilizado, demonstrou que os dois animais responderam positivamente ao estímulo antigênico dado durante os 30 dias de imunização. Os gráficos das Figuras 5, 6, 7 e 8, mostram os resultados dos testes imunoenzimáticos (ELISA) do soro imune (SI) obtidos dos camundongos Ca1 e Ca2 diluídos até 1:51.200 reagindo com 2 µg/mL e 20 µg/mL de proteinase ácida purificada, observando-se que não houve diferença nos resultados obtidos utilizando-se as duas diferentes concentrações de antígeno para a sensibilização das placas de ELISA, considerando-se um *cutt off* de 4 vezes a D.O. do soro normal (SN) = 0,020.



Figuras , 5, 6, 7 e 8 - Testes imunoenzimáticos (ELISA) de soro de camundongos Ca1 e Ca2, com 2 µg/mL e 20 µg/mL de proteinase ácida purificada, após 30 dias de imunização.

5.7. Seleção dos hibridomas

Observações periódicas do crescimento celular, ao microscópio invertido, das 4 placas (24 poços), com os hibridomas, e após 5 dias, observou-se as primeiras colônias híbridas.

Os sobrenadantes dos poços com 1/3 de crescimento celular após a fusão, com 15 a 18 dias, foram testados por ELISA com 20 µg/mL de antígeno, obtendo-se 7 famílias de clones positivos (clones “mães”), como mostra a Tabela 7.

Para a escolha dos clones das placas de 24 poços, que seriam clonados para a placa de 96 poços, foi utilizado um *cutt off* de 4 vezes o valor nas reações de ELISA com o soro normal. No caso dos clones mães o SN diluído 1:100 apresentou uma D.O. = 0,004, próxima do zero, $0,004 \times 4 = 0,008$, sendo o controle negativo. E, o *pool* do soro imune (SI) dos dois camundongos utilizados para a fusão celular, foi empregado como controle positivo. A Tabela 7, mostra também a D.O., dos clones “mãe” selecionados pelos testes de ELISA.

A nomenclatura para os clones “mãe”, foi baseada no número da placa de fusão (1, 2, 3 ou 4), colunas (números, de 1 ao 6) e linhas (letras de A até D), presentes nas placas de 24 poços.

Tabela 7

Clones “Mãe”, secretoras de anticorpos após a fusão das SP2/0 com linfócitos do baço, dos camundongos imunizados.

	Clone “Mãe”	D.O. 492 nm*
1	1B1	0,372
2	1D2	0,289
3	1D6	0,309
4	2A6	0,247
5	2D2	0,364
6	3D4	0,203
7	4C5	0,239

*Soro Imune (SI) 1:100= 0,714 a 1:51.200=0,014; Soro Normal (SN) 1:100 = 0,004

5.8. Resultado da clonagem

Como não houve diferença, nas reações de 2µg/mL e 20 µg/mL nos testes de ELISA, os clones obtidos nas placas de 96 poços foram testados com 2µg/mL, a partir do 11º dia após a subclonagem das 7 famílias de clones.

Três clones “mãe”, dos sete obtidos inicialmente: 1D2, 4C5 e 3D4, perderam a capacidade de secreção de anticorpos, após a subclonagem, e durante o processo de expansão e armazenamento. Estas foram reclonadas nas placas de fusão (24 poços), porém, não positivaram novamente, e foram desprezadas.

Após a clonagem nas placas de 96 poços, pela técnica de diluição limitante, foram obtidos 20 clones secretores positivados nos testes de ELISA, como mostra a (Tabela 8).

Tabela 8

Clones secretores dos anticorpos obtidos por imunoensaio (ELISA).

Número	Clone	D.O.
1	1D6B5	0,215
2	1D6C10	0,207
3	1D6E9	0,210
4	1D6F5	0,198
5	1D6G3	0,211
6	2A6B11	0,131
7	2A6C9	0,128
8	2A6E8	0,137
9	2A6F6	0,135
10	1B1B3	0,302
11	1B1C2	0,243
12	1B1D6	0,223
13	1B1G1	0,188
14	1B1G2	0,242
15	1B1H4	0,240
16	2D2B1	0,260
17	2D2E8	0,231
18	2D2C10	0,308
19	2D2F9	0,302
20	2D2E9	0,265

Soro Imune (SI) 1:100 = 0,714 a 1:51.200=0,014; Soro Normal (SN) 1:100= 0,00

5.9. Isotipagem dos anticorpos

A isotipagem dos 20 clones obtidos mostrou que sete deles apresentam mais de um isotipo juntos (Tabela 9).

Tabela 9
Isotipagem dos anticorpos de clones secretores.

