



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Papel de anticorpos IgG na resposta contra *Cryptococcus neoformans* e SARS-CoV-2

Adrielle Veloso Caixeta

Brasília - DF
2023



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Papel de anticorpos IgG na resposta contra *Cryptococcus neoformans* e SARS-CoV-2

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Patologia Molecular.

Autora: Adrielle Veloso Caixeta

Orientador: Dr. André Moraes Nicola

Brasília - DF
2023

Adrielle Veloso Caixeta

Papel de anticorpos IgG na resposta contra *Cryptococcus neoformans* e SARS-CoV-2

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular.

Aprovada em: ____ de _____ de 2023.

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Moraes Nicola (Presidente)
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – UnB

Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira (Membro interno)
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – UnB

Prof. Dra. Juliana Aparecida Rizzo Balancin (Membro externo)
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Dra. Daniela de Stefani Marquez (Membro externo)
Centro Universitário Atenas – UniAtenas

Profa. Dra. Camila Guimarães de Freitas (Suplente)
Instituto Federal de Brasília – IFB

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

VV443p Veloso Caixeta, Adrielle
Papel de anticorpos IgG na resposta contra Cryptococcus
neoformans e SARS-CoV-2 / Adrielle Veloso Caixeta;
orientador Dr. André Moraes Nicola. -- Brasília, 2023.
137 p.

Tese (Doutorado em Patologia Molecular) -- Universidade de
Brasília, 2023.

1. Anticorpos monoclonais. 2. Imunoglobulina. 3.
Criptococose. 4. Plasmoterapia. 5. COVID-19. I. Moraes
Nicola, Dr. André, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Sandra e Geraldo, e
irmã Ayla, que tanto fizeram para
que eu estivesse aqui**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda sabedoria, força, resiliência, paciência, inteligência, determinação e fé durante essa trajetória. Essa fase me permitiu conhecer novos ensinamentos e me fez sentir diferentes emoções. Desde o início dessa jornada, minha vida pessoal e profissional foi transformada para melhor. Sou muito grata por ter chegado até aqui e por sentir que trilhei o caminho certo. Esse caminho me fez transcender e alcançar pessoas, lugares e pensamentos que modificaram o meu modo de enxergar a vida.

Agradeço imensamente ao meu orientador e professor Dr. André Moraes Nicola por me ensinar, me incentivar, acreditar no meu potencial e fazer parte da minha trajetória profissional de forma tão presente e com conselhos que edificaram minha vida. Sua hombridade, humildade, empatia, intelectualidade e capacidade fizeram com que essa etapa fosse de muitos aprendizados e conhecimentos. Durante meu doutorado enfrentei cenários de grandes dúvidas e inseguranças. Em todos os momentos em que eu pensei que não seria capaz, o prof. André de uma maneira humana e solidária trazia palavras de apoio e compartilhava seus aprendizados de vida que me ensinaram grandes lições. Além disso, não mediu esforços para proporcionar recursos e equipamentos para que pudessem facilitar nosso trabalho, mesmo em situações que pareciam impossíveis de darem certo. Diante de todas as incertezas que a pandemia nos trouxe, o prof. André sempre apresentou seu olhar positivo, buscando em primeiro lugar o bem estar do seu grupo e depois em uma nova maneira de contribuir com o seu conhecimento para a sociedade. Me fez aprender que a ciência, embora possua sua complexidade, deve ser acessível para alcançar a quem precise. Comecei a trabalhar com o prof. André no mestrado, em um momento delicado da minha vida em que ele me estendeu a mão. Hoje agradeço por esse novo rumo, Deus me guiou para o lado de excelentes pessoas e profissionais. Sinto uma gratidão eterna por tudo que o prof. André fez por mim e sei que nenhuma palavra será suficiente para expressar esse sentimento de gratidão e o respeito que sinto. O prof. André é uma referência de sucesso em todos os sentidos para mim e espero ter a oportunidade de aprender ainda mais com ele em futuros projetos.

Agradeço a minha parceira de laboratório e amiga de vida Diane Oliveira. Você foi e é uma base para mim desde o começo da minha carreira na pesquisa. Aos amigos Juan, Verenice, Natália, Jéssica, Amanda, Thaís, Cristiana que me apoiaram, me ensinaram, me instruíram, viveram momentos comigo no dia a dia.

Agradeço aos meus pais, Sandra e Geraldo. Mãe, sem o seu carinho, sua mão estendida para me ajudar e seu apoio nos momentos complicados, esse sonho não teria sido possível. Pai, obrigada por sempre cuidar da nossa família e nos proporcionar uma vida cheia de oportunidades, sem o seu incentivo e sua confiança esse momento seria muito mais difícil de ser alcançado. A minha irmã, que foi meu suporte de várias maneiras diferentes. Me ouviu em tantos momentos de angústia, secou minhas lágrimas em momentos de fragilidade, riu e sonhou junto comigo essa vitória. Obrigada por tanto, você é um presente para nossa família e especialmente na minha vida. A minha sobrinha Isabelle, que trouxe muitas alegrias no meu dia a dia. Foi um conforto ter sua pureza, ingenuidade e brincadeiras me trazendo paz. Belle, você é um dos maiores amores da minha vida.

Agradeço às pessoas especiais que fazem parte da minha vida e que sempre me auxiliaram de diferentes maneiras nessa caminhada. Matheus, Sabrina, Simone, Ângela. Aos amigos que não estão mais presentes nesse mundo Karina Gonçalves e Maurício Júnior. Vocês sempre torceram por mim e sei que estão muito felizes.

Agradeço a Universidade de Brasília, a CAPES por possibilitar essa oportunidade e disponibilizar auxílios financeiros e de equipamentos para a execução deste projeto.

Agradeço aos professores Hugo Paes, Maria Sueli Soares, Ildinete Silva, Patrícia Albuquerque, Marcus Teixeira. Todos vocês contribuíram para a minha qualificação e formação profissional. Ao prof. Dr. Arturo Casadevall por colaborar com seus projetos de grande relevância. E a todos que me acompanharam, torceram e desejaram junto comigo essa realização.

E mais uma vez, obrigada Deus por permitir que eu tenha chegado tão longe, além do que os meus pés imaginaram alcançar.

EPÍGRAFE

“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais”.

William Shakespeare

RESUMO

Anticorpos são glicoproteínas produzidas por linfócitos B na presença de antígenos. São divididos em cinco classes em humanos, sendo eles, IgA, IgE, IgG, IgM e IgD. Destas, as IgGs são as que se encontram em maior quantidade no soro. Podem ser subclassificados em isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em humanos e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos. Por sua ampla aplicação, a IgG é considerada a classe mais relevante para a terapêutica e a mais comum de ser produzida. Assim, a produção de anticorpos IgG em busca de tratamentos mais seguros e benéficos cresce em ritmo acelerado. Embora possuam muitas vantagens, sua utilização em terapias pode provocar efeitos deletérios, piora do prognóstico e até mesmo a morte de pacientes. Apesar da relevância clínica, esses efeitos ainda são pouco compreendidos. Dessa forma, analisar a estrutura e atividade de anticorpos IgG, além de verificar os riscos associados durante a sua aplicação, é fundamental para compreender e melhorar a eficácia e segurança de novos tratamentos. Neste intuito, foram desenvolvidos dois projetos abordando a análise da atividade de anticorpos IgG. Inicialmente, analisamos as respostas de anticorpos monoclonais (mAbs) 2H1 e 3E5 de isotipos IgG1 e IgG3, que têm como alvo o fungo *Cryptococcus neoformans*. Para isso, realizamos a produção de mAbs 2H1 e 3E5 híbridos com substituições nas porções CH1 e dobradiça. Neste projeto foi possível observar atividades de: opsonização por mAbs 3E5 híbridos aumentando a fagocitose de fungos *C. neoformans* por células J774.16; influência de mAbs 2H1 e 3E5 IgG1 e IgG3 híbridos na especificidade fina do anticorpo; e alteração do padrão de ligação de mAbs 3E5 IgG3 com dobradiça de IgG1 à cápsula de *C. neoformans*, modificando o padrão de ligação de puntiforme para anular. Durante o desenvolvimento deste projeto com *C. neoformans*, ocorreu a pandemia de COVID-19. A partir deste momento, optamos por expandir os estudos para entender o papel de anticorpos IgG na terapia de COVID-19, enfatizando na avaliação do risco de complicações por ADE no uso da plasmoterapia para COVID-19 em pacientes que estejam coinfectados com os vírus SARS-CoV-2 e DENV. Assim, como extensão de um ensaio clínico randomizado de fase IIa para tratamento da COVID-19, verificamos a quantidade de doadores de plasma convalescente para COVID-19 com sorologia IgG positiva para dengue em

Brasília-DF. Neste projeto, identificamos uma alta taxa de doadores com sorologia positiva para IgG de dengue em nossa região, podendo assim favorecer o desencadeamento de complicações por ADE em pacientes coinfetados que utilizem a plasmoterapia como tratamento da COVID-19. Além disso, observamos que a dificuldade no diagnóstico diferencial da COVID-19 e dengue afetam diretamente o uso seguro da plasmoterapia para COVID-19. Estas duas abordagens permitiram a descoberta de novas evidências que colaboram no desenvolvimento de mAbs seguros, contribuindo para o delineamento de novos tratamentos mais eficazes e seguros. Além disso, esses conhecimentos apoiam o importante alerta à comunidade científica sobre os possíveis riscos de complicações durante o uso de terapias que possuam anticorpos policlonais de soro humano em regiões onde a dengue é endêmica.

Palavras-chave: Plasmoterapia, Anticorpos monoclonais, Imunoglobulina, COVID-19, Criptococose.

ABSTRACT

Antibodies are glycoproteins produced by B lymphocytes in response to antigens. They are divided into five classes in humans: IgA, IgE, IgG, IgM, and IgD. Of these, IgG is found in the highest concentrations in serum. They can be subclassified into IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 isotypes in humans and IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 in mice. Due to its wide application, IgG is considered the most relevant class for therapeutics and the most produced isotype. Thus, the production of IgG antibodies as safer and more beneficial treatments is growing rapidly. Although they have many advantages, their use in therapy can cause harmful effects, worsen the prognosis, and even lead to patient deaths. Despite their clinical relevance, these effects are still poorly understood. Therefore, analyzing the structure and activity of IgG antibodies and verifying the risks associated with their application is fundamental to understanding and improving the effectiveness and safety of new treatments. To this end, two projects were developed addressing the activity of IgG antibodies. Initially, we analyzed the responses of monoclonal antibodies (mAbs) 2H1 and 3E5 of IgG1 and IgG3 isotypes, whose targets are the fungus *Cryptococcus neoformans*. To achieve this, we produced hybrid 2H1 and 3E5 mAbs with substitutions in the CH1 and hinge portions. In this project, we observed that these hybrid 3E5 mAbs were opsonic, increasing the phagocytosis of *C. neoformans* by J774.16 cells. We also determined the influence of hybrid 2H1 and 3E5 IgG1 and IgG3 mAbs on the fine specificity of the antibody. Finally, we also observed an alteration of the binding pattern of 3E5 IgG3 mAbs with an IgG1 hinge to the *C. neoformans* capsule, a modification that changed the binding pattern from punctate to annular. During the development of this *C. neoformans* project, the COVID-19 pandemic occurred. From this moment on, we chose to expand studies to understand the role of IgG antibodies in COVID-19 therapy, emphasizing the assessment of the risk of complications due to antibody-dependent enhancement (ADE) in the use of plasma therapy for COVID-19 in patients who are co-infected with the SARS-CoV-2 and DENV viruses. Thus, as an extension of a phase IIa randomized clinical trial for the treatment of COVID-19, we verified the number of COVID-19 convalescent plasma donors with positive IgG serology for dengue. In this project, we identified a high rate of donors with positive serology for

dengue IgG, which could theoretically trigger complications due to ADE in co-infected patients who use plasma therapy as a treatment for COVID-19. Furthermore, we observed that the difficulty in differential diagnosis of COVID-19 and dengue directly affects the safe use of plasma therapy for COVID-19. These two approaches led to new evidence that could contribute to developing safe and effective treatments. Furthermore, this knowledge raises an alert to the scientific community about the possible risks of using therapies containing polyclonal serum antibodies in patients from regions where dengue is endemic.

Keywords: Plasma therapy, Monoclonal antibodies, Immunoglobulin, COVID-19, Cryptococcosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de isotipos de anticorpos.....	28
Figura 2 - Estrutura de uma molécula de anticorpo	29
Figura 3 - Estrutura 3D de uma molécula de anticorpo.....	31
Figura 4 - Representação das subclasses de IgG e seus isômeros	32
Figura 5 - Componentes do polissacarídeo capsular	41
Figura 6 - Padrão de Imunofluorescência de anticorpos 2H1	47
Figura 7 - Esquema dos ensaios experimentais conduzidos neste projeto	52
Figura 8 - Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG1	53
Figura 9 - Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG3.....	54
Figura 10 - Mapa do vetor de expressão pFUSE2-CLlg-mk	54
Figura 11 - Absorbância média de mAbs 2H1 e 3E5 em ensaio de ligação à GXM da cápsula de <i>C. neoformans</i>	69
Figura 12 - Ensaio de validação da funcionalidade dos mAbs 3E5 híbridos por fagocitose.....	70
Figura 13 - Imagem representativa de células J774.16 com <i>C. neoformans</i> fagocitados.....	71
Figura 14 - Análise da ligação de mAbs 2H1 à GXM nativo de H99, GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de <i>cas1Δ</i>	72
Figura 15 - Análise da ligação de mAbs 3E5 à GXM nativo de H99, GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de <i>cas1Δ</i>	74
Figura 16 - Padrões de Imunofluorescência de mAbs 3E5	78
Figura 17 - Estrutura do SARS-CoV-2	94
Figura 18 - Vias de entrada do vírus SARS-CoV-2.....	95
Figura 19 - Resposta imune inata durante a infecção por dengue ADE e não ADE	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição de anticorpos 2H1 e 3E5	56
Tabela 2 - Concentração inicial de mAbs 2H1 a partir da co-transfecção de células CHODHFR-/-	64
Tabela 3 - Concentração total de mAbs 2H1 a partir da co-transfecção de células CHODHFR-/-	65
Tabela 4 - Concentração inicial de mAbs 3E5 obtidos a partir da co-transfecção de células NSO-BCL-2.	66
Tabela 5 - Concentração total de mAbs 3E5 obtidos a partir da co-transfecção de células NSO-BCL-2	66
Tabela 6 - Concentração de mAbs 3E5 controle.....	67
Tabela 7 - Concentração total de mAbs 3E5 obtidos a partir da co-transfecção de células ExpiCHO-S	68
Tabela 8 - Padrão de ligação de mAbs 2H1 e 3E5 híbridos em ensaio de Imunofluorescência.....	77
Tabela 9 - Sorologia de dengue dos doadores de plasma convalescente de COVID-19.....	114

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
ADCC	Do inglês: <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos)
ADCP	Do inglês: <i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i> (Fagocitose celular dependente de anticorpos)
ADCs	Do inglês: <i>Antibody Drug Conjugates</i> (Anticorpos conjugados a drogas)
ADE	Do inglês: <i>Antibody-Dependent Enhancement</i> (Amplificação mediada por anticorpo)
AIDS	Do inglês: <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
Atg5-Atg12	Do inglês: <i>autophagy related 5 e autophagy related 12</i> (Regulador de processo autofágico)
BCR	Do inglês: <i>B-cell receptor</i> (Receptores de linfócitos B)
BiTES	Do inglês: <i>Bi-specific T-cell engagers</i> (Acopladores de células T biespecíficas)
BSA	Do inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
bsAb	Do inglês: <i>Bispecific Antibody</i> (Anticorpos biespecíficos)
C	Capsídeo
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CAAE	Certificado de apresentação de Apreciação de Ética
CAmB	Do inglês: <i>Cochleated Amphotericin B</i> (Anfotericina B encocleada)
Cas1	Gene que codifica o grupo O-acetiltransferase
CCL2	Do inglês: <i>CC motif chemokine ligand 2</i> (Quimiocina (motivo CC) ligante 2)
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
CDR	Do inglês: <i>Complementarity-determining region</i> (Região determinante de complementariedade)
CH	Cadeia constante pesada de anticorpo

CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
CL	Cadeia constante leve de anticorpo
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COVID-19	Doença do Coronavírus 19
CXCL9	Do inglês: <i>CXC motif chemokine ligand 9</i> (Quimiocina (Motivo CXC) Ligante 9)
DAK	Do inglês: <i>Dihydroxyacetone kinase</i> (Diidroxiacetona quinase)
DAmB	Do inglês: <i>Deoxycholate amphotericin B</i> (Anfotericina B desoxicolato)
DENV	Vírus da dengue
DHFR	Diidrofolato Redutase
DMEM	Do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio de cultura)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Proteína do Envelope
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ELISA	Do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção enzimática)
EPS	Do inglês: <i>Exopolysaccharide</i> (Exopolissacarídeo)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo
Fc	Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)
Fc γ R	Receptores Fc gama
FDA	Do inglês: <i>Food and drug administration</i>
FR	Do inglês: <i>Framework</i> (Arcabouço)
GXM	Glucuronoxilomanana
GXMGal	Glicuronoxilomanogalactana
GXM-TT	GXM conjugado ao toxóide tetânico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HRAN	Hospital Regional da Asa Norte
HT	Hipoxantina/Timidina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina

IL	Interleucina
IMDM	Do inglês: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (meio de cultura)
IMGT	Do inglês: <i>International Immunogenetics Information System</i>
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gama
ISGs	Do inglês: <i>Interferon-stimulated gene</i> (Gene estimulado por interferon)
kb	Do inglês: <i>Kilobase</i> (Quilobase)
kDa	Do inglês: <i>Kilodalton</i> (Quilodalton)
LAmB	Do inglês: <i>Liposomal amphotericin B</i> (Anfotericina B Lipossomal)
LB	Meio <i>Luria Bertani</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LILRB1	Do inglês: <i>Leukocyte immunoglobulin like receptor B1</i> (Receptor B1 semelhante à Imunoglobulina Leucocitária)
M	Proteína M
mAbs	Anticorpos monoclonais
MCP-1	Do inglês: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (Proteína quimioatraente de monócitos-1)
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTX	Metotrexato
N	Proteína do Nucleocapsídeo
NF- κ B	Do inglês: <i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator de necrose tumoral <i>Kappa</i>)
ng	Nanograma
NHEJ	Do inglês: <i>Non-homologous end joining</i> (Junção de extremidade não homóloga)
NK	Do inglês: <i>Natural Killers</i>
NS	Proteínas não estruturais
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAbs	Anticorpos policlonais

PBS	Do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão salina fosfato)
PC	Plasma de convalescente
PnPP	Do inglês: <i>p-Nitrophenyl Phosphate</i> (Fosfato de p-nitrofenilo)
PRR	Do inglês: <i>Pattern recognition receptor</i> (Receptores de reconhecimento Padrão)
RAG	Do inglês: <i>Recombination Activation Gene</i> (Gene ativador de recombinação)
RBD	Do inglês: <i>receptor-binding domain</i> (domínio de ligação ao receptor)
RIDE	Região de Desenvolvimento Integrado do Distrito Federal
RIG-1/MDA-5	Do inglês: <i>Retinoic acid-inducible gene 1/Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i> (Gene 1 induzível pelo ácido retinóico e a proteína 5 associada a diferenciação do melanoma)
RPM	Rotações por minuto
RSS	Do inglês: <i>recombination signal sequences</i> (Sequência de sinal de recombinação específico)
RT-PCR	Do inglês: <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (Transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia de polimerase)
S	Glicoproteína <i>spike</i>
SARM	Do inglês: <i>Sterile-alpha armadillo motif</i>
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda do Coronavírus Grave 2
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS3	Do inglês: <i>Suppressor of cytokine signaling 3</i> (Supressor da sinalização de citocinas 3)
STAT1/JAK	Do inglês: <i>Signal transducer and activator of transcription 1/Janus kinase</i> (Via de sinalização Janus/Quinase-Transdutor de Sinal e ativador da Transcrição)
SYK	Do inglês: <i>Spleen tyrosine kinase</i> (Tirosina quinase do baço)
TANK	Ativador NF-κB associado à família TAF
TCR	Do inglês: <i>T-cell receptor</i> (Receptor de células T)

Th1	Do inglês: <i>T helper 1</i>
Th2	Do inglês: <i>T helper 2</i>
TLR	Do inglês: <i>Receptores Toll Like</i> (Receptores do tipo Toll)
TMPRSS2	Do inglês: <i>Transmembrane serine protease 2</i> (Protease de serina transmembranar tipo 2)
TNF α	Do inglês: <i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VH	Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo
VL	Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo
κ	Do inglês: <i>kappa</i>
λ	Lambda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - EFEITOS DAS REGIÕES CONSTANTES DE IGG1 E IGG3 NA LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MURINOS À CÁPSULA DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS	24
1 INTRODUÇÃO	27
1.1 ANTICORPOS	27
1.1.1 Estrutura	27
1.1.2 Subclasse IgG	32
1.1.3 IgGs humanos e IgGs murinos	34
1.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS	36
1.3 CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E CRIPTOCOCOSE	39
1.3.1 Fungo <i>Cryptococcus neoformans</i>	39
1.3.2 Fatores de virulência	40
1.3.3 Interação patógeno-hospedeiro	41
1.3.4 Epidemiologia da criptococose	43
1.3.5 Diagnóstico e Tratamento	44
1.4 ANTICORPOS MONOCLONAIS NA CRIPTOCOCOSE	45
2 OBJETIVOS	51
2.1 OBJETIVOS GERAIS	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3 METODOLOGIA	52
3.1 ESQUEMA DA METODOLOGIA PROPOSTA	52
3.2 VETORES E CLONES	53
3.3 DESENHO E SÍNTESE DE VETORES	55
3.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	57
3.5 PURIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS)	57
3.6 CEPAS FÚNGICAS	57
3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES	58
3.7.1 Ensaio de produção 1 de anticorpos monoclonais em células CHO DHFR-/-	58
3.7.2 Ensaio de produção 2 de anticorpos monoclonais em células NSO-BCL-2	59
3.7.3 Ensaio de produção 3 de anticorpos monoclonais em células ExpiCHO-S	59
3.8 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA	60
3.9 ENSAIO DE LIGAÇÃO DOS MABS 2H1 E 3E5 À GXM DA CÁPSULA DE <i>C. NEOFORMANS</i>	61
3.10 ENSAIO DE VALIDAÇÃO POR FAGOCITOSE DE <i>C. NEOFORMANS</i>	61
3.11 ENSAIO DE ANÁLISE DE LIGAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICO DOS MABS 2H1 E 3E5 POR ELISA	62
3.12 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE LIGAÇÃO IGG-CÁPSULA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	63
4 RESULTADOS	64
4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DE MABS 2H1 E 3E5	64
4.1.1 Ensaio de produção 1- Avaliação da produtividade de mAbs 2H1	64

4.1.2	Ensaio de produção 2- Avaliação da produtividade de mAbs 3E5	65
4.1.3	Ensaio de produção 3- Avaliação da produtividade de mAbs 3E5	67
4.2	ENSAIO DE LIGAÇÃO DOS MABS 2H1 E 3E5 À GXM DA CÁPSULA DE <i>C. NEOFORMANS</i>	68
4.3	ENSAIO DE FUNCIONALIDADE POR MEIO DE FAGOCITOSE	69
4.4	ANÁLISE DE LIGAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICO DOS MABS 2H1 E 3E5 POR ELISA	71
4.5	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS MABS 2H1 E 3E5 À GXM DA CÁPSULA DE <i>C. NEOFORMANS</i>	76
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÃO	87
CAPÍTULO 2: RISCO DE TRANSFUÇÃO DE PLASMA CONVALESCENTE COMO TERAPIA PARA COVID-19 ONDE A DENGUE É ENDÊMICA		
1	INTRODUÇÃO	91
1.1	CONTEXTO DO ENSAIO CLÍNICO COM PLASMA DE CONVALESCENTE DA COVID-19	91
1.2	COVID-19	91
1.2.1	Origem	91
1.2.2	Vírus SARS-CoV-2 e seu mecanismo de ação	92
1.2.3	Epidemiologia e Clínica	95
1.2.4	Diagnóstico e Tratamento	96
1.3	ANTICORPOS POLICLONAIS	98
1.4	TERAPIA COM PLASMA DE CONVALESCENTE PARA COVID-19	99
1.5	DENGUE E ADE	102
1.5.1	Epidemiologia e Clínica	102
1.5.2	Diagnóstico e tratamento	102
1.5.3	Vírus da Dengue	104
1.6	MECANISMO DE ADE ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO FC γ R	105
1.7	COINFEÇÃO DE DENGUE E COVID-19	107
2	OBJETIVOS	110
2.1	OBJETIVOS GERAIS	110
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	110
3	METODOLOGIA	111
3.1	SELEÇÃO DE DOADORES	111
3.2	TRIAGEM DOS DOADORES	111
3.3	COLETA DE SORO	111
3.4	TESTE DE SOROLOGIA PARA COVID-19	112
3.5	TESTES DE SOROLOGIA DE DENGUE	112
4	RESULTADOS	114
4.1	TESTE SOROLÓGICO PARA DENGUE DOS DOADORES DE PC	114
5	DISCUSSÃO	115
6	CONCLUSÃO	120

7	CONCLUSÃO GERAL	121
8	REFERÊNCIAS	122

INTRODUÇÃO A TESE

Durante a execução deste trabalho de doutorado ocorreram circunstâncias atípicas como a pandemia da COVID-19, que trouxe consigo diversas incertezas. O projeto inicial que estava sendo realizado desde o início de 2018, necessitou ser interrompido temporariamente no começo de 2020 por motivos de segurança. Diante da complexidade e importância que a doença da COVID-19 apresentou, o professor e orientador Dr. André Moraes Nicola e seu grupo, em associação com outros grupos de pesquisa, iniciaram estudos relacionados à COVID-19 que culminaram no desenvolvimento de um ensaio clínico randomizado de fase IIa. No intuito de analisar os benefícios da plasmoterapia e desenvolver sistemas de diagnóstico este trabalho gerou novos conhecimentos. Dessa forma, atuei neste em diversas vertentes, desde etapas de seleção de doadores até etapas relacionadas a experimentação. A partir desse ensaio, surgiram novas hipóteses que geraram o desenvolvimento de um segundo trabalho realizado entre 2020 e 2021. Após a autorização para a retomada das atividades presenciais o projeto inicial voltou a ser realizado confluindo em resultados importantes.

Assim, foram apresentados no decorrer desta tese dois temas de grande relevância que serão abordados em seções diferentes. O capítulo 1, que possui o título “Efeitos das regiões constantes de IgG1 e IgG3 na ligação de anticorpos murinos à cápsula de *Cryptococcus neoformans*”, abrange questões relacionadas a modificações das regiões constantes de anticorpos IgG1 e IgG3 e suas mudanças de atividade e ligação à cápsula de *C. neoformans*. O capítulo 2, cujo título é: “Risco de transfusão de plasma convalescente como terapia para COVID-19 onde a dengue é endêmica”, discorre acerca da possível ocorrência de complicações durante o uso da plasmoterapia para COVID-19 em pacientes coinfectados com SARS-COV-2/DENV em regiões com recursos limitados e endêmicos para dengue. Dessa forma, este documento versa sobre dois assuntos que possuem em comum a análise da atividade de anticorpos IgG na resposta contra os patógenos SARS-CoV-2 e *C. neoformans*.

CAPÍTULO 1 - EFEITOS DAS REGIÕES CONSTANTES DE IGG1 E IGG3 NA LIGAÇÃO DE ANTICORPOS MURINOS À CÁPSULA DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

RESUMO

A criptococose é uma doença de grande relevância clínica que acomete principalmente pessoas imunocomprometidas, como aquelas vivendo com HIV/AIDS. Por atravessar a barreira hematoencefálica, o fungo *Cryptococcus neoformans* pode provocar complicações como meningite grave, acarretando a morte de mais de 112 mil pessoas por ano. Os tratamentos existentes atualmente possuem limitações por apresentar resistência e toxicidade. Assim, a utilização de anticorpos monoclonais vem sendo estudados para terapia e diagnóstico da criptococose. Anticorpos 2H1 e 3E5 IgG1 e IgG3 com mesma região variável, mas com alterações nas regiões constantes têm demonstrado atividades diferentes contra *Cryptococcus neoformans*. No intuito de entender qual/quais partes da região constante é/são as responsáveis por tais modificações estruturais e funcionais, foram produzidos 10 anticorpos monoclonais híbridos, sendo 5 com trocas entre os isotipos 2H1 IgG1 e 2H1 IgG3 e 5 com trocas entre os isotipos 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. Foram produzidos 3 anticorpos monoclonais 2H1 IgG3 com alterações em 3 porções da região CH1 derivados de 2H1 IgG1 denominados de 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2 e 2H1 CH1F3; e 2 anticorpos monoclonais com modificação da região da dobradiça denominados de 2H1 IgG3 com dobradiça de IgG1 e 2H1 IgG1 com dobradiça de IgG3. Da mesma maneira, foram produzidos 5 anticorpos monoclonais 3E5 híbridos, sendo 3 anticorpos monoclonais 3E5 IgG3 com alterações em 3 porções da região CH1 derivados de 3E5 IgG1, denominados de 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2 e 3E5 CH1F3; e 2 anticorpos monoclonais com modificação da região da dobradiça denominados de 3E5 IgG3 com dobradiça de IgG1 e 3E5 IgG1 com dobradiça de IgG3. O desenvolvimento deste projeto evidenciou que: os anticorpos monoclonais 3E5 híbridos aumentaram a fagocitose de *C. neoformans* por células semelhantes a macrófagos J774.16; a região de CH1 e dobradiça podem afetar a região variável de anticorpos monoclonais 3E5 modificando sua especificidade fina; e quando trocada a dobradiça do mAb 3E5 IgG3 pela

dobradiça do anticorpo monoclonal 3E5 IgG1, seu padrão de ligação alterou de puntiforme para anular, indicando que a dobradiça de 3E5 IgG1 é necessária porém não suficiente para gerar tais mudanças na ligação do antígeno.

Palavras-chave: Imunologia, Criptococose, Imunoglobulina, Isotipo

ABSTRACT

Cryptococcosis is a disease of great clinical relevance that affects mainly immunocompromised people, such as those living with HIV/AIDS. Crossing the blood-brain barrier, the *Cryptococcus neoformans* fungus can cause complications such as severe meningitis, causing the death of more than 112,000 people a year. Current treatments have limitations due to their resistance and toxicity. Thus, monoclonal antibodies have been studied for the therapy and diagnosis of cryptococcosis. 2H1 and 3E5 IgG1 and IgG3 antibodies with the same variable region but with alterations in the constant regions have demonstrated different activities against *Cryptococcus neoformans*. To understand which parts of the constant region is/are responsible for such structural and functional modifications, 10 hybrid monoclonal antibodies were produced, 5 with changes between the 2H1 IgG1 and 2H1 IgG3 isotypes and 5 with changes between the 3E5 IgG1 and 3E5 IgG3 isotypes. Three 2H1 IgG3 monoclonal antibodies were produced with changes in 3 portions of the CH1 region derived from 2H1 IgG1 called 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, and 2H1 CH1F3; and 2 monoclonal antibodies with hinge region modification named 2H1 IgG3 with IgG1 hinge and 2H1 IgG1 with IgG3 hinge. In the same way, 5 hybrids monoclonal antibodies 3E5 were produced, 3 monoclonal antibodies 3E5 IgG3 with changes in 3 portions of the CH1 region derived from 3E5 IgG1, called 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, and 3E5 CH1F3; and 2 monoclonal antibodies with hinge region modifications named 3E5 IgG3 with IgG1 hinge and 3E5 IgG1 with IgG3 hinge. The development of this project showed that: the 3E5 hybrid monoclonal antibodies increased the phagocytosis of *C. neoformans* by macrophage-like J774.16 cells; the CH1 and hinge regions can affect the variable region of monoclonal antibodies 3E5 by modifying their fine specificity; and when the monoclonal antibody 3E5 IgG3 hinge was exchanged for the IgG1 counterpart, its binding pattern changed from punctate to annular, indicating that the 3E5 IgG1 hinge is necessary but not sufficient to generate such changes in antigen binding.

Keywords: Immunology, Cryptococcosis, Immunoglobulin, Isotype

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTICORPOS

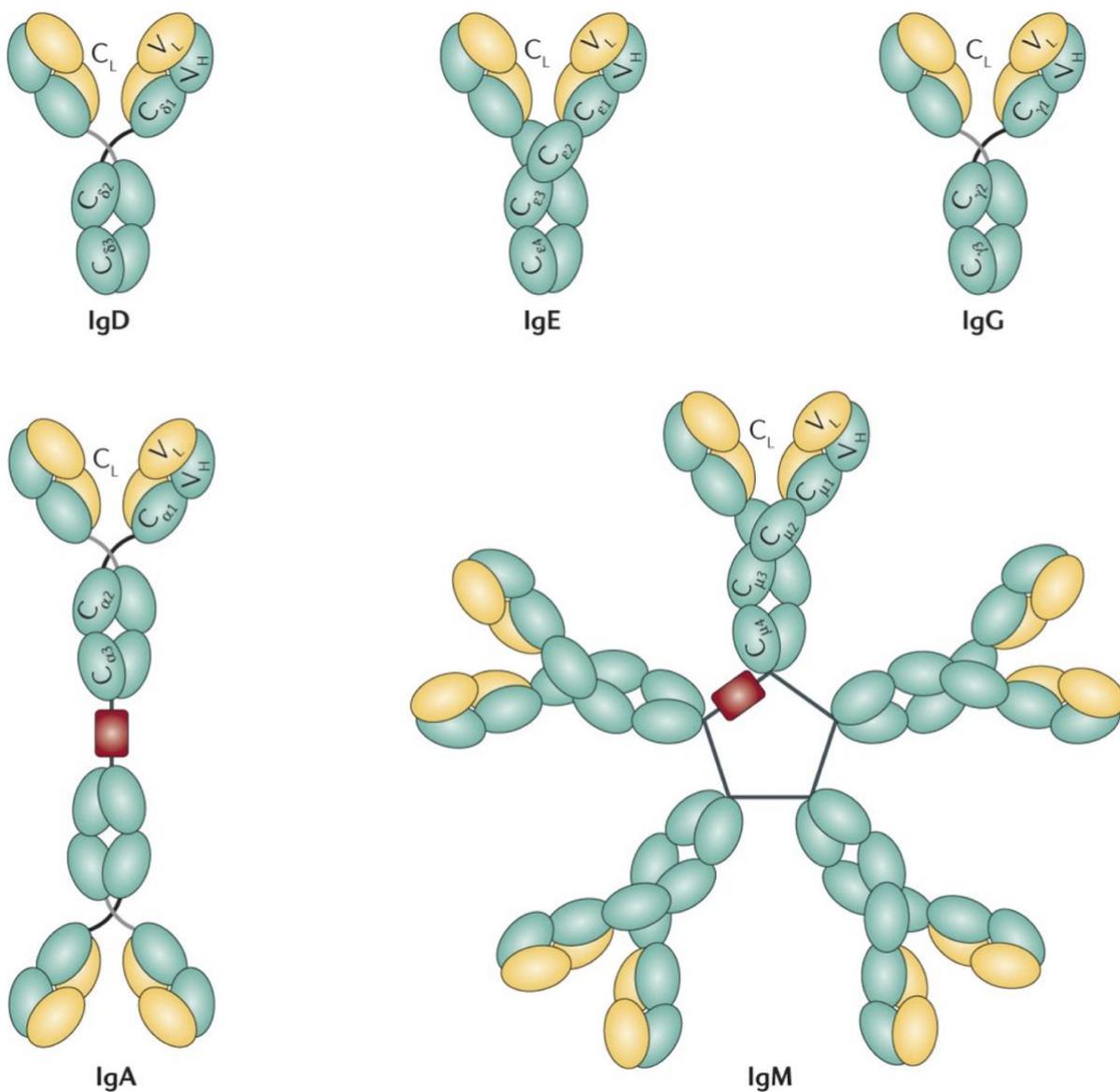
1.1.1 Estrutura

Anticorpos, também denominados imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas por linfócitos B, na presença de moléculas chamadas de antígenos. Por apresentar alta especificidade contra patógenos e substâncias estranhas não infecciosas, sua principal função consiste em mediar a resposta imune adquirida humoral (AZIZ; IHEANACHO; HASHMI, 2022). Os anticorpos podem ser encontrados tanto nas formas solúveis, quanto ancorados na membrana de linfócitos B, sendo nomeados de *B-cell receptor* (BCR). Os BCRs são produzidos durante a maturação do linfócito B e não dependem de estímulos antigênicos para sua formação. Estão envolvidos na transdução de sinal, no qual ocorrem alterações na oligomerização do receptor, ativação de células T auxiliares através da apresentação de antígenos e produção de citocinas. Além disso, quando o BCR reconhece um antígeno, ocorre a ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos permitindo a secreção de anticorpos solúveis nos fluidos corporais (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

Em humanos estão presentes cinco classes ou isotipos de anticorpos, sendo eles, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (ATTAELMANNAN; LEVINSON, 2000). Estes são formados por moléculas de aproximadamente 25 a 50 *Kilodalton* (kDa), que se juntam e formam uma grande estrutura denominada monômero, representado em forma de “Y”. Cada isotipo possui uma determinada quantidade de monômeros. Sendo que o IgG, IgE e IgD são monoméricos (1 monômero), IgA monomérico ou dimérico (1 - 2 monômeros) e IgM pentamérico (5 monômeros) (Figura 1). A estrutura básica do monômero consiste em 4 cadeias proteicas, sendo 2 cadeias leves e 2 cadeias pesadas, ligadas entre si por pontes dissulfeto e interações não-covalentes que contribuem para ligação das cadeias. Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas contêm regiões variáveis (N-terminal) e constantes (C-terminal). Cada cadeia leve possui um domínio variável denominado Variável Leve (VL) e um domínio constante denominado Constante Leve (CL). Já a cadeia pesada possui um domínio variável chamado de Variável Pesada (VH) e três a quatro domínios pesados

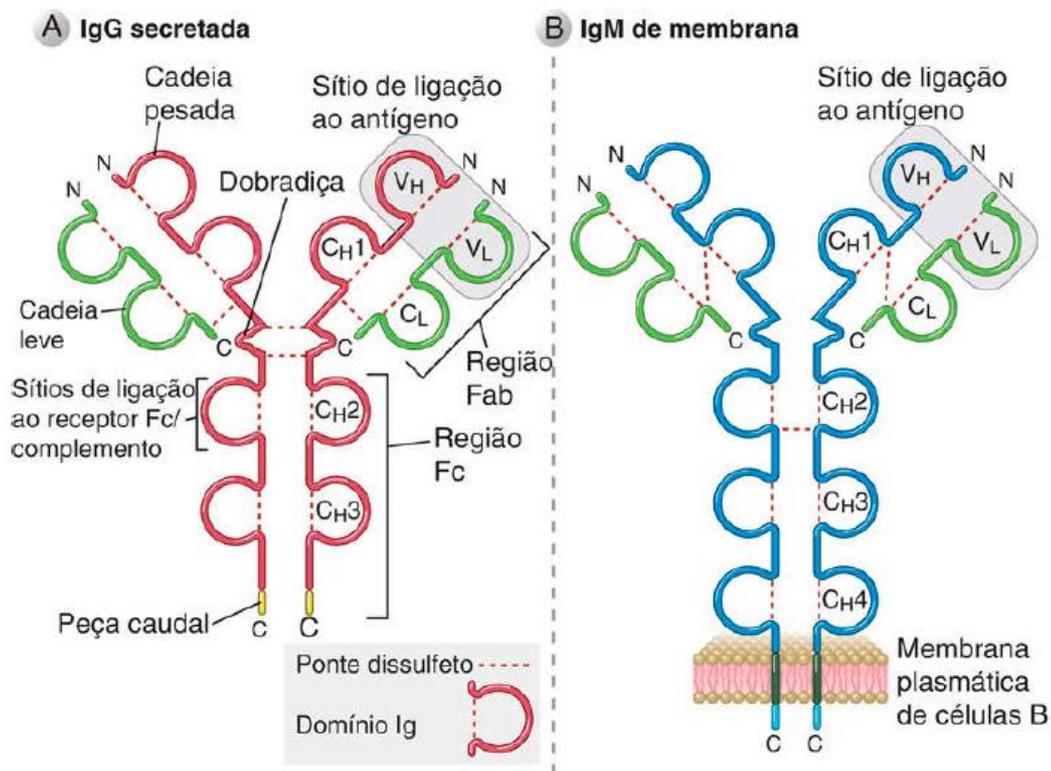
chamados de Constante Pesada 1, Constante Pesada 2 e Constante Pesada 3 (CH1, CH2 e CH3, respectivamente). No caso da imunoglobulina IgE e IgM possui a constante pesada 4 (CH4) (Figura 2) (MA; O'KENNEDY, 2015).