	Clone	Isótipos	Cadeia leve
1	1D6B5	IgG1	Kappa
2	1D6C10	IgG1 e IgM	Kappa e Lambda
3	1D6E9	IgG1	Kappa
4	1D6F5	IgG1	Kappa
5	1D6G3	IgG1 e IgG2a	Kappa
6	2A6B11	IgG1 e IgG2a	Kappa
7	2A6C9	IgG1	Kappa
8	2A6E8	IgG1 e IgG2a	Kappa
9	2A6F6	IgG1 e IgG2a	Kappa
10	1B1B3	IgG1	Kappa
11	1B1C2	IgG1	Kappa
12	1B1D6	IgG1	Kappa
13	1B1G1	IgG1 e IgM	Kappa e Lambda
14	1B1G2	IgG1	Kappa
15	1B1H4	IgG1	Kappa
16	2D2B1	IgG1 e IgM	Kappa
17	2D2E8	IgG1	Kappa
18	2D2C10	IgG1	Kappa
19	2D2F9	IgG1	Kappa
20	2D2E9	IgG1	Kappa

Foram obtidos treze clones secretores de anticorpos monoclonais com o isotipo da classe IgG1 de cadeia leve do tipo Kappa, a partir dos clones “mãe” 1B1, 1D6, 2A6 e 2D2, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10**Anticorpos monoclonais obtidos das famílias de clones secretores.**

	Clone	Isótipos	Cadeia leve
1	1D6B5	IgG1	Kappa
2	1D6E9	IgG1	Kappa
3	1D6F5	IgG1	Kappa
4	2A6C9	IgG1	Kappa
5	1B1B3	IgG1	Kappa
6	1B1C2	IgG1	Kappa
7	1B1D6	IgG1	Kappa
8	1B1G2	IgG1	Kappa
9	1B1H4	IgG1	Kappa
10	2D2E8	IgG1	Kappa
11	2D2C10	IgG1	Kappa
12	2D2F9	IgG1	Kappa
13	2D2E9	IgG1	Kappa

5.10. Ascites

Foram escolhidos dois hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, para a multiplicação dos anticorpos via produção de ascite, 2D2C10 e 1D6E9, dos quais obteve-se 14 mL e 16 mL de líquido ascítico, respectivamente, para os testes de reação em *western blotting*, com a enzima pura e extrato extracelular de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

5.11. Western blotting

Neste ensaio, as três frações protéicas, a enzima purificada, o extrato bruto extracelulares de *C. albicans* e o extrato bruto extracelulares de *C. dubliniensis*, aplicados em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose reagiram com os anticorpos monoclonais obtidos. Os 13 AcMo e os sobrenadantes dos ascites obtidos dos hibridomas (2D2C10 e 1D6E9) demonstraram o mesmo perfil por “imunoblot”, reconhecendo uma banda de 41 kDa (Figura 9).



Figura 9 – “Imunoblot” do anticorpo monoclonal 1D6B5 reagindo com as 3 diferentes frações protéicas extracelulares de *Candida spp.* Co) Controle negativo, 1) Proteinase purificada de *C. albicans*, 2) Extrato bruto de *C. albicans* e 3) Extrato bruto de *C. dubliniensis*.

6. DISCUSSÃO

Entre as espécies do gênero *Candida*, a *Candida albicans* é considerada o mais importante patógeno oportunista em humanos. Esse microrganismo invade a mucosa oral causando candidíase, uma infecção fúngica com diferentes graus de severidade (Odds, 1979). Até o momento, alguns fatores de virulência foram associados com candidíases invasivas, como a aderência da levedura à superfície celular, a formação da forma filamentosa, a variabilidade fenotípica (*switching*), a produção de toxinas e enzimas hidrolíticas extracelulares constituem os fatores importantes para o desencadeamento de infecções por *Candida spp* (Cultur, 1991; Delgado & Aguirre, 1997; Vidotto *et al.*, 1999).

Entre as exoenzimas, as proteinases ácidas, fosfolipases, hialuronidases e condroitina sulfatases produzidas por *Candida*, são fatores relacionados à sua patogenicidade, sendo as proteinases ácidas consideradas um dos mais importantes fatores de virulência desses microrganismos, permitindo a invasão proteolítica dessas leveduras no tecido do hospedeiro (Cultur, 1991; Neely & Holder 1990; Odds, 1985; Vartivarian & Smith, 1993).

Utilizando diferentes esquemas de purificação e caracterização, vários autores mostraram que a atividade proteolítica extracelular de *C. albicans* está fortemente associada a uma proteinase aspártica, com propriedades bioquímicas similares à pepsina e catepsina (Morrison *et al.*, 1993; Ruchel, 1981; Ruchel, 1983).

Em nossa pesquisa observamos elevada atividade enzimática da proteinase ácida sobre a albumina no meio sólido, portanto, as 26 amostras das seis espécies de *Candida* estudadas (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*) apresentaram Índice = 3, não mostrando diferença entre os isolados, exceto as cepas ICB-158 de *C. albicans* e ICB-159 *C. dubliniensis*, conhecidamente não produtoras de proteinase ácida, que foram utilizadas como controles negativos na seleção de amostras produtoras da enzima.

Com base nos resultados dos cultivos realizados em placas de petri em meio indutor, a amostra 12-A de *C. albicans* foi selecionada para a obtenção de uma massa de proteinase ácida extracelular a ser purificada, por apresentar um elevado índice de atividade

proteolítica. A enzima foi purificada dos sobrenadantes de cultura, através do uso de um esquema simplificado de purificação envolvendo a precipitação com 75 % de saturação com sulfato de amônio, seguido de processos cromatográficos em coluna de troca iônica e de exclusão molecular. A análise eletroforética por SDS-PAGE da fração purificada mostrou uma banda protéica de aproximadamente 41 kDa. Em gel nativo de poliacrilamida, a fração isolada mostrou uma banda de cerca de 43 kDa.

A atividade enzimática exibida pela fração purificada foi reduzida em 44,23 %, com baixas concentrações (1,46 μ M) de pepstatina A, um inibidor de proteinase do tipo pepsina. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios realizados com a proteinase ácida isolada de *C. albicans* por outros autores (Ruchel, 1981; Na *et al.* 1997).

A proteinase ácida de *C. albicans* pode funcionar como uma “agressina”, devido à digestão de proteínas do hospedeiro em microambientes ácidos (Odds, 1985). Essa enzima apresenta um amplo espectro de especificidade de substratos, tais como a albumina, hemoglobina, transferrina, caseína, imunoglobulinas, queratina e colágeno (Negi *et al.*, 1984, Kaminishi *et al.*, 1986; Ray *et al.*, 1991). Em nosso trabalho, testamos como substratos, albumina (BSA) e colágeno em tampões de pH ácido e básico, e verificamos que a enzima purificada foi capaz de degradar apenas BSA, em tampão ácido. Mesmo após 16 h de incubação, a proteinase ácida não foi capaz de degradar o colágeno presente no gel de poliacrilamida, como visto anteriormente por Na *et al.* (1997).

Remold *et al.* (1968) mostraram que a proteinase ácida de *C. albicans* apresenta atividade proteolítica máxima em pH ao redor de 3,2. Estudos realizados por Na *et al.* (1997) mostraram que a enzima possui uma atividade enzimática ótima entre pH 2,0 e 3,5 com um pico máximo de atividade em pH 2,5. Assim como os resultados desses autores, em nosso trabalho, o estudo das atividades enzimáticas dos sobrenadantes e das diferentes frações cromatográficas foram conduzidas com sucesso em tampão de pH 2,5. Não foi possível observar atividade enzimática nesses materiais quando se empregou tampão de pH 8,0.

O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho sugere que a proteinase ácida que purificamos tem as propriedades de uma carboxil proteinase ácida (aspartil proteinase), como a enzima anteriormente caracterizada em *C. albicans* por diversos

autores (Banerjee *et al.*, 1991a; Ray *et al.*, 1991; Na *et al.*, 1997). Entretanto, maiores estudos bioquímicos e imunoquímicos devem ser feitos para completa caracterização da enzima que purificamos.

Altos níveis da proteinase ácida foram produzidos pela amostra 12-A de *C. albicans* cultivada em meio YNB-BSA (sem aminoácidos e sem sulfato de amônio) suplementado com glicose, em pH ácido. Além do BSA, outras proteínas como a hemoglobulina, ovoalbumina, histona, peptona e triptona poderiam ser usadas como fonte de nitrogênio e induzir a produção de proteinase de *C. albicans*. Mas, como foi verificado por Banerjee *et al.* (1991b), os sobrenadantes de culturas *C. albicans* e de outras espécies patogênicas de *Candida* acumularam 1.000 vezes mais proteinase quando cultivadas na presença de BSA do que na presença de sulfato de amônio. Quando casaminoácidos ou uma mistura de aminoácidos equivalente à composição de BSA foi usada como fonte de nitrogênio, não houve produção de proteinase. Resultados distintos destes foram encontrados por Homma *et al.* (1993). Esses autores mostraram que a produção da proteinase ácida era dependente de glicose (fonte de carbono), mas não de BSA ou qualquer outra fonte de nitrogênio. Mostraram também que a produção da proteinase ácida não ocorreu em pH maior que seis, independente da existência de uma fonte de nitrogênio, sugerindo que o pH do meio pode atuar diretamente sobre a indução da enzima, e não como um efeito secundário ao suprimento de nitrogênio da proteína utilizada pela enzima. A glicose além de fonte de carbono contribui para a degradação e formação de compostos que atuam na acidificação do meio (Tsuboi *et al.* 1989; Homma *et al.*, 1993). Entretanto, Wu & Saramayake (1999), testando dois tipos de cultivo de *Candida*, com o monitoramento de crescimento e concentração protéica, também mostraram que o meio *yeast carbon base* (YCB) com BSA apresentou maior expressão nos níveis de proteinase do que o cultivo da levedura em saliva humana suplementada com glucose, reafirmando os resultados obtido por Banerjee *et al.* (1991b) sobre a importância de uma proteína como fonte de nitrogênio para induzir uma maior quantidade da enzima.

Uma vez que a enzima purificada do sobrenadante de cultura é considerada um importante fator de virulência e esta apresentou apenas uma banda protéica por SDS-PAGE mostrando propriedades físico-químicas e atividade biológica similares às das proteinases

ácidas isoladas anteriormente de *C. albicans*, utilizamos as preparações obtidas nesse trabalho para imunização de camundongos BALB/c visando a expansão de linfócitos B específicos, para serem empregados em experimentos de fusão celular e obtenção de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais.

Os procedimentos empregados para a imunização dos camundongos resultou na produção de anticorpos séricos, capazes de detectar a enzima purificada, adsorvida às placas de poliestireno, em concentração de 2 µg/mL, em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA, em diluições de até 1:51.200.