Figura 1 - Representação de isotipos de anticorpos



São mostradas IgD, IgE e IgG monoméricas, juntamente com as formas diméricas e pentaméricas de IgA e IgM. Esferas verdes representam cadeias pesadas, enquanto as amarelas cadeias leves. Quadrado vermelho representa a cadeia J. Fonte: Adaptado de (DUARTE, 2016).

Figura 2 - Estrutura de uma molécula de anticorpo



A) Diagrama esquemático de uma molécula de IgG secretada. Os sítios de ligação ao antígeno são formados pela justaposição dos domínios VL e VH. As regiões C da cadeia pesada terminam na parte caudal. Os locais de ligação do complemento e do receptor Fc estão em sítios dentro das regiões constantes da cadeia pesada CH2. B) Diagrama esquemático de uma molécula de IgM ligada à membrana na superfície de um linfócito B. A molécula de IgM possui um domínio CH a mais do que a IgG, denominado CH4, e a forma de membrana do anticorpo tem porções C-terminais transmembranares e citoplasmáticas que ancoram a molécula à membrana plasmática. Fonte: Adaptado e descrito em (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Os genes para a produção de cadeias pesadas e leves de receptores de antígenos em humanos estão agrupados no cromossomo 14 e 22/2, respectivamente. Nos mamíferos é possível encontrar dois tipos de cadeias leves denominadas cadeia *kappa* (κ) e *lambda* (λ) (MCBRIDE et al., 1982). Essas duas cadeias apresentam pequenas diferenças em suas sequências polipeptídicas. Seus tamanhos variam entre 25 e 30 kDa, consistindo em 210 e 220 resíduos de aminoácidos (BENGTÉN et al., 2000). Já as cadeias pesadas podem ser subdivididas em cadeia α , δ , ϵ , γ e μ , e são encontradas nos anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. As cadeias pesadas também diferem em seu tamanho e composição: α e γ contêm aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos, enquanto μ e ϵ têm cerca de 550 resíduos de aminoácidos. Como cada plasmócito produz apenas um tipo de cadeia

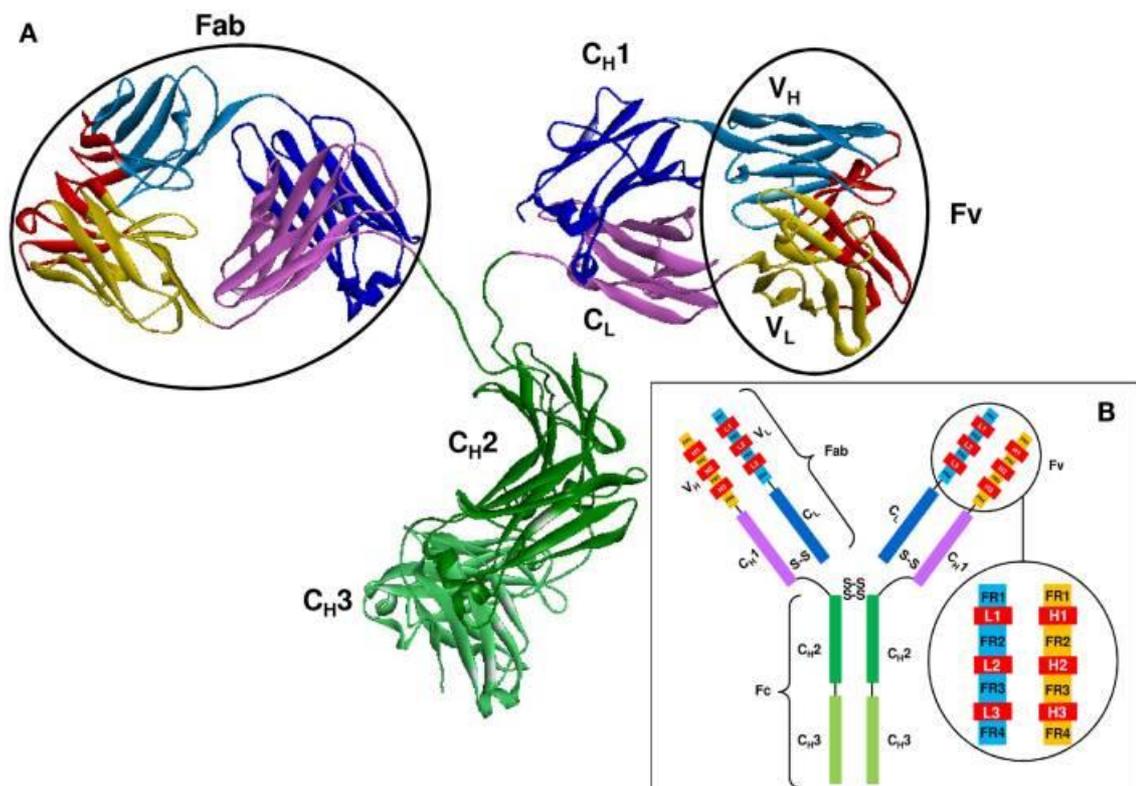
leve e um tipo de cadeia pesada, o rearranjo gênico permite produzir um grande repertório de receptores de superfície funcionais (ESPARVARINHA et al., 2017).

A variabilidade nos sítios de ligação do antígeno é alcançada pelo mecanismo de recombinação somática. Esse processo ocorre a partir da recombinação de segmentos gênicos chamados variável (V), diversidade (D) e junção (J). A região V da cadeia pesada é codificada pelos genes V_H , D_H e J_H , enquanto a região V da cadeia leve é codificada pelos genes V_L e J_L , com a ausência de segmentos D. O rearranjo das cadeias é mediado por recombinases denominadas *Recombination Activation Gene 1 e 2* (RAG1 e RAG2), de 1040 e 527 resíduos de aminoácidos, que realizam a clivagem do ácido desoxirribonucléico (DNA). A RAG1 reconhece e se liga a *recombination signal sequences* (RSS) que flanqueiam os segmentos V(D)J e cria quebras na fita simples de DNA entre a primeira base da RSS (logo antes do heptâmero) e o segmento codificante. A RAG2 parece ajudar na ativação da RAG1 para se ligar e clivar sequências específicas e aumentar sua capacidade de ligação ao DNA (CHI; LI; QIU, 2020). Uma infinidade desses RSS flanqueia as regiões V(D)J no cromossomo, permitindo uma grande variedade de possíveis rearranjos. Após a combinação desses segmentos ocorre o reparo do DNA pela via clássica *non-homologous end joining* (NHEJ), gerando um conjunto diverso de receptores de antígenos em linfócitos B e T em desenvolvimento. Este mecanismo resulta em novas sequências de aminoácidos de Igs e *T-cell receptor* (TCRs) únicas que possibilitam o reconhecimento de diversos epítomos antigênicos (ALT et al., 1992; CHRISTIE; FIJEN; ROTHENBERG, 2022).

A visão clássica da estrutura das Igs teve origem no estudo realizado por Rodney Porter (1957), que usou a digestão proteolítica no final dos anos 50 para separar a molécula de anticorpo IgG em fragmentos que acabaram sendo conhecidos como fragmento de ligação ao antígeno, ou (Fab), e domínio de fragmento cristalizável (Fc), assim chamado porque poderia ser facilmente cristalizado (PORTER; PRESS, 1957). Durante a digestão com a pepsina, foram obtidos dois fragmentos Fab que são unidos por pontes de dissulfeto e chamados de fragmentos $F(ab)_2$ (MESTECKY, 1972). A região Fab é dividida por dois domínios variáveis (VH e VL) e dois domínios constantes ($CH1$ e CL). Dentro de cada domínio variável estão seis *loops* hipervariáveis designados como *Complementarity-determining region* (CDR), sendo três na cadeia leve ($L1$, $L2$ e $L3$) e três na cadeia pesada ($H1$, $H2$ e

H3), suportados por *framework* (FR) conservada de folhas β . Nas associações das cadeias leve e pesada, os dois domínios variáveis dimerizam para formar o fragmento Fv que contém o sítio de ligação do antígeno, denominado paratopo, responsável por se ligar ao epítipo do antígeno. Outros domínios adicionais da cadeia pesada, CH2 e CH3, em determinados isotipos, compõem a região Fc. Esse fragmento foi obtido a partir da clivagem por papaína e é responsável por desempenhar funções efetoras, como ativação e interação do sistema complemento, opsonização, fagocitose e neutralização (Figura 3) (BURTON, 1990; SELA-CULANG et al., 2013). As regiões Fab e Fc são interligadas por uma região de dobradiça que conferem aos anticorpos maior flexibilidade. Essa região possui entre 10 e 60 resíduos de aminoácidos nos diferentes isotipos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Figura 3 - Estrutura 3D de uma molécula de anticorpo

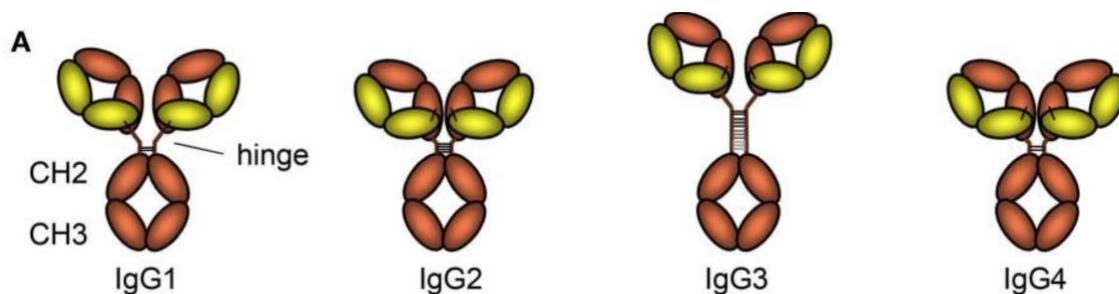


A) Região Fab e Fv (V_H e V_L) destacados em círculos. B) Representação esquemática dos três *loops* da cadeia leve (L1, L2 e L3) e três *loops* da cadeia pesada (H1, H2 e H3) das regiões CDRs do domínio variável. Fonte: (SELA-CULANG et al., 2013).

1.1.2 Subclasse IgG

De todas as classes de anticorpos, as IgGs são geralmente as que se encontram em maior quantidade no soro, possuindo uma meia-vida sérica mais longa. São menores em tamanho, possuindo um peso molecular de aproximadamente 146 a 170 kDa, facilitando sua difusão do sangue para os tecidos. Possuem características de neutralização, opsonização, fagocitose de patógenos e ativação do sistema complemento. Dada a sua funcionalidade versátil, é considerada a classe mais relevante para a terapêutica e a mais comum de ser produzida (ZHOU et al., 2020a). Em humanos, são subdivididas em quatro subclasses, sendo elas, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (Figura 4). Embora possuam 90% de semelhança na composição de seus aminoácidos, cada subclasse tem um perfil único com relação à ligação do antígeno, formação de imunocomplexos, ativação do complemento, ativação de células efectoras, meia-vida e transporte placentário. (DE TAEYE; RISPENS; VIDARSSON, 2019; VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014).

Figura 4 - Representação das subclasses de IgG e seus isômeros



A) As subclasses de IgG, indicando como as diferentes cadeias pesadas e leves estão ligadas, o comprimento da dobradiça (*hinge*) e o número de pontes dissulfeto conectando as duas cadeias pesadas. Fonte: Adaptado de (VIDARSSON; DEKKERS; RISPENS, 2014).

As subclasses IgG1 e IgG3 são bastante relevantes. Durante a aplicação da biotecnologia de anticorpos pode ser observado com frequência a mudança de isotipos. Essas modificações, muitas vezes ocasionam diferentes efeitos funcionais, podendo ser prejudiciais. Assim, entender os efeitos de mudança de isotipos se torna necessário para entender a fisiologia da resposta imunitária. A subclasse IgG1 é normalmente a mais abundante. Costuma ser induzida na presença de antígenos proteicos solúveis. Sua deficiência pode resultar em diminuição dos níveis totais de

IgG (hipogamaglobulinemia) e infecções recorrentes. A estrutura de sua dobradiça engloba cerca de 15 resíduos de aminoácidos e é muito flexível. Já os anticorpos IgG3 são particularmente eficazes na indução de funções efetoras, sendo um potente anticorpo pró-inflamatório. Além disso, é o sorotipo mais frequente contra carboidratos. Apesar disso, sua meia-vida mais curta, instabilidade, capacidade de formar agregados e potencial imunogenicidade, podem limitar sua utilização. É geralmente a primeira subclasse a se formar, seguida por respostas IgG1 e deficiência desta subclasse, tendem a provocar infecções recorrentes do trato respiratório superior. Possui uma região de dobradiça muito mais longa com cerca de quatro vezes o tamanho da dobradiça de IgG1, contendo até 62 resíduos de aminoácidos. Como consequência, os fragmentos Fab estão relativamente distantes do fragmento Fc, conferindo maior flexibilidade à molécula. A diferença na flexibilidade da dobradiça influencia a orientação relativa e as interações do domínio Fab e Fc do anticorpo. Essas diferenças afetam a capacidade de ligação ao antígeno e a formação de imunocomplexos. Também foi sugerido que a dobradiça relativamente longa de IgG3 torna o local de ligação de C1q (complemento) mais acessível, resultando em ativação do complemento mais eficiente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). O entendimento desses efeitos pode ajudar no desenvolvimento e direcionamento do uso seguro de anticorpos.

Além da flexibilidade, a funcionalidade desempenhada por anticorpos IgG são de extrema importância. A atividade biológica dessas moléculas depende da interação de sua porção Fc com sistemas efetores. Determinadas células do sistema imune como, células mielóides humanas, natural killers (NK) e algumas células linfóides expressam receptores Fc gama ($Fc\gamma R$). Os receptores $Fc\gamma R$ humanos são divididos em 6 tipos, sendo eles, $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$, $Fc\gamma RIIB$, $Fc\gamma RIIC$, $Fc\gamma RIIIA$ e $Fc\gamma RIIIB$, que diferem em sua distribuição celular, na afinidade de ligação a Fc de diferentes isotipos e função biológica. Estes receptores podem ter alta afinidade ou baixa afinidade. Os imunocomplexos IgG se ligam com alta avidéz tanto em $Fc\gamma Rs$ de alta afinidade quanto nos de baixa afinidade, porém, apenas os $Fc\gamma Rs$ de alta afinidade se ligam a IgG monomérica. Quando estes receptores detectam antígenos opsonizados por anticorpos, desencadeiam mecanismos efetores específicos após o reconhecimento e ligação a domínios Fc (BRUHNS et al., 2009; BRUHNS; JÖNSSON, 2015).

As funções efetoras, como *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e *Antibody-dependent cellular phagocytosis* (ADCP), diferem nas subclasses IgGs por conta de diferenças em suas regiões constantes, particularmente nas dobradiças e nos domínios superiores da região CH2. É nesta posição que está o local de ligação para os receptores C1q e Fc γ R presentes nas células efetoras do sistema imune inato. As subclasses IgG1 e IgG3 interagem eficientemente com a maioria dos Fc γ R, sendo fortes indutores desses mecanismos efetores. O anticorpo IgG1 tem maior afinidade de ligação ao Fc γ R, seguida por IgG3, IgG2 e IgG4. Além desses fatores de interação com receptores Fc, polimorfismos nas moléculas de IgGs e modificações pós-traducionais na forma de glicosilação também são responsáveis por afetar suas funções, pois são capazes de alterar a estrutura quaternária do Fc (YU; SONG; TIAN, 2020).

1.1.3 IgGs humanos e IgGs murinos

Os modelos murinos, grande parte das vezes, são utilizados para produção de anticorpos contra infecções específicas. Assim, podem ser gerados diversos anticorpos murinos de espécies diferentes. Estas novas moléculas são validadas e estudadas *in vitro* usando células humanas ou ainda *in vivo* em modelos murinos específicos, no intuito de verificar segurança, eficácia e toxicidade. Dessa forma, se faz necessário entender a correlação de anticorpos IgGs murinos e humanos e suas interações com receptores FcRs de diferentes espécies (WANG et al., 2022).

A IgG murina é diferente da IgG humana em vários aspectos, como sequência de aminoácidos, estrutura espacial, tipo de subclasse e glicofoma. Enquanto as IgGs humanas são compostas por quatro tipos de subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), os anticorpos IgGs murinos são subdivididos em IgG1, IgG2a/2c, IgG2b e IgG3. Os alótipos das subclasses de IgGs murinas podem ser diferentes de acordo com o modelo murino. Por exemplo, IgG2c foi observado no soro de camundongo C57BL/6, enquanto o soro de camundongo BALB/C tem IgG2a, mas não IgG2c. Além dessas diferenças, ocorrem ainda mudanças no padrão de glicosilação em IgGs. No caso de camundongos são produzidos IgGs principalmente com ácido N-glicolilneuramínico e em humanos é produzido apenas ácido N-acetilneuramínico. Outra alteração

importante é a presença de α -1,3-galactosilação, uma característica especial da glicosilação de IgG da região Fc murina. Essas alterações afetam diretamente suas funções efectoras e de interação com receptores e antígenos (HAN et al., 2020).