De acordo com os objetivos propostos para esse trabalho, anticorpos monoclonais foram produzidos contra a enzima purificada através da fusão de um *pool* de células esplênicas de dois camundongos imunizados e o mieloma SP2-Ag 14/0 resultando na obtenção de quatro (4) famílias de hibridomas, a saber, 1B1, 1D6, 2A6, 2D2, secretores de anticorpos que detectavam a enzima por ELISA. Após a clonagem por diluição limitante das culturas positivas, foram obtidos 20 clones secretores de anticorpos específicos para a proteinase ácida.

Na caracterização dos AcMo realizada através da isotipagem, todos os anticorpos puderam ser isotipados. A vantagem do kit utilizado é a facilidade de manuseio aliado à rapidez dos resultados. Neste ensaio, treze dos 20 clones apresentaram títulos positivos para a secreção de anticorpos isotipo IgG1, com cadeia leve do tipo kappa (k), comparados com o controle positivo do kit, e sete apresentaram mais de um isotipo juntos (IgM, kappa ou lambda e IgG2a, kappa), que poderão ser futuramente reclonados para seleção de outros monoclonais.

Os anticorpos monoclonais produzidos por todos os clones obtidos nessa fusão apresentaram reatividade por “imunoblotting” com uma banda protéica de 41 kDa na fração purificada e no extrato bruto de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. A *C. dubliniensis* é um patógeno oportunista emergente, isolado de cavidade oral de pacientes, descrito por Coleman em 1995, que inicialmente foi incluída no grupo de *C. albicans*. No entanto, investigações independentes de coleções de cultura de *C. albicans* revelaram que aproximadamente 2 % dessas leveduras eram na realidade isolados de *C. dubliniensis* (Coleman, 1999). Os anticorpos monoclonais obtidos neste trabalho também foram capazes

de reagir com a enzima presente nas preparações de extrato bruto de *C. dubliniensis*, indicando que reconhecem epítomos comuns a essas duas espécies de *Candida*. Investigações futuras serão conduzidas para analisar a reatividade desse AcMo com outras espécies do gênero *Candida*.

O diagnóstico de candidíase, especialmente candidíase sistêmica, não é fácil de obter através de métodos sorológicos devido à elevada reação cruzada dos anticorpos produzidos pelos pacientes infectados com outras leveduras do gênero *Candida*. O fato da aspartil proteinase de *C. albicans* ser um importante fator de virulência e normalmente ser produzida por muitas das cepas patogênicas de *Candida* e outros fungos de importância médica, como, por exemplo, *Aspergillus* (Koaze *et al.*, 1964; Chang *et al.*, 1976) torna essa enzima uma candidata natural para ser usada no sorodiagnóstico de candidíases. Assim, anticorpos monoclonais altamente específicos para a proteinase ácida constituem reagentes importantes para o uso em diagnóstico, através de sistemas de captura da enzima presente no soro de pacientes (Na *et al.*, 1997; Na *et al.*, 1999a). O diagnóstico preciso da espécie de *Candida* causadora de infecção orientará a escolha dos antimicóticos mais adequados ao paciente.

Os hibridomas obtidos neste trabalho serão futuramente analisados quanto a sua capacidade de capturar a proteinase ácida presente no soro de pacientes.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho de pesquisa, permitem concluir que:

1. A amostra 12-A de *C. albicans* foi selecionada, com base em seu elevado índice de atividade proteolítica em meio sólido, para obtenção da proteinase ácida a ser purificada.
2. O processo de purificação da proteinase, resultou na obtenção de uma fração protéica homogênea, com atividade enzimática sobre BSA, mas não sobre colágeno, que foi parcialmente inibida pela pepstatina A.
3. A imunização de camundongos com a enzima purificada permitiu a obtenção de anticorpos policlonais capazes de detectar a enzima em ensaios do tipo ELISA.
4. Na fusão de células de mieloma SP2/0 com células esplênicas de camundongos imunizados, obteve-se 4 famílias de hibridomas secretores (clones-mãe), de anticorpos que reconhecem a proteinase ácida de *C. albicans* por ELISA.
5. Nas clonagens por diluição limitante foram obtidos 13 clones estáveis, secretores de anticorpos monoclonais do isotipo IgG1 (kappa) anti-proteinase ácida de *C. albicans*.
6. Os anticorpos monoclonais anti-proteinase ácida de *C. albicans* do isotipo IgG1, reagiram cruzadamente com enzima presente na cepa 778 de *C. dubliniensis*.
7. Hibridomas não clonados secretores de isotipos IgM (κ e λ) e IgG2a (κ), reativos contra a proteinase purificada de *C. albicans* foram obtidos.
8. O conjunto de AcMo obtidos serão empregados no desenvolvimento de ensaios de ELISA de captura para detecção da proteína ácida extracelular de *Candida spp* em amostras de pacientes.

REFERÊNCIAS*

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober, JS. **Imunologia celular e molecular**. 4^a ed. Ed. Revinter; 2002. p 44-45.
- Aly, R. *et al.* Correlation of human *in vivo* and *in vitro* cutaneous antimicrobial factors. **J Infect Dis**. 1975; 131 (5): 579-583.
- Arai K, Lee F, Miyajima A., Miyatake S, Arai N, Yokta T.. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annu Rev Biochem**. 1990; 59: 783-836.
- Arnavielhe S, Blancard A, Mallie M. Micological monitoring of *Candida albicans* infections in various hospital care units molecular typing of isolated strains and epidemiological survey. **Pathol Biol**. 1996; 44: 447-451.
- Bailey J.E, Ollis DF. **Biochem Eng Fund**. New York: McGraw Hill, 1977.
- Bailey A, Wadsworth E, Calderone R. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells: host-induced protein synthesis and signaling events. **Infect Immunol**. 1995; 63: 569-572.
- Banerjee A, Ganesan KE, Datta A. Rapid purification of secretory acid proteinase from *Candida albicans* and its characterization. **Ind J Biochem biophys** 1991a; 28 (5-6): 444-448.
- Banerjee A, Ganesan KE, Datta A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**. 1991b; 137 (Pt 10): 2455-2461.
- Bennett B, Check IJ, Olsen MR, Hunter RL. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. **J Immunol Methods**. 1992; 153: 31-40.

* Baseada na norma da UNICAMP/FOP, modelo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Bevilacqua, MP Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annu Rev Immunol.** 1993; 1: 767-804.
- Bierer BE, Sleckman BP, Ratnofsky SE, Bukaroff SJ.. The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T –cell activation. **Annu Rev Immunol.** 1989; 7: 579-600.
- Blum H, Beier H, Gross JH. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis.** 1987; 8: 93-99.
- Boehringer Mannheim. **1998 Bichemicals Catalog.** Germany: Boehringer Mannheim GmbH; 1998. p. 484.
- Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C *et al.* Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. **J Clin Microbiol.** 1995; 33: 1129-1135.
- Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. **J Clin Microbiol.** 1996; 33: 1129-1135.
- Borg Von Zepelin M *et al.* In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cell by Fuc α 1-2 Gal β -bearing complex carbohydrates. **Infect Immun.** 1998; 59(3): 543-554.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** Orlando, 1975; 72: 248-254.
- Brawner DL, Cutler JE. Variability in expression of a cell surface determinant on *Candida albicans* evidenced by an agglutinating monoclonal antibody. **Infect Immun.** 1984; 43: 966-972.

- Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiol. Rev.** 1991; 55: 1-50.
- Cassone A, Torosantucci A, Boccanera M, Pellegrini G, Palma C, Malavasi F. Production e characterization of a monoclonal antibody to a cell-surface, glucomannanconstituint of *Candida albicans* and other pathogenic *Candida* species. **J Med Microbiol.** 1988; 27: 233-238.
- Chang WJ, Horiuchi S, Takahashi K, Yamasaki M, Yamada Y. Struture and function of acid proteases. IV. Effects of acid protease-specific inhibitors on the acid proteases from *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. **J Biochem.** 1976; 80: 975-981.
- Caugant DA, Sandven P. Epidemiologicla analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. **J Clin Microbiol.** 1993; 31: 215-220.
- Chafin WL, Skudlarek J, Morrow KJ. Variable expression of surface determinant during proliferation of *Candida albicans* **Infect Immun.** 1988; 56: 302-309.
- Coleman DC. *Candida dubliniensis*: The emergence of a novel pathogen. **Selected Abstracts from the 1999 american society of microbiology's conference on Candida and candidiasis.** [abstract], 1999. disponível em: URL: <http://www.hivdent.org/oralm/selectedabs031999.htm>. 2000 dec 15.
- Cotton RGH, Milstein C. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. **Nature.** 1973; 244: 42-43.
- Crandall M, Edwards JE Jr. Segregation of Proteinase Mutants from heterozygous *Candida albicans*. **J Gen Microbiol.** 1987; 133: 2817-2824.
- Cultur JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol.** 1991; 45: 187-218.
- Dealler SF. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general

- microbiology laboratory. **J Clin Microbiol.** 1991; 29: 1081-1082.
- De Bernardis F *et al.* High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. **J Clin Microbiol.** 1999; 37(5): 1376-1380.
- Delgado W, Aguirre JM. Las micosis orales en la era del sida. **Rev Iberoamer Micol.** 1997; 14:14-22.
- Doebbeling BN, Lehmann PF, Hollis RJ, Wu LC, Widmer AF, Voss A *et al.* Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with isoenzyme profiles as a typing system for *Candida tropicalis*. **Clin Infect Dis.** 1993; 16: 377-383.
- Dromer F, Ronin O, Improvisi L, Dupont B. Utilite et limites du Bichro-latex albicans^R pour l'idenfication rapide de *Candida albicans*. **J Mycol Med.** 1996; 6: 91-92.
- Fasekas DE ST Grouth S, Scheideger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tatics. **J Immunol Methods.** 1980; 35: 1-21.
- Fenn JP, Segal H, Blevins L, Fawson S, Newcomb-Gayman P, Carroll KC. Comparison of the Murex *Candida albicans* CA 50 test with germ tube production for identification of *C. albicans*. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 1996; 24: 31-35.
- Fox JL. Fungal infection rates are increasing. **ASM News.** 1993; 59: 515-518.
- Freydière AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *C. krusei* colonies. **J Clin Microbiol.** 1997; 35: 877-880.
- Guinet R, Bruneau S, Marlier H. Rapid detection of *Candida albicans* by dot enzyme immunoassay. **J Immunoass.** 1991; 26: 225-231.