Referente às interações com receptores Fc γ Rs é importante elucidar que a maioria dos Fc γ Rs humanos tem o mesmo nome que os Fc γ Rs de camundongos. O locus Fc γ R humano contém 5 receptores Fc γ R ativadores (Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb) e 1 receptor inibitório (Fc γ RIIb). Já os camundongos têm 3 receptores de ativação (Fc γ RI, Fc γ RIII e Fc γ RIV) e um Fc γ R inibitório (Fc γ RIIb). Esses receptores são ortólogos dos Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa e Fc γ RIIb humanos, respectivamente. Embora suas afinidades relativas para IgG sejam geralmente semelhantes nas duas espécies, os receptores murinos diferem ligeiramente do sistema humano em nível de expressão e função. As subclasses de IgG humana IgG1, IgG3 e IgG4 parece se ligar a todos os Fc γ Rs murinos. Já os complexos IgGs de camundongo demonstraram menos interações com Fc γ Rs humanos. De forma específica, os anticorpos IgG1 e IgG2b de camundongo se ligam, predominantemente, a Fc γ RII e de forma mais fraca a Fc γ RI e Fc γ RIIb; IgG2a e IgG2c de camundongo se ligam em todos os Fc γ Rs, com exceção das variantes Fc γ RIIIb; e IgG3 podem se ligar no receptor Fc γ RI e de forma mais fraca ao Fc γ RIII (UNKELESS; SCIGLIANO; FREEDMAN, 1988; WANG et al., 2022).

Além dessas diferenças, os homólogos de Fc γ R entre humanos e camundongos não podem ser definidos apenas com base na sua função de ligação, mas também com base em sua expressão. Existem diferenças nos padrões de expressão de Fc γ R humano e de seu homólogo de camundongo. O primeiro deles é que a expressão de Fc γ RI de camundongo, diferentemente do humano, é restrita a células dendríticas; segundo a expressão de Fc γ RIIb humano, diferente do camundongo, é restrita principalmente a células B e basófilos e por último, a expressão de Fc γ RIIIa humano, mas não de camundongo, é restrita a células NK e monócitos/macrófagos. Portanto, outros aspectos além da similaridade de aminoácidos devem ser analisados na comparação entre anticorpos e receptores murinos e humanos. Todos esses fatores e diferenças são relevantes durante o desenvolvimento e teste de novos anticorpos utilizados para futuras terapias ou diagnóstico (BRUHNS, 2012).

1.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Devido a grande importância dos anticorpos dentro do sistema imune e com o avanço da biotecnologia, novas ferramentas vêm sendo utilizadas na imunologia molecular. Os anticorpos monoclonais são imunoglobulinas que possuem um alto grau de afinidade e especificidade (monoespecificidade) para um antígeno ou epítopo e são produzidos a partir da expansão de um único clone de células B. A primeira publicação descrevendo os anticorpos monoclonais foi em 1970. Contudo, apenas em 1984, Milstein e Kohler ganharam o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina, sendo os primeiros a serem capazes de produzir grandes quantidades de anticorpos monoclonais (mAbs) *in vivo*. A produção de mAbs foi possível a partir da aplicação da técnica denominada de hibridoma (CASTELLI; MCGONIGLE; HORNBY, 2019). Essa tecnologia consiste na fusão de linfócitos B do baço de camundongos imunizados com o antígeno desejado previamente inoculado. Esses linfócitos B são fundidos com células de mieloma gerando o chamado hibridoma, que tem a capacidade de se replicar indefinidamente, permitindo a geração de mAbs. Esta técnica permite selecionar mAbs específicos e de alta afinidade (ZHANG, 2012). Por ser bastante robusta e útil na descoberta de milhares de anticorpos para diferentes aplicações, mais de 90% dos anticorpos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (EUA) atualmente são gerados pela tecnologia tradicional de hibridoma (PARRAY et al., 2020).

Os mecanismos dos mAbs são diversos incluindo bloqueio ou impedimento estérico da função do antígeno alvo; citotoxicidade para a célula que expressa o antígeno alvo, ativação do complemento e imunomodulação (MALIK; GHATOL, 2022). Possui vantagens como alta afinidade, especificidade, reprodutibilidade, padronização e controle de qualidade. Além disso, a quantidade de anticorpos necessários para a imunização é menor em comparação com anticorpos policlonais (VASWANI; HAMILTON, 1998). Assim, a taxa de aprovação e a quantidade de mAbs disponíveis no mercado para o tratamento de várias doenças aumentou significativamente. Pesquisas analisando o mercado biofarmacêutico baseado em terapias com anticorpos demonstra que os investimentos nessa área podem chegar a US\$300 bilhões de dólares até 2025, constatando que o aumento desse mercado vem ocorrendo em ritmo acelerado (LU et al., 2020b).

Nas últimas décadas, os mAbs trouxeram uma transformação grandiosa como ferramenta científica para terapia em humanos. O primeiro anticorpo monoclonal a ser aprovado pela FDA foi o muromonab-CD3, um mAb murino, que foi usado como medicamento para a prevenção da rejeição de transplantes renais. Os mAbs iniciais de camundongos foram muito valiosos em pesquisas de laboratório e diagnóstico. Contudo, foram observados problemas como agentes terapêuticos humanos devido à ocorrência de reações imunes às proteínas estranhas de camundongos e desenvolvimento de anticorpos humanos anti-murinos (BREEDVELD, 2000). Portanto, os mecanismos de produção foram forçados a serem reavaliados e eventualmente substituídos por outras tecnologias, permitindo o desenvolvimento de anticorpos quiméricos, humanizados e totalmente humanos (HARDING et al., 2010; ISHIDA; IMAI, 2002).

Os mAbs quiméricos são anticorpos não humanos constituídos por domínios de diferentes espécies e foram a primeira melhoria projetada. Assim, utilizam a região variável murina, mas as cadeias pesadas e leves remanescentes são humanas. Essa técnica de engenharia genética permite o desenvolvimento de mAbs, aproximadamente, 65% humanos e 35% murinos. Embora possuam meia-vida maior e sejam mais tolerados em humanos, ainda podem gerar reações imunes. Podem ser identificados com nomes terminados em -ximab (rituximab, infliximab, cetuximab). O primeiro Mab quimérico, Rituximab, foi aprovado para o tratamento de linfoma de células B de baixo grau (KUROSAWA; LIN; OHTA, 2014; VAISMAN-MENTESH et al., 2020).

O desenvolvimento seguinte dos mAbs humanizados utiliza as regiões hipervariáveis murinas das cadeias leves e pesadas em uma estrutura de anticorpo humano. Isso resulta em moléculas que são aproximadamente 95% humanas, com tempo de meia-vida maior e menores chances de ocorrência de reações indesejadas. Apesar disso, a construção destes mAbs são mais complexos e repletos de limitações que dificultam sua utilização. Esses mAbs são identificados com nomes que terminam em -zumab (trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab) (BAYER, 2019; VASWANI; HAMILTON, 1998).

No intuito de reduzir essas limitações, foi desenvolvido ainda o mAb completamente humano, no qual o anticorpo é derivado de uma sequência de aminoácidos totalmente humana. Estes são criados utilizando animais geneticamente modificados portadores de genes de Ig humana. Esses transgenes incluem genes

das regiões variáveis, que permitem a recombinação e produção de anticorpos humanos. Nesse sentido, os genes endógenos de Ig do animal são silenciados, permitindo assim a produção de mAbs completamente humanos (HARDING et al., 2010). Estes mAbs costumam ser mais bem tolerados por serem menos antigênicos em humanos. Costumam ser identificados com nomes que terminam em -umab (ofatumumab, daratumumab, denosumab) (BAYER, 2019). O Humira (adalimumab) foi o primeiro anticorpo totalmente humano aprovado em 2002, para o tratamento da artrite reumatóide (SCHEINFELD, 2004).

Além dessas ferramentas, atualmente, novas técnicas de engenharia genética têm sido utilizadas para a criação de diferentes tipos de anticorpos. Os *Bispecific Antibody* (bsAb), por exemplo, descritos pela primeira vez por Nisonoff et al., são moléculas recombinantes criadas para reconhecer dois epítomos ou antígenos diferentes (LABRIJN et al., 2019; NISONOFF; WISSLER; LIPMAN, 1960). Por conta da sua multiespecificidade esses anticorpos possuem potencial para desempenhar funcionalidades diferentes das obtidas apenas com a mistura dos anticorpos monoespecíficos. Os bsAbs podem ser formados por pequenas proteínas ou grandes moléculas semelhantes à imunoglobulina G. Além disso, geralmente possuem efeito sinérgico por aumentar avidéz, resultando em um melhor benefício terapêutico. Essa tecnologia pode ser utilizada para recrutar células imunes, agregar receptores na superfície celular, diminuir a resistência a drogas e direcionar para o antígeno específico. Assim, essa classe se torna bastante interessante para pesquisa e desenvolvimento de bioterapêuticos (LABRIJN et al., 2019). Apesar disso, sua produção possui diversos desafios, como imunogenicidade e o pareamento heterogêneo das quatro cadeias em um único sistema de cultura de células. Essas limitações dificultam o controle de parâmetros como perfil de segurança, farmacocinética e eficácia do anticorpo (IWASAKI et al., 2023). Para resolver esses problemas, um número crescente de plataformas para produção de bsAb vem sendo projetados para satisfazer diferentes demandas clínicas (LI; ER SAW; SONG, 2020).

Outro sistema é o desenvolvimento de *Bi-specific T-cell engagers* (BiTEs), que são potenciais drogas imunológicas, nas quais direcionam linfócitos T contra células tumorais para tratar uma variedade de malignidades (WEI et al., 2022). Além desses, existem os *Antibody Drug Conjugates* (ADCs), que são imunoconjugados compostos por um mAb ligado a uma droga citotóxica desenhado para direcionar e entregar um determinado agente tóxico com ação já conhecida para um antígeno alvo expresso

na superfície de células. A maioria dos ADCs têm sido desenhados para aplicação oncológica, contudo, existe um grande interesse para o uso no tratamento de outras doenças (PETTINATO, 2021). Por exemplo, o uso de glicocorticóides conjugados a anticorpos para diminuir os efeitos sistêmicos indesejados têm sido estudados (BRANDISH et al., 2018; DRAGOVICH, 2022; SVENDSEN et al., 2017). Portanto, é notável que novas técnicas vêm sendo desenvolvidas e empregadas de forma a aumentar a aplicabilidade de mAbs (CHAU; STEEG; FIGG, 2019; KHONGORZUL et al., 2020).

1.3 **CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E CRIPTOCOCOSE**

1.3.1 Fungo *Cryptococcus neoformans*

O gênero *Cryptococcus* é conhecido há mais de 100 anos, sendo descrito pela primeira vez em 1894 (BAKTERIOL; 1894). Dentre as mais de 70 espécies incluídas, o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii* são os principais responsáveis por causar a doença de criptococose em humanos e animais. Podem ser divididos em subvariantes denominadas de sorotipo A, D, AD (*C. neoformans*) e sorotipo B, C (*C. gattii*) (KWON-CHUNG et al., 2014). O *C. neoformans* é um fungo ambiental e patógeno oportunista. Possui formato de uma levedura encapsulada e acomete principalmente pessoas imunocomprometidas, como pacientes convivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com transplantes de órgãos, neoplasias, dentre outros. Por possuir grande capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica é capaz de gerar complicações como meningite criptocócica, meningoencefalite e pneumonia (LEE et al., 2023).

C. neoformans geralmente se propaga mitoticamente na forma de levedura unicelular por brotamento. Através da reprodução sexuada, o fungo sofre transição morfológica de levedura para hifa. A formação das hifas permite a produção de esporos infecciosos tolerantes ao estresse. Podem ser encontrados em excretas de aves, animais domésticos ou selvagens, árvores, solo, ar, dentre outros (ZHAO; LIN, 2021). Sua infecção se inicia após a inalação de esporos e células de leveduras que são carregados para os pulmões. Posteriormente, podem se disseminar para várias

partes do corpo, como cérebro, rins e medula óssea através da corrente sanguínea, causando infecções graves (RATHORE et al., 2022).

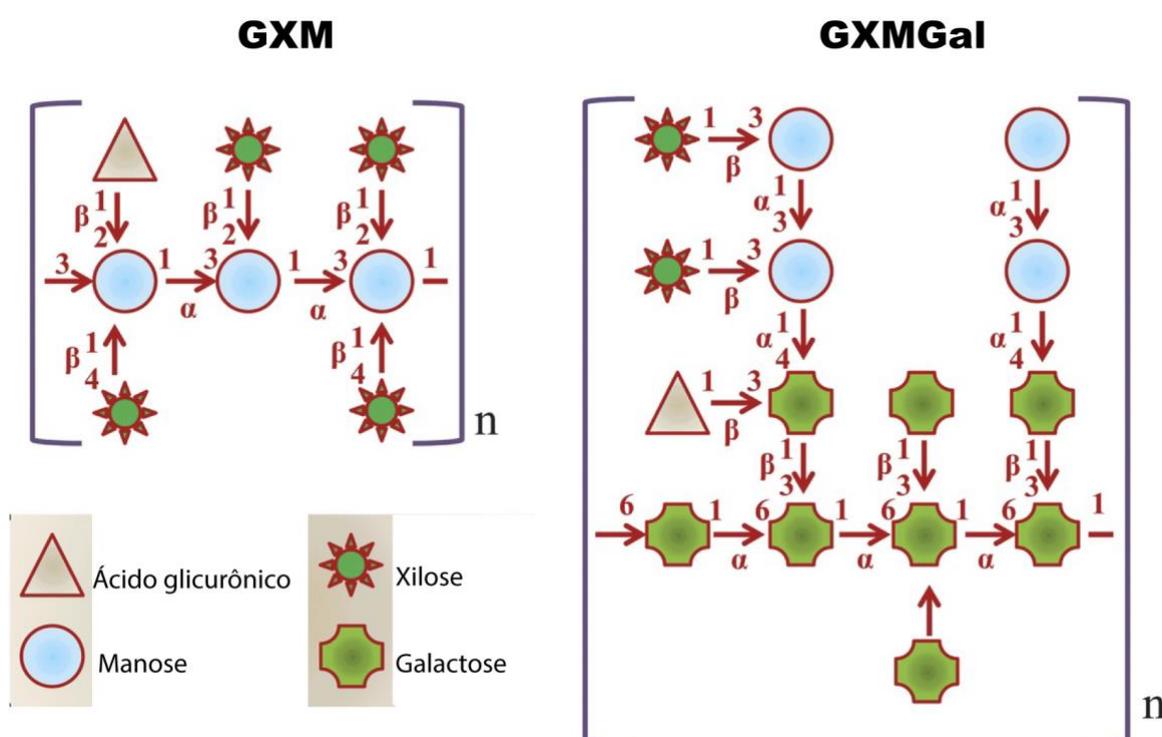
1.3.2 Fatores de virulência

A sobrevivência e disseminação do *C. neoformans* ocorre a partir da susceptibilidade do hospedeiro e fatores de virulência. Esses incluem mecanismos que permitem ao fungo sobreviver dentro do hospedeiro, resistir à ação imunológica e danificar o hospedeiro. Os principais fatores de virulência do *C. neoformans* são tolerância à temperatura do hospedeiro e aos níveis de CO₂, produção de melanina, urease e desenvolvimento de cápsula polissacarídica. Destes, o mais relevante e estudado é a cápsula, composta majoritariamente pelo polissacarídeo glucuronoxilomanana (GXM), e minoritariamente por glicuronoxilomanogalactana (GXMGal) e manoproteínas. Durante a infecção, a produção da cápsula é bastante alta e a virulência do fungo está associada à sua composição. Assim, cepas mutantes que possuem cápsula defeituosa mostram menos virulência em um modelo animal. Isso ocorre, pois, esses polissacarídeos presentes na superfície celular protegem *C. neoformans* do estresse e dos efeitos imunomoduladores do hospedeiro (COELHO; BOCCA; CASADEVALL, 2014; RATHORE et al., 2022).

O GXM da cápsula varia em sua composição de acordo com o sorotipo e constitui cerca de 90-95% de todo polissacarídeo capsular. Sua estrutura consiste em uma tríade composta por três resíduos de manose ligados entre si nas posições α -1,3. A cada três manoses existe uma substituição por um grupo de ácido glicurônico na posição β -1,2, além de cadeias laterais de xilose. Alguns resíduos de manose são 6-O-acetilados (até 60%) e essa O-acetilação desempenha um papel fundamental no reconhecimento imunológico de GXM por anticorpos. É possível notar que GXM tem considerável heterogeneidade (KUTTEL; CASADEVALL; OSCARSON, 2020). O GXM solúvel tem inúmeras atividades biológicas que podem contribuir para a patogênese da infecção, e altos níveis de GXM foram encontrados no soro de pacientes com criptococose (TISSI et al., 2004). Já o polissacarídeo GXMGal constitui cerca de 7% da massa capsular e tem estrutura mais elaborada do que GXM. Ele é construído a partir de polímeros de galactose ligado na posição α -1,6. Possui cadeias

laterais em resíduos de galactose alternados de diferentes comprimentos e resíduos galactosil, manosil e xilosil (Figura 5). Estes polissacarídeos exercem muitos efeitos imunorreguladores como alteração de migração de células imunes, inibição da liberação de citocinas, interferência na apresentação pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), alteração na proliferação de macrófagos e desencadeamento da apoptose. A presença de grande quantidade de GXM no soro de pacientes indicam um mal prognóstico (COELHO, 2014). As manoproteínas parecem estar envolvidas na indução da imunidade mediada por células e na produção de citocinas (BOSE et al., 2003). Dessa forma, esses polissacarídeos têm sido extensamente estudados como potenciais alvos terapêuticos.

Figura 5 - Componentes do polissacarídeo capsular



Estruturas dos polissacarídeos da cápsula. GXM- Esquema da estrutura do trímero repetitivo, mostrando os grupos laterais mais e menos substituídos. GXMGal - Esquema mostrando exemplos das cadeias laterais mais e menos substituídas no esqueleto da galactose. Fonte: Adaptado de (RATHORE et al., 2022).

1.3.3 Interação patógeno-hospedeiro

Um dos mecanismos afetados pela cápsula é a fagocitose, que é essencial para a defesa do hospedeiro. Este processo é mediado por receptores que levam à

internalização de partículas estranhas em células fagocíticas, provocando a sua destruição e remoção do organismo. Contudo, *C. neoformans* encapsulados têm a capacidade de inibir e imunomodular a fagocitose por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Macrófagos alveolares podem ser considerados a primeira defesa do hospedeiro contra o fungo. A modulação desse processo fagocitário pela cápsula é regulada não apenas por seu tamanho, mas também por sua estrutura e composição, presença ou ausência no soro e origem das células fagocitárias. A fagocitose dependente de complemento ocorre através do reconhecimento por receptores de complemento (CRs) CR1, CR3 e CR4 em células fagocíticas, de *C. neoformans* opsonizado. Já os fungos opsonizados por anticorpos ativam a fagocitose por meio de receptores Fc. Dessa forma, é necessária a opsonização do fungo para reconhecimento por receptores de complemento ou Fc γ R e ativação de células fagocíticas (LEVITZ; TABUNI, 1991; RATHORE et al., 2022).