- Harlow E, Lane D. **Antibodies: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Hodson JJ, Craig GT. The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. **Dent Practic**. 1972; 22: 296 – 301.
- Homma M, Kanbe T, Chibana, H, Tanaka K. Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**. 1992; 138: 627-633.
- Homma M, Chibana, H, Tanaka K. Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**. 1993; 139 (6): 1187-1193.
- Hopwood V, Poulain D, Fortier B, Evans G, Vernes A. A monoclonal antibody to a cell wall component of *Candida albicans*. **Infect Immun**. 1986; 54: 222-227.
- Horn R, Wong B, Kieln TE, Armtrong D.. Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. **Rev Infect Dis**. 1985; 7:646-654.
- Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**. 2001; 147(8): 1997-2005.
- Iranzo M, Marcilla A, Elorza MV, Mormeneo S, Sentandreu R. Preparation of anti-protein and anti-mannan antisera against fungal cell wall by affinity chromatography. **Exp Mycol**. 1994; 18: 159-167.
- Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. **J Antimicrobiol Chemother**. 1992; 29: 19-24.
- Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **Clin Microbiol Rev**. 1990; 3: 32-45.
- Kaminishi H, Hagihara Y, Hayashi, Cho T. Isolation and characteristics of

collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infect Immun.** 1986; 53: 321-316.

Kaminishi HU, Miyaguchi T, Tamaki N, Suenga M, Hiasamatsu I, Mihashi H, Matsumoto H, Maeda, Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans*. **Infect Immunol.** 1995; 63: 984-988.

Kemeny DM. **A practical guide to ELISA** New York: Pergamon Press, 1991.

Klots AS, Drutz DJ, Harrison JL, Hupert M. Adherence and penetration of vascular endothelium by *Candida* yeasts. **Infect Immun** 1983; 42: 374-3841.

Koaze Y, Goi H, Ezawa K, Yamada Y, Hara T. Fungal proteolytic enzymes. Part I. Isolation of two kinds of acid proteases secreted by *Aspergillus niger* var. *macrosporus*. **Agr Biol Chem.** 1964; 28: 216-221.

Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature.** 1975; 256: 495-7.

Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD, Crane LR. Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient. **Rev Infect Dis.** 1989; 11: 379-390.

Kondoh Y, Shimizu K, TANAKA K. Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*. **Microbiol and Immunol.** 1987; 31: 1061-1069.

Krause RM. The search for antibodies with molecular uniformity. **Adv Immunol.** 1970; 12: 1-56.

Kupper, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues: mechanisms and speculations. **J Clin Invest.** 1990; 86: 1783-1789.

Kwon-chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence for role of

- extracellular proteinase in virulence of *C. albicans*. **Infect Immun.** 1985; 49: 571-575.
- Kwon-chung KJ, Bennett, JE. **Candidiasis**. P. 280-286. *In* Kwon-Chung KJ & Bennett, JE. ed., Medical micology. Lca & Febiger, Philadelphia, Pa. 1992.
- Lacaz CS. **Candidiasis**. E.P.U/EDUSP; 1980. p. 190.
- Lacher DA., Lehmann, PF. Application of multidimensional scaling in numerical taxonomy analysis of isoenzyme types of *Candida* species. **Ann Clin Lab Sci.** 1991; 21: 94-103.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 1970; 227: 680-685.
- Lehmann PF, Hsiao CB, Salkin IF. Protein and enzyme electrophoresis profiles of selected *Candida* species. **J Clin Microbiol.** 1989a; 27:400-404.
- Lehmann PF, Kemker BJ, Hsiao CB, Dev S. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. **J Clin Microbiol.** 1989b; 27: 2514-2521.
- Lehmann PF, Wu LC, Mackenzie DW. Isoenzyme changes in *Candida albicans* during domestication. . **J Clin Microbiol.** 1991; 29: 2623-2625.
- Lehmann PF, Wu LC, Pruitt WR, Meyer AS, Ahern DG. Unrelatedness of groups of yeasts within the *Candida haemulonii* complex. **J Clin Microbiol.** 1993; 31: 1683-1687.
- Le Guennec R, Reynes J, Mallie M, Pujol C, Janbon F, Bastide JM. Fluconazole – and itraconazole-resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients: multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. **J Clin Microbiol.** 1995; 33: 2732-2737.

- Léo P, Ucelli P, Augusto EFP, Oliveira MS e Tamashiro WMSC. Anti-TNP monoclonal antibodies as reagents for enzyme immunoassay (ELISA). **Hibridoma**. 2000; 19(6): 473-479.
- Lynch E, Beighton DA comparison of primary root caries lesions classified according to colour. **Caries Res**. 1994; 28: 233 – 239.
- Macdonald F, Odds FC. Virulence for mice of a proteinase secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. **J Gen Microbiol**. 1983; 129: 431-438.
- Macdonald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sabouraudia*: **J Med Vet Mycol**. 1984; 22: 79 – 82.
- Marcilla A, Monteagudo C, Mormeneo S, Sentandreu R. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. **Microbiology**. 1999; 145: 695-701.
- Martins *et al*. Presença de *Candida spp*. Em pacientes com periodontite crônica. **Ciênc Odontol Bras**. 2002; 5 (3): 75-83.
- Melo TA. **Polimorfismo dos fragmentos de DNA, aderência, produção de exoenzimas e virulência “in vivo” de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com AIDS** [Tese]. São Paulo: USP/ICB; 2000.
- Miceli MC.; Parnes JR. The role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. **Adv Immunol**. 1993; 53: 59-122.
- Mihalyi, E. **Application of proteolytic enzymes to protein structure studies**. Publicado por: Division of the chemical Rubber Co.; 1972. p. 48.
- Milstein C. Monoclonal antibodies. **Sci Am**. 1980; 243: 56-64.

- Miyakawa Y, Kagaya K, Fukazawa Y, SOE G. Production and characterization of agglutinin monoclonal antibodies against predominant antigenic factors of *Candida albicans*, **J Clin Microbiol.** 1986; 23: 881-886.
- Monod M *et al.* Mutiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Mol Microbiol.** 1994; 13(2): 357-368.
- Moreira D, Spolidorio DM, Rodriques JAO, Boriollo MF, Pereira CV, Rosa EA *et al.* *Candida* spp biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil **Pesqui Odontol Bras.** 2001; 15(3):187-95.
- Morrison CJ, Hurst SF, Bragg SL, Kuyhendall RJ, Diaz H, McLaughlin DW, Reiss E. Purification and characterization of the extracelular aspartyl proteinase of *Candida albicans*: removal of extraneous proteins and cell wall mannoprotein and evidence for lack of glycosylation. **J Gen Microbiol.** 1993; 139: 1177-1186.
- Na BK, Lee I, Kim SO, Park YK, Bai GH, Kim SJ, Song CY. Purification and characterization of extracellular aspartic proteinase of *Candida albicans*. **J Microbiol.** 1997; 35(2): 109-116.
- Na BK, Song, CY. Use of monoclonal antibody in diagnosis caused by *Candida albicans*: detection of circulating aspartyl proteinase antigen. **Clin Diagn Lab Imm.** 1999a; 6 (6): 924-929.
- Na BK, Chung GT, Song CY. Production, charaterization, and epitope mapping of a monoclonal antibody against aspartic proteinase of *Candida albicans*. **Clin Diagn Lab Imm.** 1999b; 6 (3): 429-433.

Neder RN. **Microbiologia: manual de laboratório**. São Paulo: Nobel; 1992; p. 138.

Neely AL, Holder IA. Effect of proteolytic activity on virulence of *Candida albicans* in burned mice. **Infect Immun**. 1990; 58: 1527-1531.

Negi M, Tsuboi R, Matsui T, Ogawa H. Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: Substrate specificity. **J Invest Dermatol**. 1984; 83: 32-36.

Niimi M, Niimi K, Cannon RD. Temperature related expression of the vacuolar aspartic proteinase (APR1) gene and β -N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene during *Candida albicans* morphogenesis. **FEMS Microbiol Lett**, 1997; 148: 2, 247-254.

Odds FC. ***Candida* and candidiasis**. Leicester University Press, Leicester, England; 1979.

Odds FC. *Candida albicans* aspartic proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of *Candida* infections. **Zb Bakt Hyg**. 1985; 260: 539-542.

Odds FC. *Candida* infections: An overview. **Crit Rev Microbiol**. 1987; 15: 1-5.

Parnes JR. Molecular biology and function of CD4 and CD8. **Adv Immunol**. 1989; 44: 265-311.

Prakash S, Lewontin, R.C., Hubby, J.L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations IV patterns of genetic variation in central marginal and isolated populations of *Drosophila pseudobscura*. **Genetics** 1969; 61: 841-858.

Perry JL, Miller GR, Carr DL. Rapid colorimetric identification of *Candida albicans*. **J**

Clin Microbiol. 1990; 28: 614-615.

Polonelli L, Morace G. Specific and common antigenic determinants of *Candida albicans* isolated by monoclonal antibody. **J Clin Microbiol.** 1986; 23: 366-368.

Pontecorvo G. Production of indefinitely multiplying mammalian somatic cell hybrids by polyethylene glycol (PEG) treatment. **Somatic Cell Genet.** 1976; 1: 397-400.

Potter, M. Antigen-binding myeloma proteins of mice. **Adv Immunol.** 1977; 25: 141-211.

Price MF, Wilkinson ID, Genty LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Saboraudia.** 1982; 20 (1): 7-14.

Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, tibayrenc M, Soll DR. Parity among the amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 19997; 35: 2348-2358.

Quindós G, San Millán R, Robert R, Bernard C, Pontón J. Evaluation of Bichro-latex, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 1997; 35: 1263-1265.

Ray TL, Payne CD, Morrow BJ. *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidiasis. **Adv Exp Med Sci.** 1991; 306: 173-183.

Remold H, Fasolk H, Staib F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta.** 1968; 167: 399-406.