Já dentro da célula, a levedura pode sobreviver dentro dos fagolisossomos por meio de vários mecanismos como a resistência às condições de estresse e indução do crescimento da cápsula. A partir daí os fagolisossomos podem se tornar permeáveis, liberando o polissacarídeo GXM e causando efeitos deletérios e imunomodulação. Com um crescimento descontrolado podem se disseminar para o ambiente externo infectando novas células por meio de transferência ou lise celular. Esse processo no qual o fungo é liberado sem afetar a viabilidade do macrófago é chamado de extrusão de fagossoma, exocitose não lítica ou vomocitose. Além disso, macrófagos podem se dividir formando dois novos macrófagos carregados de levedura ou ainda se fundir para formar um único macrófago grande contendo diversos fungos (DEL POETA, 2004).

A resposta imune mediada por anticorpos desempenha um papel fundamental para eliminar a infecção criptocócica. Enquanto em humanos e camundongos saudáveis são capazes de desenvolver anticorpos contra proteínas criptocócicas capsulares, pessoas imunocomprometidas possuem níveis séricos de IgM e IgG com ligação à GXM da cápsula mais baixa. Em soros coletados de crianças foi possível identificar anticorpos contra *C. neoformans* indicando que respostas imunes humorais em idade precoce podem acontecer diante da exposição ambiental ao fungo. Além disso, a administração passiva de anticorpos contra a cápsula reduz a carga fúngica e prolonga a sobrevivência de camundongos. Em pessoas imunocompetentes, os anticorpos da classe IgM suprimem a carga fúngica pulmonar e reduz a

suscetibilidade do hospedeiro a *C. neoformans*. Os anticorpos IgG agem dessa mesma forma, e ainda, aumentam a depuração do fungo por meio de células NK do baço. Além disso, os anticorpos também atuam como opsoninas para aumentar a captação fagocitária de *C. neoformans* e melhoram a resposta anti-criptocócica caso a resposta de linfócitos T estejam prejudicadas. No entanto, pesquisas têm revelado que a eficácia protetora dos anticorpos contra *C. neoformans* depende não só da classificação dos anticorpos, mas também da sua especificidade (ELSEGEINY; MARR; WILLIAMSON, 2018; GOLDMAN et al., 2001; MUKHERJEE et al., 1995; YANG et al., 2022; YUAN et al., 1995).

As citocinas também desempenham um papel importante na resposta imune desencadeada por *C. neoformans*. Quando um hospedeiro entra em contato com o fungo a resposta parece ser direcionada para um perfil pró-inflamatório do tipo *T helper 1* (Th1), caracterizado por produção de interleucinas (IL), como a IL-2, IL-12, IL-18; interferon gama ($IFN\gamma$) e *tumor necrosis factor alpha* (TNF α), aumentando a expressão de espécies reativas de oxigênio (EROs) por macrófagos, protegendo o indivíduo contra *C. neoformans*. Contudo, estudo experimental demonstrou uma resposta polarizada do tipo *T helper 2* (Th2) em camundongos, que é não protetora (LEOPOLD WAGER et al., 2016). As citocinas associadas à resposta Th2 são, principalmente, IL-4, IL-5 e IL-13, que acarretam o aumento da carga fúngica pulmonar e produção de eosinófilos pulmonares, bem como aumento da suscetibilidade do hospedeiro (LIU et al., 2020; WIESNER et al., 2015). Dessa forma, o desequilíbrio entre as respostas imunes do tipo Th1 e do tipo Th2 é um dos mecanismos pelos quais os *Cryptococcus* rompem a homeostase diminuindo a resposta do tipo Th1 e aumentam as respostas do tipo Th2, escapando das ações do sistema imunológico. Esses achados sugerem que a imunidade mediada por anticorpos e citocinas contra a infecção por *Cryptococcus* é um processo importante, porém complexo, no qual o fungo possui grande capacidade de sobrevivência e escape da vigilância imunológica (YANG et al., 2022).

1.3.4 Epidemiologia da criptococose

A estimativa da ocorrência de meningite criptocócica é de cerca de 152.000 novos casos anualmente, causando aproximadamente 112 mil mortes por ano no

mundo. A criptococose possui grande relevância clínica, sendo responsável por 19% da mortalidade relacionada à *Acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) (RAJASINGHAM et al., 2022). A criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em cerca de 4,4% dos casos de AIDS no Brasil. Predomina nas regiões, sul, sudeste e centro-oeste e é a segunda mais importante, no Brasil, dentre as infecções fúngicas (GOUVEIA et al., 2018). No Brasil, as micoses sistêmicas não são doenças de notificação, portanto não se tem dados precisos sobre sua incidência (BRASIL, 2023a). A introdução da criptococose como doença de notificação compulsória poderia ajudar na obtenção de dados de incidência e auxiliar no manejo dessas infecções (DO CARMO et al., 2022).

1.3.5 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico é baseado na observação de leveduras encapsuladas por meio de exame de histopatologia, por isolamento de *C. neoformans* ou *C. gattii* em cultura e pela presença de antígeno capsular no sobrenadante de vários fluidos corporais, como sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido pleural, secreções nasais, urina, lavagens brônquicas, medula óssea e pele (NEGRONI, 2012). O método de detecção de antígeno mais comumente usado é o teste de aglutinação em látex, mas o teste imunocromatográfico é também bastante utilizado. Além desses, a radiografia de tórax, tomografia computadorizada e ressonância magnética também são aplicados no diagnóstico. O teste sorológico para detecção de polissacarídeo criptocócico e diagnóstico de criptococose invasiva é específico e sensível, apresentando taxas maiores que 90%. Além disso, pode ser positivo antes da detecção do fungo por cultura. O sistema de detecção de antígeno tem sua maior aplicação com amostras de LCR e soro (PERFECT; CASADEVALL, 2002).

Os tratamentos atualmente disponíveis para a criptococose são limitados. Dos antifúngicos existentes apenas três classes, a saber, polienos (anfotericina B), flucitosina oral e azóis (fluconazol oral), são atualmente usadas para tratar a criptococose. A *Deoxycholate amphotericin B* (DAmB), é um potente fungicida de amplo espectro. Tem sido a terapia primária para a infecção criptocócica por mais de meio século. Liga-se ao ergosterol nas membranas das células fúngicas, induzindo a

formação de poros e provocando desequilíbrio eletrolítico e morte celular. Contudo, possuem desvantagens que vão desde a resistência, toxicidade e falta de disponibilidade em locais com menos recursos. Para reduzir a toxicidade foi desenvolvida uma formulação de anfotericina B constituída de uma camada dupla de lipossomas, a *liposomal amphotericin B* (LAmB), capaz de manter a atividade antifúngica. Entretanto, possui alto custo, necessidade de internação e profissionais qualificados, o que acaba limitando sua aplicação. Atualmente, é utilizada uma nova forma denominada de *Cochleated Amphotericin B* (CAmB), em que a anfotericina B é encapsulada em uma nanopartícula de cristal contendo lipídios. Possui eficácia ao ser entregue ao Sistema Nervoso Central (SNC) e apresenta atividade antifúngica em modelo de camundongo. Apesar disso, mais estudos para sua utilização devem ser realizados (IYER et al., 2021; NGAN; FLOWER; DAY, 2022).

Para mitigar os riscos de falha no tratamento, os protocolos e diretrizes sugerem o uso de antifúngicos em associação para tratamento dessa doença. A flucitosina inibe a síntese de DNA fúngico e tem um mecanismo fungistático, tornando seu efeito menos potente que a anfotericina. Assim, é comum seu uso em associação com DAmB como tratamento inicial para obtenção de efeito sinérgico. Já o fluconazol, também um antifúngico de amplo espectro, também pode ser utilizado como medicamento na manutenção da doença, apesar de não serem tão eficazes na eliminação de fungos do LCR (FIRACATIVE; TRILLES; MEYER, 2022). Diante dos poucos medicamentos existentes e suas limitações, fica nítida a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas como medicamentos, vacinas, imunoterapias e novas estratégias terapêuticas para o manejo criptococose (IYER et al., 2021).

1.4 ANTICORPOS MONOCLONAIS NA CRIPTOCOCOSE

Após a aplicação de tecnologias possibilitando a produção de mAbs, surgiu um grande interesse na sua utilização em micoses sistêmicas. Relacionados ao *C. neoformans*, um trabalho recente investiu na produção de mAbs IgM contra oligômeros de quitina da parede celular. Este demonstrou aumentar a capacidade fungicida da anfotericina B, além de interferir na formação de biofilme e produção de

melanina (FIGUEIREDO et al., 2021). Apesar da relevância clínica da criptococose, o desenvolvimento de pesquisas com mAbs para essa doença ainda é insuficiente.

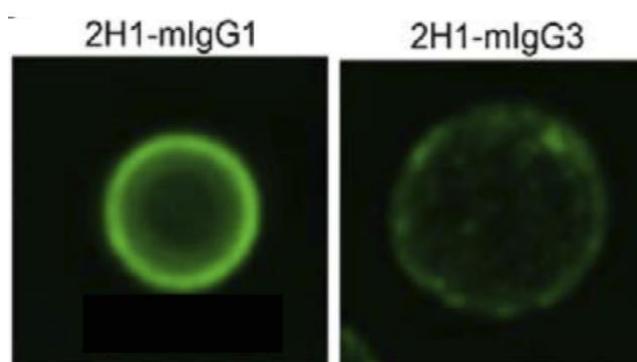
O grupo do Dr. Arturo Casadevall, atuando na *Johns Hopkins University*, nos EUA, vem estudando extensivamente o emprego de mAbs contra o polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*. Para isso, foram produzidos 22 mAbs de isotipos IgM, IgG3, IgG1 e IgA, a partir da imunização de camundongos com GXM do sorotipo A (H99) conjugado ao toxóide tetânico (GXM-TT) (CASADEVALL et al., 1992). Destes, quatro mAbs denominados 2D10 (IgM), 3E5 (IgG3), 2H1 (IgG1), e 18b9 (IgA) foram capazes de reconhecer o mesmo determinante antigênico em GXM, no qual estão presentes nos 4 sorotipos de *C. neoformans*. Foi observado ainda que esses anticorpos, originados de um único clone de células B, apresentavam os mesmos elementos genéticos de região variável, diferindo em sua região constante em poucos aminoácidos na região de CDR2, resultantes de mutações somáticas. Outro mAb de grande relevância é o denominado 18B7 (IgG1). Este é derivado de uma segunda célula B precursora, no qual apresenta região variável semelhante, mas não idêntica a 3E5 (MUKHERJEE; CASADEVALL; SCHARFF, 1993; MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992).

Alguns destes mAbs produzidos parecem mediar diversos efeitos contra *C. neoformans*. *In vitro*, podem promover a fagocitose (FELDMESSER; CASADEVALL, 1997); aumentar a atividade fungicida dos leucócitos (DIAMOND, 1974), aumentar a eficácia antifúngica de micróglia, monócitos e macrófagos (C. LEE et al., 1995; MUKHERJEE; FELDMESSER; CASADEVALL, 1996), aumentar a atividade fungistática das células NK e a geração de óxido nítrico (NO) de macrófagos murinos; promover a aglutinação de formas de levedura e provocar alterações estruturais na cápsula polissacarídica (ALVAREZ; SAYLOR; CASADEVALL, 2008). *In vivo* podem reduzir a contagem de fungos nos tecidos em infecções e o antígeno tecidual (MUKHERJEE et al., 1994a, 1994b); melhorar a resposta inflamatória; reduzir os pesos dos órgãos cerebrais; aumentar a eficácia da droga antifúngica na infecção e prolongar a sobrevivência (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1995; PIROFSKI; CASADEVALL, 1996).

Além desses efeitos, os mAbs gerados após experimentos *in vivo* demonstraram atividade protetora ou não protetora quando administrados em camundongos infectados por *C. neoformans* (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992). O isotipo do mAb parece estar relacionado ao padrão de

resposta. Os mAbs do isotipo IgG1 são altamente protetores, enquanto os mAbs do isotipo IgG3 demonstraram ser pouco protetores ou potencializadores da doença. O padrão de ligação desses mAbs ao polissacarídeo GXM da cápsula também apresentou grande relevância. Os mAbs que se ligam com padrão puntiforme foram consistentemente não protetores, enquanto os que apresentam padrão de ligação anular foram protetores (Figura 6) (MUKHERJEE et al., 1995). Do mesmo modo, a especificidade do epítipo (MUKHERJEE et al., 1995; NUSSBAUM et al., 1997) e a afinidade parecem ser determinantes da eficácia de proteção (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992). Dependendo da especificidade do anticorpo, mAbs anti-GXM podem bloquear, aumentar ou não ter efeito na ativação do complemento por *C. neoformans* encapsulados (NUSSBAUM et al., 1997).

Figura 6 - Padrão de Imunofluorescência de anticorpos 2H1



Imunofluorescência indireta de anticorpos 2H1. 2H1-mIgG1 mostrou padrão de fluorescência anular, enquanto 2H1-mIgG3 mostrou padrão puntiforme. Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA et al., 2022).

Do grupo de mAbs produzidos podemos destacar os denominados 2H1, 3E5 e 18B7. O mAb 2H1 IgG1 é um anticorpo protetivo que foi bastante caracterizado, sendo inicialmente o principal candidato a ensaios clínicos para utilização futura na terapia de criptococose. Sua administração demonstrou prolongar a sobrevivência de camundongo, diminuir a carga fúngica cerebral, pulmonar e níveis séricos de GXM (MUKHERJEE et al., 1994b). Do mesmo modo, quando em associação com a AmB, flucitosina e fluconazol apresentou eficácia maior do que os agentes isolados contra *C. neoformans* (MUKHERJEE et al., 1993, 1994a). Além disso, possui sua estrutura tridimensional bem resolvida (YOUNG et al., 1997). Contudo, problemas de agregação durante sua purificação impediram sua continuidade nos experimentos futuros (CASADEVALL et al., 1998).

Os mAbs 18B7 e 3E5 foram escolhidos para o desenvolvimento pré-clínico (CASADEVALL et al., 1998). O anticorpo quimérico 18B7 IgG1 (ch18B7) foi gerado a partir de um mAb IgG1 murino protetor e se liga fortemente ao polissacarídeo capsular GXM. Foi selecionado pois possui semelhanças moleculares com o mAb 2H1, além de apresentar uma conservação do local de ligação ao antígeno. Foi capaz de se ligar a todos os quatro sorotipos de *C. neoformans*, opsonizar os sorotipos A e D, aumentar a atividade antifúngica das células efectoras, ativar a via do complemento, eliminar antígeno criptocócico e prolongar a sobrevivência de camundongos infectados por *C. neoformans*. Além disso, não foi observado nenhuma reatividade com tecidos normais de humanos, ratos ou camundongos, toxicidade em macacos e problemas significativos durante a purificação (CASADEVALL et al., 1998; LETURCQ et al., 1996; ZEBEDEE et al., 1994).

O mAb 3E5 possui sua estrutura, afinidade e especificidade bem caracterizados como resultado de múltiplas técnicas (DAM et al., 2008; MCLEAN et al., 2002; TORRES et al., 2005, 2007). *In vivo*, o mAb 3E5 IgG3 não prolongou a sobrevivência nem reduziu a carga fúngica de órgãos. Mas de forma contrária, o IgG3 diminuiu a sobrevivência de camundongos, demonstrando uma atividade não protetora. Em contraste, a variante IgG1 de 3E5 prolongou significativamente a sobrevivência, reduziu as unidades formadoras de colônias de órgãos e reduziu o nível sérico de polissacarídeo antigênico em camundongos infectados, demonstrando atividade protetora. Esses dados se correlacionam com o padrão de ligação apresentados por esse par de mAbs. Enquanto o mAb 3E5 IgG3 se ligou a GXM da cápsula com padrão puntiforme (não protetor), o mAb 3E5 IgG1 se ligou a GXM da cápsula com padrão anular (protetor) (MUKHERJEE et al., 1995; NUSSBAUM et al., 1997; YUAN et al., 1995).

Da mesma maneira, em ensaio realizado foi possível caracterizar que o mAb 13F1 (IgM) (não protetor) estava distribuído por toda a cápsula de células de levedura com um padrão de fluorescência puntiforme, enquanto o mAb 12A1 (IgM) (protetor) produziu um padrão de fluorescência anular. Esse fato parece ocorrer pois a maior parte do mAb 13F1 é mantida dentro da cápsula em função do local de ligação do mAb. Dessa forma, a localização da ligação dos mAbs é um fator relevante para a determinação da função do mAb. Além disso, foram testados os padrões de ligação para *C. neoformans* do sorotipo A e D. O mAb 12A1 produziu um padrão anular em todas as cepas testadas, independentemente da classificação do sorotipo. Já o mAb

13F1 produziu padrão de ligação anular com todas as cepas do sorotipo A e padrão de ligação puntiforme com 19 das 20 cepas do sorotipo D. Esses dados indicam diferenças antigênicas qualitativas e quantitativas entre as cepas dos sorotipos A e D. Assim, o sorotipo do *C.neoformans* deve ser levado em consideração durante a aplicação dos mAbs para a criptococose (CLEARE; CASADEVALL, 1998).

Em relação à especificidade fina desse par de mAbs, a variante 3E5 IgG3 apresentou uma especificidade fina diferente para o polissacarídeo da cápsula de *C. neoformans*, do que outros isotipos IgG, apesar de possuírem regiões variáveis idênticas. Ensaio mostraram que o mAb 3E5 IgG3 apresentou afinidade maior ao GXM (de-O-acetilado) se comparado ao seu par IgG1. O fato de 3E5 IgG1 não se ligar ao polissacarídeo GXM de-O-acetilado capsular sugere que os grupos acetil do epítipo fazem parte da integridade estrutural do epítipo necessário para o reconhecimento por mAbs (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992). O O-acetil pode ajudar a fixar a conformação correta ou pode servir em ambas as funcionalidades (BELAY et al., 1997). Além desse achado, ensaios de competição de mAbs confirmaram também uma diferença de especificidade por mAbs 12A1 (IgM) e 13F1 (IgM) (MUKHERJEE et al., 1993, 1995). Isso indica que a região constante afeta a afinidade e especificidade fina para o antígeno, alterando assim a ideia de que apenas a região variável está relacionada com a ligação ao antígeno.