Robert R, Sentadreau R, Bernard C, Senet JM. Evaluation du reactif Bicholatex

albicans pour l'identification rapide de colonies de *Candida albicans*. **J Micol Med.** 1994; 4: 226-229.

Rodrigues JAO, Höfling JF, Tavares FCA, Duarte KMR, Gonçalves, R.B. & Azevedo, R.A.. Evaluation of biochemical and serological methods to identify and clustering yeast cells of oral *Candida* species by CHROMagar test, SDS-PAGE and ELISA. **Braz J Biol.** No prelo 2004.

Ross IK, De Bernardis F, Emerson G.W, Cassone A, Sullivan P.A. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant. **J Gen Microbiol.** 1990; 136: 687-694.

Ruchel R. Properties of purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta.** 1981; 695: 99-113.

Ruchel R, Uhleman K, Boning B. Secretion of acid proteinase by different species of the genus *Candida*. **Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig.** 1983; A255: 524-536.

Salkin IF, Land GA, Hurd NJ, Goldson PR, McGinnis MR. Evaluation of yeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. **J Clin Microbiol.** 1987; 25: 625-627.

Samaranayake LP, Huges A, MacFarlane TW. The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose. **J Med Microbiol.** 1984; 17: 13-22.

Samaranayake LP, Huges A, MacFarlane TW. **Oral candidosis.** 1990; p. 295.

Scott DE, Gause WC, Finkelman FD, Steinberg AD. Anti-CD3 antibody induces rapid expression of cytokine genes *in vivo*. **J Immunol.** 1990; 145: 2183-2188.

- Schaller M *et al.* Secreted aspartic proteinase (SAP) activity contributes to tissue damage in a model of a human oral candidosis. **Mol Microbiol.** 1999; 34(1): 169-180.
- Shimizu K, Kondoh Y, Tanaka K. Proteinase production and pathogenicity. **Microbiol and Immunol.** 1987; 31: 1045-1060.
- Shimizu MT. Enzimas hidrolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. **Rev Microbiol.** 1988; 19 (4): 442-445.
- Shimizu MT. **Produção de hialuronidase, condroitin sulfatase, proteinase e fosfolipase, por amostras de *Candida albicans* e sua correlação com virulência para camundongos inoculados experimentalmente** [Tese de Livre Docência]. São José dos Campos. UNESP/FOSJC; 1990.
- Shinoda T, Kaufman L, Padhye AA. Comparative evaluation of the iatron serological Candida check kit and the API 20C kit for the identification of medically important *Candida* species. **J Clin Microbiol.** 1981; 13: 513-518.
- Shulman M, Wilde CD, Kohler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature.** 1978; 276 (5685): 269-70.
- Taguchi M, Tsukiji M, Tsuchiya T. Rapid identification of yeast by serological methods. A combined serological and biological method. **Saboraudia.** 1979; 17: 185-191.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and sample application. **Proc Nat Acad Sci.** 1979; 76: 4350-4354.

- Tsuboi R, Kurita M, Negi M, Ogawa H. A specific inhibitor of keratinolytic proteinase from *Candida albicans* could inhibit cell growth of *Candida albicans*. **J Invest Dermatol.** 1985; 85: 438-440.
- Tsuboi R, Matsuda K, Ko IJ, Ogawa H. Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity and cell growth of *Candida albicans* in insoluble stratum corneum supplemented media. [Abstract 2679408] **Arch Dermatol Res.** 1989; 281 (5): 342-345.
- Vartivarian S, Smith BC. In **Candidiasis-pathogenesis, Diagnosis and Treatment.** (Bodey, G.P., Ed.) Raven Press, New York; 1993; 59-84.
- Vidotto V, Koga-Ito CY, Garramone A, Pontón J, Quindós G, Aoki S. Virulence factors, serotype distribution and adherence in *Candida albicans*. **Mycoses.** 1999; 42: 219.
- Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice **Bull WHO.** 1982; 53: 55-65.
- Wey *et al.* Hospital-acquired candidemia: the attributable mortality and excess length of stay. **Arch Int Med.** 1988; 148: 2642-2645.
- Wu T, Samaranayake LP. The expression of secretory aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **J Med Microbiol.** 1999; 48(8): 711-720.
- Zola H. Introduction. In: ZOLA, H. **Monoclonal Antibodies: The Second Generation.** Oxford: BIOS Scientific Publ, 1995; p. 205.

BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AJ, Pober, JS. **Imunologia celular e molecular**. 4^a ed. Ed. Revinter; 2002; p. 544.

Cecotti HM., Souza DD. **Teses e dissertações; manual de normalização da UNICAMP/FOP**. Piracicaba; 2003. p. 64.

Girello M. **Manual de orientação na elaboração das referências bibliográficas**. (Baseado na NBR 6023 de agosto de 2000, da ABNT). Piracicaba; 2001. p. 14.

Lacaz CS. **Candidiases**. E.P.U/EDUSP; 1980. p. 190.

Robbins SL, Kuma V, Cotran.RS. **Pathologic basis of disease**. 5^a ed. Philadelphia: Ed. WB Saunders Company; 1994. p. 1400.

Stryer L. **Bioquímica**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 1996. p. 1000.