Esses achados contrastam com a definição de que a região variável e a região constante atuam de forma independente uma da outra e que apenas a região variável seja responsável pela especificidade e afinidade e a região constante pelas funções efetoras (JANDA et al., 2016; PORTER; PRESS, 1957). Estudos sugerem que existe uma interação entre a região variável e a região constante, na qual ocorre uma cooperatividade intramolecular ou alostérica entre as regiões constantes e variáveis do anticorpo (SU et al., 2018; YANG et al., 2017). Novos entendimentos apontam que a região da dobradiça pode estar relacionada nesse mecanismo de interação e alteração de especificidade e/ou afinidade (CHU et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022; SCHARF et al., 2001). Já é sabido que a mobilidade ou flexibilidade das porções F(ab) e Fc do anticorpo são controladas principalmente pela região dobradiça. Uma demonstração do impacto da dobradiça foi o estudo de Horgan que observou que sua deleção em IgG4 melhorou a afinidade do anticorpo (HORGAN; BROWN; PINCUS, 1993)

Outra região de grande relevância no entendimento da funcionalidade do anticorpo é o domínio CH1, o qual pode afetar a afinidade do anticorpo e sua especificidade. Pesquisa realizada com o mAb 2F5 IgA2 mostrou uma afinidade aprimorada para gp41 MPER (ZHAO et al., 2018). Estudo com base em mais de 100 estruturas cristalinas de domínios Fab do anticorpo, descobriu um efeito comum nesses anticorpos, mostrando que os *loops* da região CH1 sofrem uma flutuação significativa na ligação ao antígeno, podendo assim impor alterações estruturais ou cinéticas sobre o paratopo através da interface VH-CH1 (SELA-CULANG; ALON; OFRAN, 2012; ZHAO; NUSSINOV; MA, 2019). Existem ainda outras evidências no papel de CH1 na modulação da ligação ao antígeno, no qual 4 mAbs derivados da subclasse IgG2a e IgG3 exibiram diferentes propriedades cinéticas e termodinâmicas após ligação a um peptídeo monovalente, sendo identificado por análise de modelagem molecular três regiões no domínio CH1 com diferenças estruturais. Dessa forma, essas alterações no domínio CH1 poderiam resultar em isômeros estruturais desses mAbs com mudanças na cinética de interação e na ligação anticorpo-antígeno. Além disso, as mudanças nos aminoácidos nesta região poderiam gerar novas ligações eletrostáticas e hidrofóbicas, podendo assim alterar o paratopo na região variável (TORRES et al., 2007; TORRES; CASADEVALL, 2008). Todas essas observações fornecem assim evidências importantes no papel da região CH1 e dobradiça dos anticorpos na modulação da afinidade e especificidade (MOYO-GWETE et al., 2022; TUDOR et al., 2012).

Diante dos achados apresentados, modificar a região constante mantendo a região variável é fundamental no entendimento biotecnológico de anticorpos e na sua aplicação. Embora pesquisas realizadas indiquem que a região constante afeta a região variável, o mecanismo pelo qual essa/essas modificações acontecem e a/as regiões responsáveis por essas interações ainda não estão completamente compreendidos. Entender essas alterações permite o desenvolvimento de tratamentos e diagnósticos mais seguros e eficazes. Além disso, possibilita um melhor direcionamento na seleção e produção de anticorpos protetores em futuras vacinas, minimizando possíveis complicações durante terapias da criptococose e de outras doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar os efeitos das regiões constantes de IgG1 e IgG3 na ligação de anticorpos murinos à cápsula de *Cryptococcus neoformans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos deste trabalho foram:

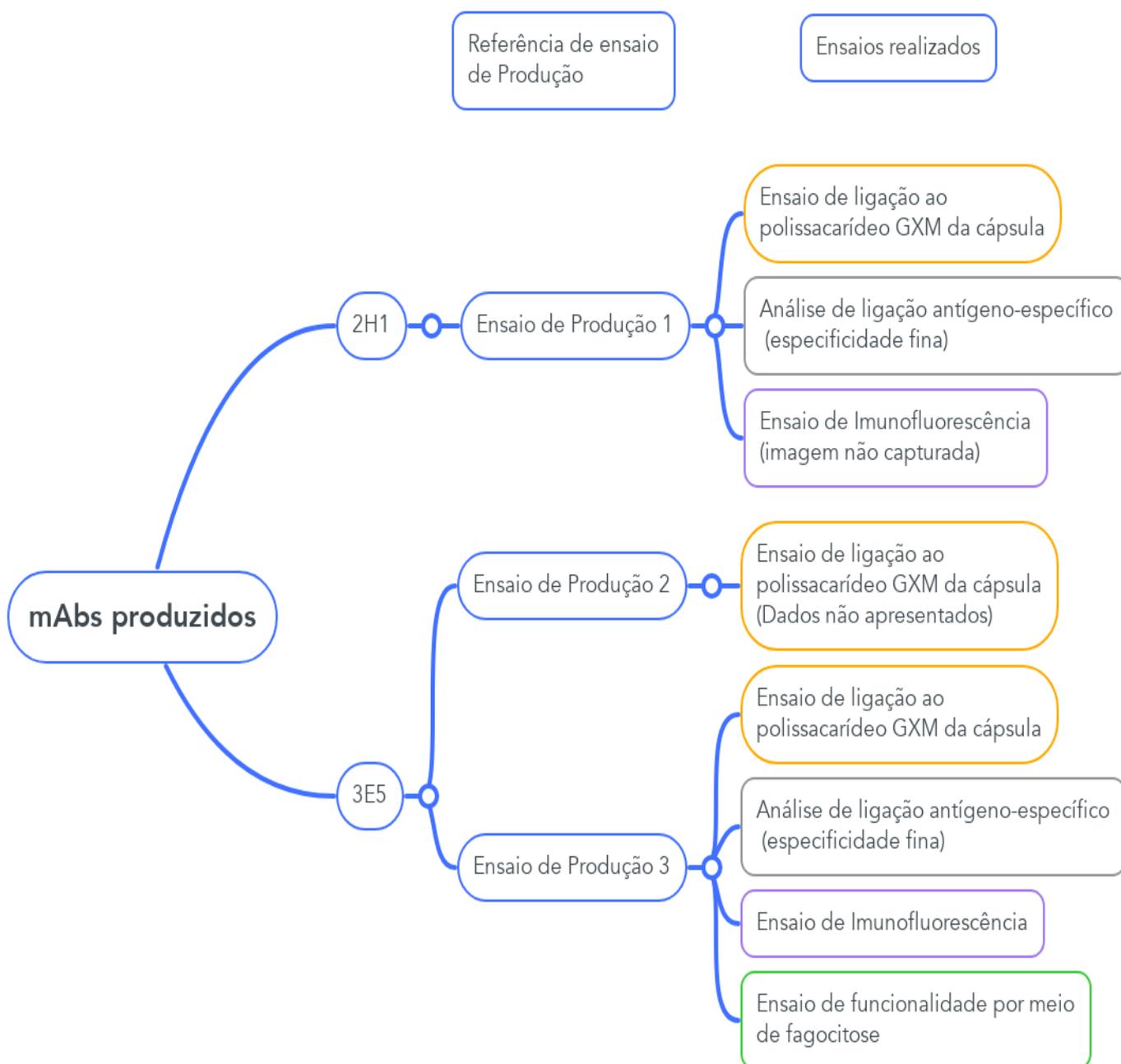
- Produzir mAbs 2H1 e 3E5 IgG1 e IgG3 híbridos;
- Verificar a funcionalidade dos mAbs produzidos;
- Analisar qual/quais regiões são responsáveis por alterar a especificidade fina dos mAbs;
- Identificar qual/quais regiões são as responsáveis por modificar o padrão de ligação ao polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*.

3 METODOLOGIA

3.1 ESQUEMA DA METODOLOGIA PROPOSTA

A Figura 7 apresenta o esquema da metodologia proposta para a realização deste projeto visando esclarecer os ensaios realizados para cada mAb produzido.

Figura 7 - Esquema dos ensaios experimentais conduzidos neste projeto



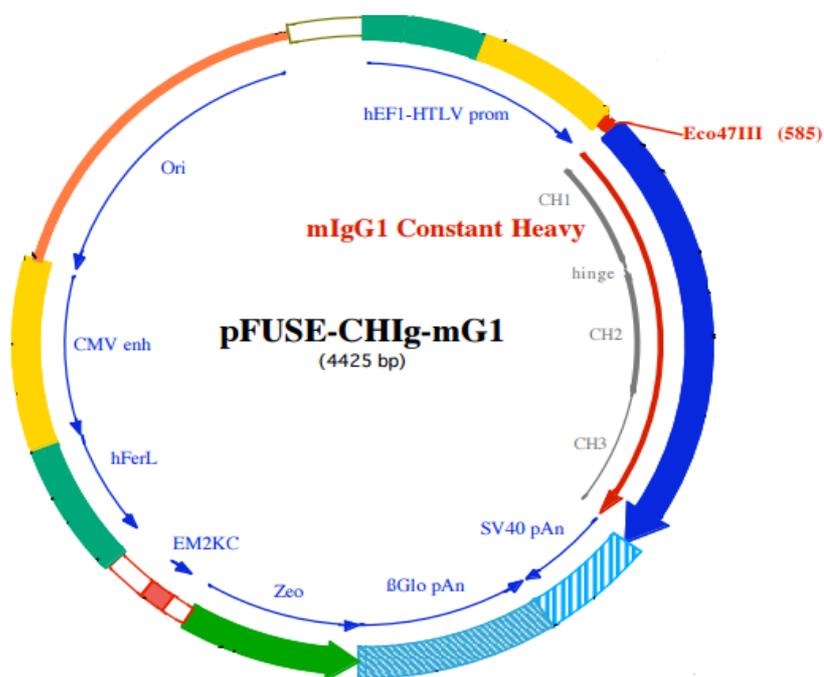
Balões azuis representam os mAbs produzidos e a referência de seu ensaio de produção. Os balões laranja, cinza, roxo e verde representam os ensaios aos quais os mAbs foram submetidos.

3.2 VETORES E CLONES

Originalmente, o mAb 3E5 IgG3 foi gerado por meio da técnica de hibridoma em resposta à imunização com a vacina GXM-TT (CASADEVALL; SCHARFF, 1991). Já a obtenção da variante com troca 3E5 IgG1, descrita no trabalho de Yuan e colaboradores, foi realizada por meio de técnicas de cultivo celular *in vitro* (YUAN et al., 1995).

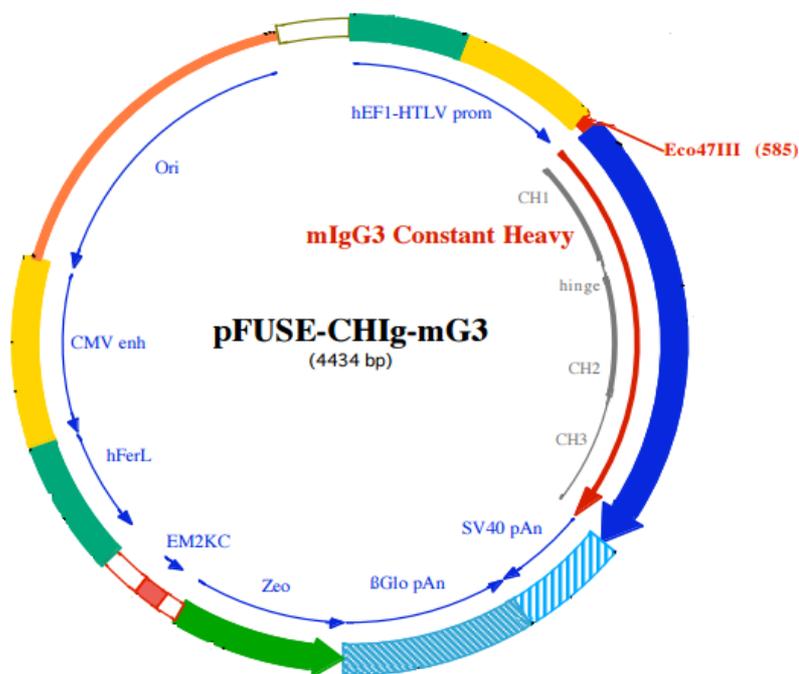
As clonagens das regiões variáveis VH e VL dos genes 2H1 em vetores pFUSE-CHlg-mG1 (Figura 8), pFUSE-CHlg-mG3 (Figura 9), pFUSE-CLlg-mK (*Invivogen*) (Figura 10) foram realizados anteriormente pelo grupo do professor Dr. André Moraes Nicola, Departamento de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília (OLIVEIRA, 2016).

Figura 8 - Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG1



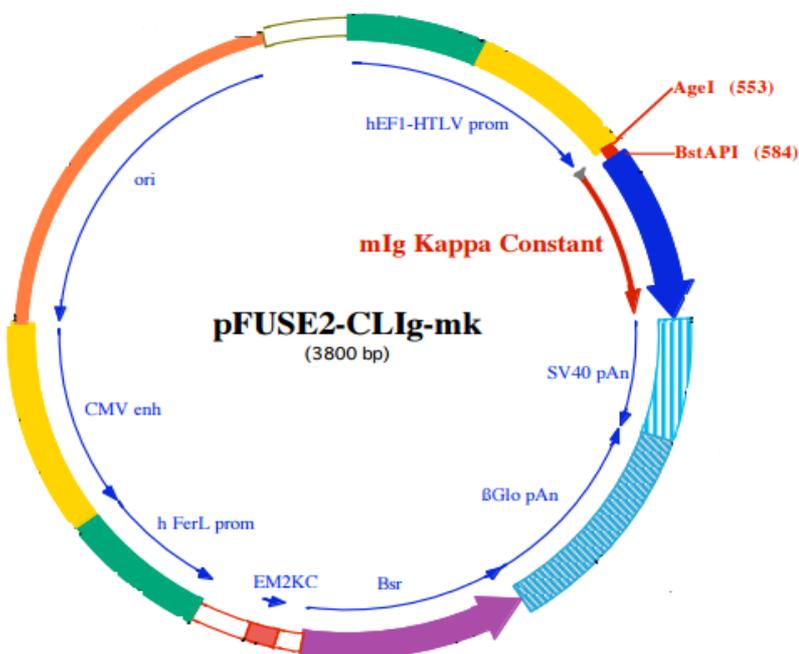
Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG1 por empresa (*Invivogen*) para clonagem dos insertos VH. Em verde claro, o sítio de resistência à zeocina. Em vermelho, o sítio de restrição Eco47III/AfeI (585).

Figura 9 - Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG3



Mapa do vetor de expressão pFUSE-CHlg-mG3 por empresa (*Invivogen*) para clonagem dos insertos VH. Em verde claro, o sítio de resistência à zeocina. Em vermelho, o sítio de restrição Eco47III/AfeI (585).

Figura 10 - Mapa do vetor de expressão pFUSE2-CLlg-mk



Mapa do vetor de expressão pFUSE2-CLlg-mk por empresa (*Invivogen*) para clonagem dos insertos VL. Em vermelho, os sítios de restrição AgeI (553) e BstAPI (584).

3.3 DESENHO E SÍNTESE DE VETORES

Foram realizados ensaios com o objetivo de analisar qual região da cadeia pesada seria de fundamental importância na alteração do padrão de ligação à GXM da cápsula de *C. neoformans* e da especificidade do paratopo dos anticorpos. Nesse intuito foi executado anteriormente pelo nosso grupo, uma análise no banco de dados *International IMunoGeneTics Information System* (IMGT). Dessa forma, o domínio CH1 foi separado em 3 porções com maior variabilidade, sendo estas denominadas de: F1 (KTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM), F2 (TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSD) e F3 (LYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDDK) de CH1 IgG1; F1 (TTTAPSVYPLVPGCSDTSGSS), F2 (KWNYGALSSGVRTVSSVLQSG) e F3 (FYSLSSLVTVPSSTWPSQTVICNVAHPASKTELIK) de CH1 IgG3; e “D” é a sequência de dobradiça originada de mG1 (VPRDCGCKPCICT) ou de mG3 (EPRIPKPSTPPGSSCP). A partir dessa análise inicial, foram geradas 5 moléculas de DNA recombinantes pela empresa *Genewiz*, EUA, denominados: 2H1 CH1F1 IgG3, 2H1 CH1F2 IgG3, 2H1 CH1F3 IgG3, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1 IgG3 com D de IgG1. Além destes, foram gerados ainda 5 moléculas de DNA recombinantes de 3E5, pela empresa *Genscript*, EUA, denominados: 3E5 CH1F1 IgG3, 3E5 CH1F2 IgG3, 3E5 CH1F3 IgG3, 3E5 IgG1 com D de IgG3, 3E5 IgG3 com D de IgG1, 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3 (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição de anticorpos 2H1 e 3E5

Nomenclatura do anticorpo	Local de substituição do anticorpo híbrido	Isotipo
2H1 CH1F1	Adição de F1 de CH1 do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 CH1F2	Adição de F2 de CH1 do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 CH1F3	Adição de F3 de CH1 do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 IgG3 com D de IgG1	Adição de Dobradiça do anticorpo 2H1 IgG1	IgG3
2H1 IgG1 com D de IgG3	Adição de Dobradiça do anticorpo 2H1 IgG3	IgG1
2H1 IgG1	Sem alterações	IgG1
2H1 IgG3	Sem alterações	IgG3
3E5 CH1F1	Adição de F1 de CH1 do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 CH1F2	Adição de F2 de CH1 do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 CH1F3	Adição de F3 de CH1 do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 IgG3 com D de IgG1	Adição de Dobradiça do anticorpo 3E5 IgG1	IgG3
3E5 IgG1 com D de IgG3	Adição de Dobradiça do anticorpo 3E5 IgG3	IgG1
3E5 IgG1	Sem alterações	IgG1
3E5 IgG3	Sem alterações	IgG3

Descrição de anticorpos 2H1 e 3E5. Na tabela estão apresentadas as terminologias empregadas neste trabalho para os mAbs, o local exato da substituição de fragmentos e a identificação referente ao isotipo.

3.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Os quatorze vetores descritos na tabela 1 foram transformados em *E. coli* DH5 α termocompetentes e plaqueados em meio *Luria Bertani* (LB) sólido com 25 $\mu\text{g/mL}$ de ZeocinaTM (*Invitrogen*) para seleção de clones de cadeia pesada; e com 50 $\mu\text{g/mL}$ de Blasticidina para seleção de clones de cadeia leve. As colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido por até 16h a 37°C sob agitação. A purificação dos plasmídeos por lise alcalina foi realizada por meio do kit “*GenEluteTM HP Plasmid Miniprep Kit*” ou “*GenEluteTM Endotoxin free Plasmid Midiprep Kit*” (*Sigma Life Sciences*), seguindo descrição do fabricante. A qualidade da purificação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% e a quantificação pelo método de espectrofotometria no equipamento *Nanodrop 2000C* (*Thermo Scientific*).

3.5 PURIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS)

Os fungos H99 (sorotipo A) e *knockout Cas1 (cas1 Δ)* foram cultivados em meio mínimo por cinco dias. As células foram removidas por centrifugação e filtração, e os sobrenadantes concentrados por ultrafiltração com uma membrana de 100 kDa (*Millipore*) (NIMRICHTER et al., 2007). A camada viscosa contendo EPS foi coletada e dialisada contra água destilada. O EPS foi então liofilizado, pesado e dissolvido em água ultrapura. H99 EPS foi de-O-acetilado por hidrólise alcalina em hidróxido de amônio (pH 11,25-11,50) durante a noite (KOZEL, 1983; TORRES et al., 2005).

3.6 CEPAS FÚNGICAS

Para o sucesso do projeto proposto foi utilizado o tipo selvagem H99 (sorotipo A) e as cepas mutantes *cas1 Δ* de *C. neoformans*. O gene Cas1 é responsável por codificar uma enzima denominada O-acetiltransferase, que é necessária para a acetilação de polissacarídeos capsulares (YUAN et al., 1998). As células de levedura foram mantidas em placas de ágar *Sabouraud* e cultivadas em caldo *Sabouraud dextrose (HimediaTM)* ou meio mínimo (0,3% de glicose, 13 mM de glicina, 29,4 mM

de KH_2PO_4 , 10 mM de MgSO_4 , 3 μM de tiamina, pH 5,5) a 30°C em agitação por 2 dias. Para sua utilização esses fungos foram lavados com *Phosphate buffered saline* (PBS) e contados em câmaras de *Neubauer*.

3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

3.7.1 Ensaio de produção 1 de anticorpos monoclonais em células CHO DHFR-/-

O ensaio teve como objetivo final a produção de mAbs 2H1 híbridos. Para isso, foram escolhidas células de Ovário de Hamster Chinês (CHO/dhFr-/-[CHO duk-, Nota: dhfr refere-se a diidrofolato redutase] ATCC® CRL-9076™) aderentes. As células foram cultivadas em placa de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 com meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM/ *Gibco*® by *life technology*), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% inativado e *Hypoxanthine/Thymidine* (HT) 1X até a quantidade final de 1×10^5 células por poço. Estas foram co-transfectadas com plasmídeos codificando cadeia pesada e cadeia leve dos mAbs 2H1 híbridos. Para isso, foram utilizados lipídeos catiônicos Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*) em meio OptiPRO (*Gibco*), seguindo instruções do fabricante, na proporção DNA (ng):reagente (μL) 1:1. Além disso, foi adicionado o plasmídeo DHFR na proporção de 1:100 ng (DHFR/ DNA Total). Após 72 horas da co-transfecção foram adicionados os antibióticos Zeocina (0,25 mg/mL) e Blasticidina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para seleção. Após 2 semanas em seleção de clones foram obtidas células produtoras de anticorpos. As Células CHO DHFR-/- co-transfectadas foram mantidas em seleção negativa de Hipoxantina/timidina (HT) e a amplificação do gene foi realizada usando metotrexato (MTX) a 10 μM . Após 3 semanas de cultivo, as células foram escalonadas para placas de cultivo celular (100 mm 1301 *kasvi*). O sobrenadante de cultura celular proveniente de cada anticorpo foi colhido em *pool*, resultando em uma média de 300mL por anticorpo. As concentrações dos mAbs foram realizados em sistema de ultrafiltração *Amicon Stirred Cells* (*Millipore*®) com membrana de 30 kDa.

3.7.2 Ensaio de produção 2 de anticorpos monoclonais em células NSO-BCL-2

Uma segunda linhagem celular, denominada NSO-BCL-2 (mieloma murino RRID:CVCL_DD16) foi utilizada no processo de produção visando o sucesso do projeto proposto (RAY; DIAMOND, 1994). O gene BCL-2 medeia a supressão da apoptose em células NSO, minimizando sua morte no processo de produção de anticorpos (MURRAY et al., 1996).

Os mAbs 3E5 híbridos foram produzidos neste tipo celular. Para isso, foram cultivadas células em placa de 6 poços, a 37°C e 5% de CO₂, com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM/ *Gibco® by life technology*) 1X para obtenção da quantidade final de 1 x 10⁶ por poço. Após foram co-transfectadas com plasmídeos codificando cadeia pesada e cadeia leve dos mAbs 3E5 híbridos utilizando o reagente de lipídeo catiônico Lipofectamina 3000 (*Invitrogen*) em meio OptiPRO (*Gibco®*) na proporção DNA (ng):reagente (µL) 3:1. A adição dos plasmídeos foi realizada completando o volume final com os meios específicos já citados e seus respectivos suplementos. No dia 3 após a co-transfecção, o meio foi substituído por outro contendo antibióticos Zeocina (0,25 mg/mL), Blastidina (20 µg/mL) e ampicilina (400 µg/mL) para seleção. Após 3 semanas em seleção de clones, essas células foram escalonadas para placas de cultivo celular (100 mm 1301 *kasvi*). O sobrenadante de cultura celular proveniente de cada anticorpo foi colhido em *pool*, resultando em uma média de 250 mL por mAb. As concentrações dos mAbs foram realizadas em sistema de ultrafiltração *Amicon Stirred Cells* (*Millipore®*) com membrana de 30 kDa.

3.7.3 Ensaio de produção 3 de anticorpos monoclonais em células ExpiCHO-S

Para otimização do processo de produção dos anticorpos, foi realizada uma terceira etapa de ensaio de produção dos mAbs 3E5 híbridos em células ExpiCHO-S™ (*Thermo Fisher Scientific*). Para cultivo e co-transfecção desta linhagem celular foi empregado o meio *ExpiCHO™ Expression Medium* e o reagente *ExpiFectamine™* (*Thermo Fisher Scientific*), respectivamente, seguindo as instruções do fabricante.

Células foram cultivadas em *Erlenmeyer* 125mL (*Corning™*) na quantidade de 6 x 10⁶ a 37°C e 8% de CO₂. Após, foram co-transfectadas com plasmídeos codificando cadeia pesada e cadeia leve dos mAbs 3E5 híbridos, utilizando um total

de plasmídeos de DNA na taxa de 1 µg/mL diluídos em meio OptiPRO (Gibco®) e na sequência, estas células foram mantidas sob agitação a 120 rotações por minuto (RPM). No primeiro dia após a co-transfecção foram adicionados os reagentes de intensificação e de alimentação fornecidos pelo kit *ExpiFectamine™* (Thermo Fisher Scientific) e no décimo dia foram coletados os sobrenadantes e concentrados no sistema *Amicon Ultra* (Merk Millipore) com membrana de 10 kDa.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR ELISA

A quantificação dos mAbs foi testada por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Placas de poliestireno de 96 poços foram revestidas com anticorpo *Goat Anti-mouse IgG1* (Southern Biotech) ou *Goat Anti-mouse IgG3* (Southern Biotech) na concentração de 1 µg/mL em PBS 1X deixando incubados durante a noite a 4 °C ou por 1 h a 37°C. Em seguida, foram bloqueadas as ligações inespecíficas do anticorpo com *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1% e incubados por 1 h à 37°C. Após lavagens com solução de PBS 1X e Tween-20 0,05%, foram adicionados à placa o padrão murino IgG1 (MOPC-21, *kappa*, Fisher™) ou murino IgG3 (FLOPC-21, *kappa*, Fisher™), em diluições seriadas (diluição de 2 vezes por condição) iniciando a curva de diluição em uma concentração de 5 µg/mL; os sobrenadantes contendo os mAbs 2H1 híbridos nas diluições de 20, 50, 100, 500 e 1000 vezes; e 3E5 híbridos nas diluições de 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000 e 50000 vezes. Após a adição as amostras foram incubadas por 1 h a 37°C. Foram lavadas com solução de PBS 1X e Tween-20 0,05%, e adicionados o anticorpo secundário *Goat Anti-mouse IgG1-AP* (fosfatase alcalina) (Southern Biotech) ou *Goat Anti-mouse IgG3-AP* (fosfatase alcalina) (Southern Biotech) na concentração de 1 µg/mL em BSA 1% e incubado por 1 h a 37°C. Após lavagens com a mesma solução citada anteriormente a placa foi incubada por 5 a 30 min com o substrato *p-Nitrophenyl Phosphate* (pNPP) (Sigma Aldrich). A medição da absorbância foi realizada por espectrofotometria utilizando o equipamento (Kasuki) e comprimento de onda de 405 nm. Para a análise dos dados de absorbância foi empregado o programa Excel, no qual foi possível obter o valor real da absorbância subtraindo o valor do controle negativo. A análise dos dados e apresentação gráfica foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism* versão 8.0 para sistema MacOS.

3.9 ENSAIO DE LIGAÇÃO DOS MABS 2H1 E 3E5 À GXM DA CÁPSULA DE *C. NEOFORMANS*

Para realizar o ensaio de ligação dos mAbs 2H1 e 3E5 à GXM da cápsula de *C. neoformans* foi realizado o teste de ELISA. Para isso, foram utilizados como padrões diluições seriadas do mAb IgG1 (18B7) ou IgG3 (3E5) previamente purificados e quantificados por ensaio de ELISA, iniciando a concentração em 10 µg/mL. A placa de poliestireno de 96 poços (*Costar™*), foi revestido com 10 µg/mL de EPS purificado a partir de culturas de *C. neoformans* H99 dissolvidas em PBS 1X, em seguida incubadas a 4°C durante a noite. Após, foram incubados por 1 h à 37°C com BSA 1% a fim de bloquear as reações inespecíficas de anticorpos. Lavadas três vezes com solução de PBS 1X e Tween-20 0,05%, foram adicionados os mAbs 2H1 e 3E5 híbridos a serem testados na concentração de 10 µg/mL e incubadas a 4°C durante a noite. Lavadas com solução de PBS 1X e Tween-20 0,05% e adicionados o anticorpo secundário *Goat Anti-mouse IgG1-AP* (fosfatase alcalina) (*Southern Biotech*) ou *Goat Anti-mouse IgG3-AP* (fosfatase alcalina) (*Southern Biotech*) na concentração de 1 µg/mL em BSA 1% e incubado por 1 h a 37 °C. Após lavagens com solução citada anteriormente a placa foi incubada por 5 a 30 min com o substrato pNPP (*Sigma Aldrich*). A medição da absorbância foi realizada por espectrofotometria utilizando o equipamento (*Kasuki*) e comprimento de onda de 405 nm. Para a análise dos dados de absorbância foi empregado o programa *Excel*, no qual foi possível obter o valor real da absorbância subtraindo o valor do controle negativo. A análise dos dados e apresentação gráfica foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism* versão 8.0 para 2H1 e 9.0 para 3E5 no sistema MacOS.

3.10 ENSAIO DE VALIDAÇÃO POR FAGOCITOSE DE *C. NEOFORMANS*

Os ensaios de fagocitose foram realizados em placas tratadas para cultura de tecidos de 96 poços (*BD Falcon*) contendo células J774.16. A suspensão de *C. neoformans* foi opsonizada com 10 µg/mL de cada mAb 3E5 híbrido durante a noite a 4°C, com uma relação macrófago:*C. neoformans* variando de 1:1 a 1:2 e em seguida, foi adicionada aos macrófagos. O tempo de fagocitose foi de 2 h a 37°C em

5% de CO₂. As células foram então lavadas com PBS 1X, fixadas e coradas seguindo as instruções do kit de panóptico (*Instant Prov Newprov*). A contagem das células foi realizada observando três campos/poço por experimento, com pelo menos 100 células/campo. A porcentagem de fagocitose foi calculada como o número de macrófagos contendo um ou mais *C. neoformans* internalizados dividido pelo número total de macrófagos visíveis em um campo. Cada condição experimental foi feita em triplicata. Os dados estatísticos foram realizados através do teste de *Fisher* no programa *Graph Pad Prism* versão 9.0 para sistema MacOS.

3.11 ENSAIO DE ANÁLISE DE LIGAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICO DOS MABS 2H1 E 3E5 POR ELISA

Para realizar o ensaio de especificidade fina de mAbs 2H1 e 3E5 híbridos foi realizado o teste de ELISA antígeno-específico. Para isso, foram utilizados como padrões diluições seriadas (considerando a diluição de 2 vezes por condição) do mAb IgG1 (3E5) ou IgG3 (3E5) previamente purificados e quantificados por ensaio de ELISA, iniciando a concentração em 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,312 µg/mL, 0,156 µg/mL e 0,078 µg/mL. A placa de poliestireno de 96 poços (*Costar*TM), foi revestido com 10 µg/mL de EPS purificado a partir de culturas de *C. neoformans* H99 dissolvidas em PBS 1X, 10 µg/mL de EPS de-O-acetilado quimicamente modificado de H99 e 10 µg/mL de EPS derivado de *cas1Δ*, em seguida incubadas a 4°C durante a noite. Após, foram incubados por 1 h à 37°C com BSA 1% a fim de bloquear as reações inespecíficas de anticorpos. Lavadas três vezes com solução de PBS 1X e Tween-20 0,05%, foram adicionados os mAbs 2H1 e 3E5 híbridos a serem testados em diluições seriadas iniciando da concentração de 10 µg/mL e incubadas a 4°C durante a noite. Lavadas com solução de PBS 1X e Tween-20 0,05% e adicionados o anticorpo secundário *Goat Anti-mouse* IgG1-AP (fosfatase alcalina) (*Southern Biotech*) ou *Goat Anti-mouse* IgG3-AP (fosfatase alcalina) (*Southern Biotech*) na concentração de 1 µg/mL em BSA 1% e incubado por 1 h a 37°C. Após lavagens com solução citada anteriormente a placa foi incubada por 5 a 30 min com o substrato pNPP (*Sigma Aldrich*). A medição da absorbância foi realizada por espectrofotometria utilizando o equipamento (*Kasuki*) e comprimento de onda de 405 nm. Para a análise dos dados de absorbância foi empregado o programa

Excel, no qual foi possível obter o valor real da absorbância subtraindo o valor do controle negativo. A análise dos dados e apresentação gráfica foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism* versão 9.0 para sistema MacOS.

3.12 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE LIGAÇÃO IGG-CÁPSULA POR IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA

O padrão de ligação do anticorpo à cápsula de *C. neoformans* foi avaliado por microscopia de epifluorescência. Para realizar o ensaio de imunofluorescência foi feito o cultivo dos isolados H99 de *C. neoformans* durante a noite. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X para a contagem e ressuspensão em concentração final de 1×10^7 /mL. Estas foram incubadas com os mAbs 2H1 e 3E5 (amostras teste) em concentrações de 10 µg/mL durante a noite a 4°C sob agitação; lavadas três vezes com PBS 1X e incubados com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a *Alexa Fluor*® 488 (*ThermoFisher Scientific*), a 1 µg/mL por 1 h a 37°C. As células foram lavadas e imobilizadas em lâmina e lamínulas com meio de montagem *ProLong*® *Gold Antifade Mountant* (*ThermoFisher*). As amostras foram visualizadas em microscópio de epifluorescência *Zeiss Axio Observer Z1* na objetiva de 63X (NA 1,4), câmera *Axio Cam MRc* com CCD resfriado e estágio motorizado para coleta de séries de imagens ao longo do eixo Z. Em seguida, análises qualitativas foram realizadas a partir da observação da presença de intensidade da fluorescência associados ao padrão de ligação dos mAbs ao polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*, sendo posteriormente caracterizados como padrão de ligação anular ou puntiforme.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DE MABS 2H1 E 3E5

4.1.1 Ensaio de produção 1- Avaliação da produtividade de mAbs 2H1

A avaliação da produtividade dos mAbs 2H1 híbridos a partir do sobrenadante de células CHO DHFR^{-/-} co-transfectadas foi realizada por meio de ensaio preliminar de quantificação dos anticorpos.

A concentração da produção inicial de mAbs 2H1 a partir das células CHO DHFR^{-/-} variou de aproximadamente 0,29 µg/mL a 1,31 µg/mL. Os mAbs apresentaram produção de 0,29 µg/mL (2H1 CH1F1), 0,49 µg/mL (2H1 CH1F2), 0,35 µg/mL (2H1 CH1F3), 1,31 µg/mL (2H1 IgG3 com D de IgG1), 0,80 µg/mL (2H1 IgG1 com D de IgG3), 0,97 µg/mL, (2H1 IgG1) e 0,31 µg/mL (2H1 IgG3) (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração inicial de mAbs 2H1 a partir da co-transfecção de células CHODHFR^{-/-}

Descrição dos mAbs	Concentração em µg /mL
2H1 CH1F1	0,29
2H1 CH1F2	0,49
2H1 CH1F3	0,35
2H1 IgG3 com D de IgG1	1,31
2H1 IgG1 com D de IgG3	0,80
2H1 IgG1	0,97
2H1 IgG3	0,31

Quantificação de mAbs 2H1 por ELISA. Concentração de mAbs, 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1mG1 e 2H1mG3. Dados de densidade óptica obtidos em espectrofotômetro (*Kasuki*) no comprimento de onda de 405nm. A análise dos dados foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism versão 8.0* para sistema MacOS. Concentração apresentada em unidades de µg/mL.

No intuito de obter a quantidade necessária para a realização dos experimentos, a produção de mAbs 2H1 foi expandida e posteriormente concentrada. A quantidade total produzida de mAbs 2H1 apresentaram concentrações que variaram de aproximadamente 0,4 µg/mL a 88,2 µg/mL. Foram obtidas concentrações de 9,2 µg/mL (2H1 CH1F1), 88,2 µg/mL (2H1 CH1F2), 44,7 µg/mL (2H1 CH1F3), 81,7 µg/mL (2H1 IgG3 com D de IgG1), 75,7 µg/mL (2H1 IgG1 com D de IgG3) 72,7 µg/mL (2H1 IgG1) e 0,4 µg/mL (2H1 IgG3) (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração total de mAbs 2H1 a partir da co-transfecção de células CHODHFR-/-

Descrição dos mAbs	Concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$
2H1 CH1F1	9,2
2H1 CH1F2	88,2
2H1 CH1F3	44,7
2H1 IgG3 com D de IgG1	81,7
2H1 IgG1 com D de IgG3	75,7
2H1 IG1	72,7
2H1 IG3	0,4

Quantificação de mAbs 2H1 por ELISA. Concentração total de mAbs 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1 IgG1 e 2H1 IgG3. Dados de densidade óptica obtidos em espectrofotômetro (*Kasuki*) no comprimento de onda de 405nm. A análise dos dados foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism versão 8.0* para sistema MacOS. Concentração apresentada em unidades de $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.1.2 Ensaio de produção 2- Avaliação da produtividade de mAbs 3E5

O ensaio realizado com a linhagem celular CHO DHFR-/- resultou em uma produção com concentração abaixo da necessária para o desenvolvimento das etapas subsequentes do objetivo proposto neste estudo. Portanto, foi escolhido um novo tipo celular, denominado NSO-BCL-2, configurando um segundo modelo de ensaio. A produção dos mAbs 3E5 híbridos foi realizada em linhagem celular NSO-BCL-2. A produção inicial de mAbs 3E5 em células NSO-BCL-2 variou de aproximadamente 0,002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram obtidas concentrações de 0,88 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 CH1F1), 0,008 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 CH1F2), 0,38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 CH1F3), 0,68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG3 com D de IgG1), 0,20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG1 com D de IgG3) 0,014 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (3E5 IgG1) e 0,002 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG3) (Tabela 4).

Tabela 4 - Concentração inicial de mAbs 3E5 obtidos a partir da co-transfecção de células NSO-BCL-2.

Descrição dos mAbs	Concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$
3E5 CH1F1	0,88
3E5 CH1F2	0,008
3E5 CH1F3	0,38
3E5 IgG3 com D de IgG1	0,68
3E5 IgG1 com D de IgG3	0,20
3E5 IgG1	0,014
3E5 IgG3	0,002

Quantificação de mAbs 3E5 por ELISA. Concentração inicial de mAbs, 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG3 com D de IgG1, 3E5 IgG1 com D de IgG3 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. Dados de densidade óptica obtidos em espectrofotômetro (*Kasuaki*) no comprimento de onda de 405nm. A análise dos dados foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism versão 9.0* para sistema MacOS. Concentração apresentada em unidades de $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para alcançar a quantidade ideal de mAbs para a realização dos experimentos, a produção de mAbs 3E5 foi expandida na linhagem celular NSO-BCL-2. Posteriormente, concentrada e quantificada, seguindo o protocolo descrito em metodologia. A concentração total do mAbs 3E5 variaram de aproximadamente 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 75,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foram obtidas concentrações de 75,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 CH1F1), 0,02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 CH1F2), 65,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 CH1F3), 53,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG3 com D de IgG1), 73,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG1 com D de IgG3), 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG1) e 1,38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3E5 IgG3) (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentração total de mAbs 3E5 obtidos a partir da co-transfecção de células NSO-BCL-2

Descrição dos mAbs	Concentração em $\mu\text{g}/\text{mL}$
3E5 CH1F1	75,2
3E5 CH1F2	0,02
3E5 CH1F3	65,5
3E5 IgG3 com D de IgG1	53,5
3E5 IgG1 com D de IgG3	73,2
3E5 IgG1	0,08
3E5 IgG3	1,38

Quantificação de mAbs 3E5 por ELISA. Concentração total de mAbs, 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG3 com D de IgG1, 3E5 IgG1 com D de IgG3 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. Dados de densidade óptica obtidos em espectrofotômetro (*Kasuaki*) no comprimento de onda de 405nm. A análise dos dados foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism versão 9.0* para sistema MacOS. Concentração apresentada em unidades de $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Definimos como o controle dos experimentos o material produzido pelo Dr. André Moraes Nicola durante seu Pós-Doutorado realizado no laboratório do Dr.

Arturo Casadevall, *Johns Hopkins University*. Estes anticorpos 3E5 foram estudados anteriormente e demonstraram seguir um padrão definido. Assim, foram quantificados os mAbs 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3, que apresentaram concentrações de 783,74 µg/mL e 7322 µg/mL, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração de mAbs 3E5 controle

Descrição dos mAbs	Concentração em µg/mL
3E5 IgG1	793,84
3E5 IgG3	7322

Quantificação de mAbs 3E5 por ELISA. Concentração de mAbs 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3 utilizados como controle experimental. Dados de densidade óptica obtidos em espectrofotômetro (Kasuki) no comprimento de onda de 405nm. A análise dos dados foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism* versão 9.0 para sistema MacOS. Concentração apresentada em unidades de µg/mL.

4.1.3 Ensaio de produção 3- Avaliação da produtividade de mAbs 3E5

Para alcançar a concentração necessária de todos os anticorpos 3E5 em produção padronizada para realização dos experimentos propostos foi realizado um terceiro ensaio de produção com a linhagem celular ExpiCHO-S. Esta apresentou o melhor desempenho, produzindo quantidades suficientes para a execução do projeto. A quantidade total de mAbs 3E5 variou de aproximadamente 307 µg/mL a 4288 µg/mL. Foram obtidas concentrações de 1285,8 µg/mL (3E5 CH1F1), 2140,7 µg/mL (3E5 CH1F2), 2265,1 µg/mL (3E5 CH1F3), 4288 µg/mL (3E5 IgG3 com D de IgG1), 307 µg/mL (3E5 IgG1 com D de IgG3), 332 µg/mL (3E5 IgG1) e 2851 µg/mL (3E5 IgG3) (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentração total de mAbs 3E5 obtidos a partir da co-transfecção de células ExpiCHO-S

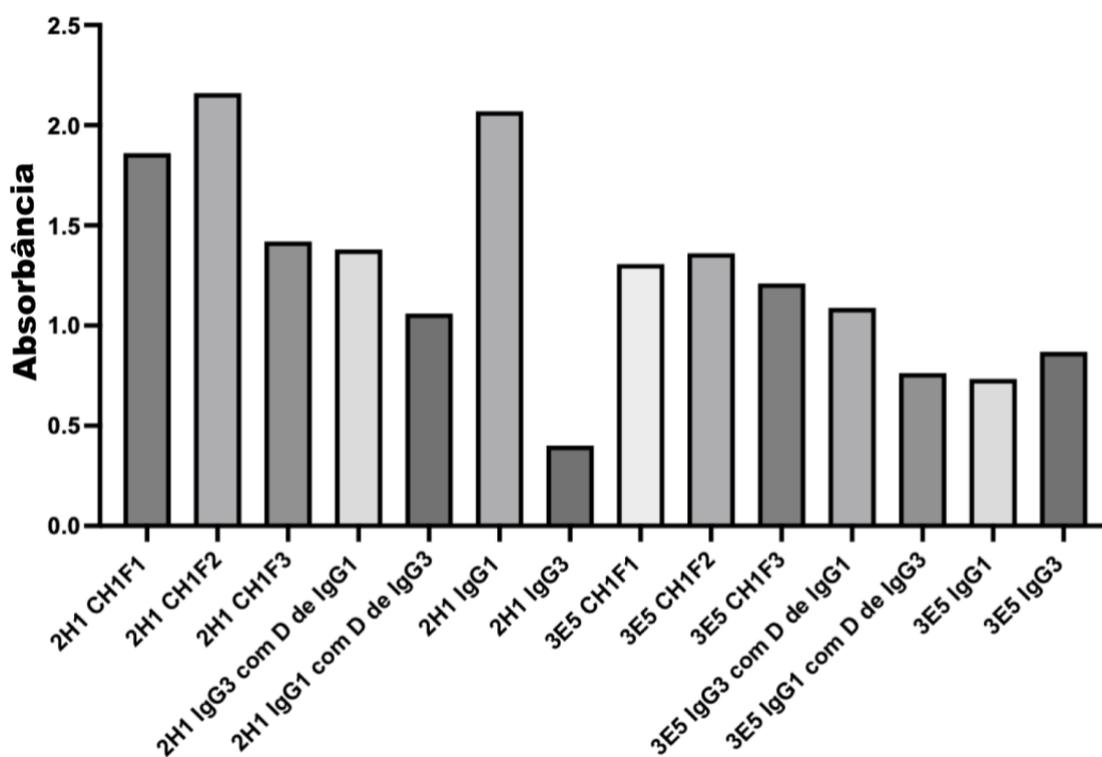
Descrição de mAbs	Concentração em µg /mL
3E5 CH1F1	1285,8
3E5 CH1F2	2140,7
3E5 CH1F3	2265,1
3E5 IgG3 com D de IgG1	4288
3E5 IgG1 com D de IgG3	307
3E5 IgG1	332
3E5 IgG3	2851

Quantificação de mAbs 3E5 por ELISA. Concentração total de mAbs 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG3 com D de IgG1, 3E5 IgG1 com D de IgG3, 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. Dados de densidade óptica obtidos em espectrofotômetro (*Kasuki*) no comprimento de onda de 405nm. A análise dos dados foi realizada por teste *One Way Anova* no programa *Graph Pad Prism versão 9.0* para sistema MacOS. Concentração apresentada em unidades de µg/mL.

4.2 ENSAIO DE LIGAÇÃO DOS MABS 2H1 E 3E5 À GXM DA CÁPSULA DE *C. NEOFORMANS*

Após a produção e quantificação dos mAbs 2H1 e 3E5, estes foram analisados quanto a sua capacidade de ligação à GXM da cápsula de *C. neoformans* (Figura 11).

Figura 11 - Absorbância média de mAbs 2H1 e 3E5 em ensaio de ligação à GXM da cápsula de *C. neoformans*



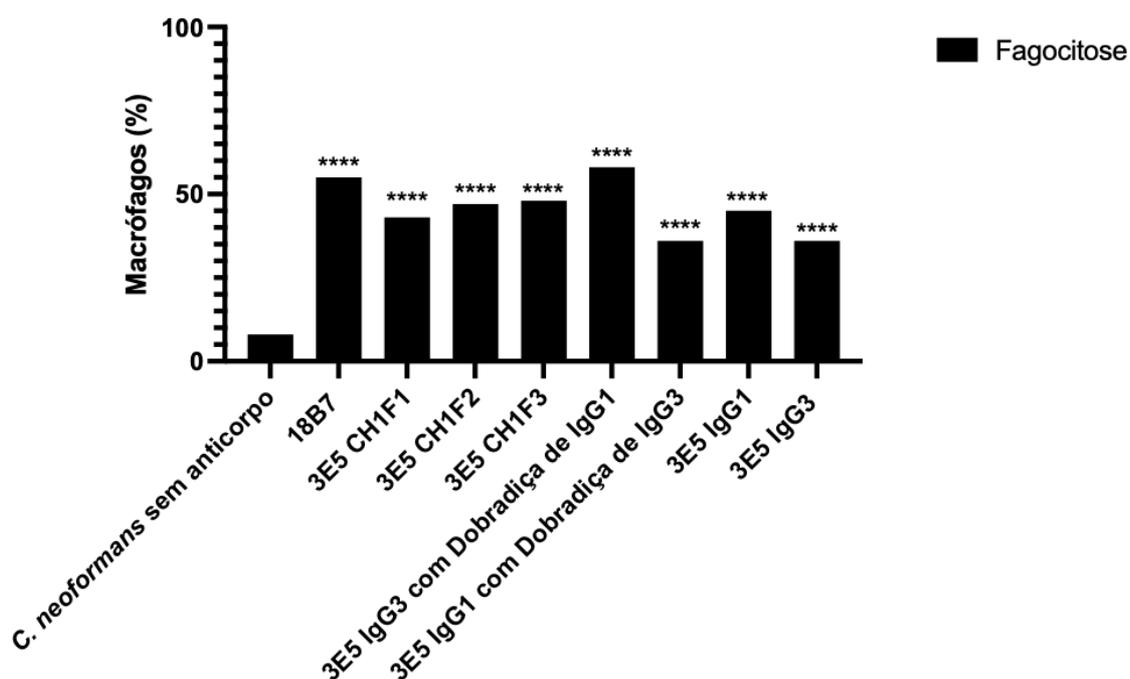
Ensaio de ligação de mAbs 2H1 e 3E5 à GXM da cápsula de *C. neoformans* por ELISA. Barras representam a absorbância média de mAbs 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3, 2H1 IgG3 com D de IgG1, 2H1 IgG1 com D de IgG3, 2H1 IgG1, 2H1 IgG3, 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG3 com D de IgG1, 3E5 IgG1 com D de IgG3, 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. A concentração de mAbs 2H1 e 3E5 utilizados foram de 10 µg /mL. Dados de absorbância obtidos em espectrofotômetro (*Kasuaki*) no comprimento de onda de 405nm. Experimento realizado n=1. A análise dos dados foi realizada no programa *Excel* e representação gráfica no programa *Graph Pad Prism versão 9.0* para sistema MacOS.

4.3 ENSAIO DE FUNCIONALIDADE POR MEIO DE FAGOCITOSE

Estudos anteriores demonstraram que os mAbs 3E5 e 2H1 podem facilitar a função das células efectoras. Assim, a opsonização de *C. neoformans* por esses mAbs aumentou a fagocitose por células de macrófagos (C. LEE et al., 1995; MUKHERJEE; LEE; CASADEVALL, 1995). Para determinar se os anticorpos produzidos podem se ligar a cápsula e mediar a fagocitose por macrófagos, revestimos o fungo *C. neoformans* com os mAbs 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3 e os mAbs híbridos 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG1 com D de IgG3, 3E5 IgG3 com D de IgG1. Os *C. neoformans* sem anticorpos que foram expostos às células J774.16 apresentaram fagocitose de aproximadamente 8%. Já os complexos *C. neoformans* + mAb expostos

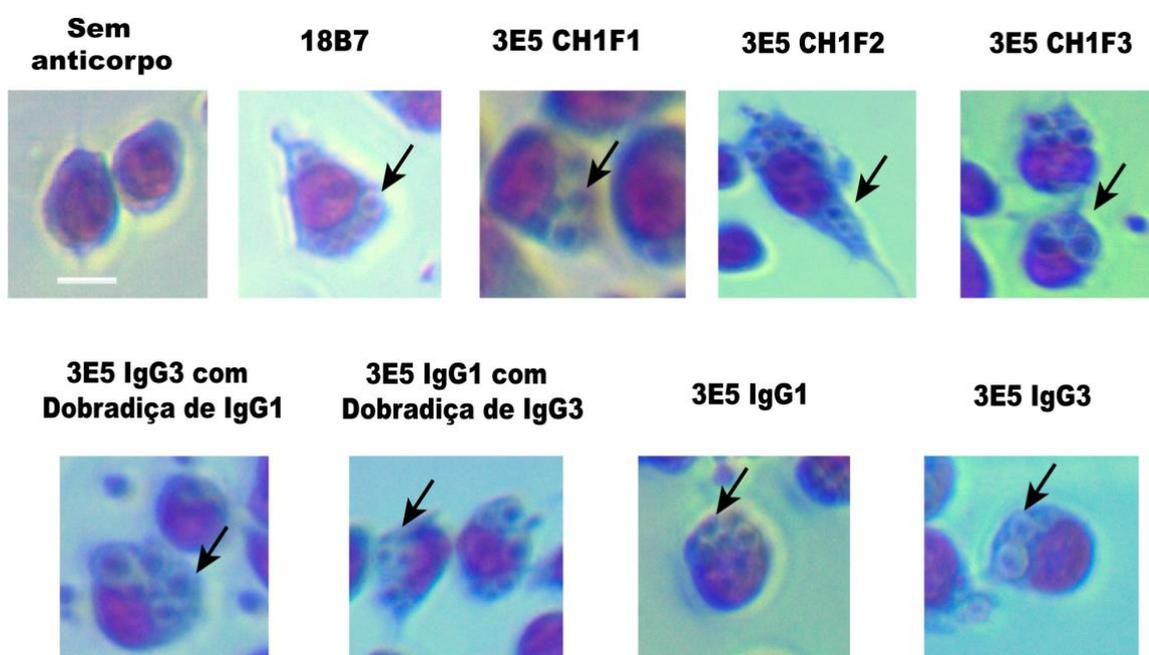
as células J774.16 apresentaram fagocitose de aproximadamente 55% (18B7), 43% (3E5 CH1F1), 47% (3E5 CH1F2), 48% (3E5 CH1F3), 58% (3E5 IgG3 com Dobradiça de IgG1), 36% (3E5 IgG1 com Dobradiça de IgG3), 45% (3E5 IgG1) e 36% (3E5 IgG3). Os anticorpos recombinantes híbridos demonstraram ser funcionais (Figura 12 e 13). O mAb 18B7 já é caracterizado como um anticorpo capaz de promover o aumento da fagocitose por células J774.16 (ALVAREZ; SAYLOR; CASADEVALL, 2008; CASADEVALL et al., 1998). Dessa forma, este mAb foi utilizado como controle do ensaio.

Figura 12 - Ensaio de validação da funcionalidade dos mAbs 3E5 híbridos por fagocitose



Ensaio de validação da funcionalidade de mAbs 3E5 a partir da análise da porcentagem de fagocitose de *C. neoformans*. Para realização experimental foram utilizadas células J774.16 e *C. neoformans* opsonizados com 10 µg/mL de cada um dos mAbs 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG3 com Dobradiça de IgG1, 3E5 IgG1 com Dobradiça de IgG3, 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3. Os *C. neoformans* sem anticorpos e o 18B7 foram utilizados como controle do experimento. Células e fungos opsonizados foram incubados, na razão de 1:2 (macrófagos:fungo), corados e analisados. As barras de coloração preta representam a porcentagem de macrófagos com pelo menos uma célula fúngica *C. neoformans* fagocitada e o intervalo de confiança de 95% (Wilson/Brown), no qual "p" possui significância de **** $p < 0.0001$ para a comparação entre cada mAb e o controle sem presença de anticorpo. Experimento realizado $n=3$. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando teste exato de Fisher através do programa *Graph Pad Prism* versão 9.0 para sistema *MacOS*

Figura 13 - Imagem representativa de células J774.16 com *C. neoformans* fagocitados



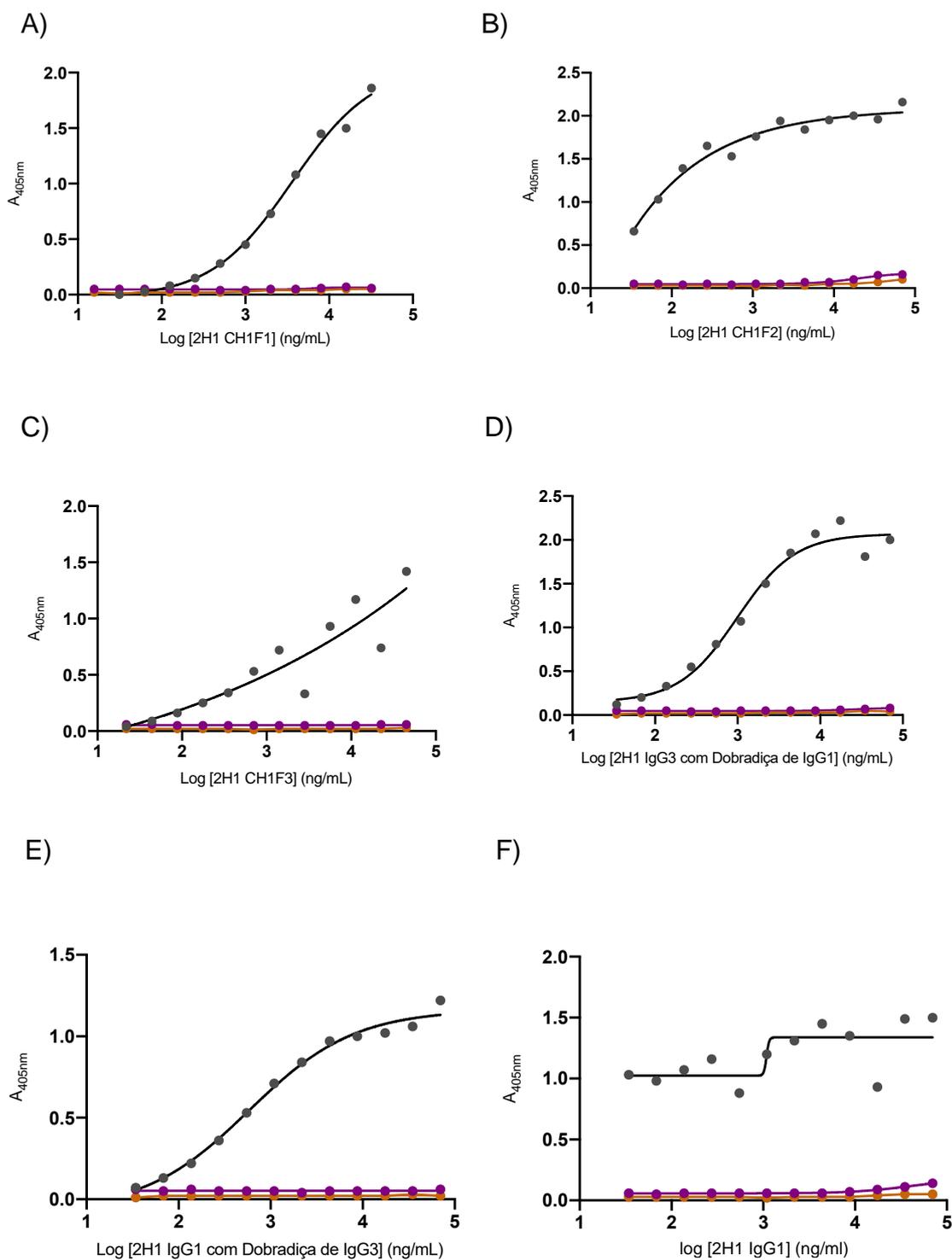
Imagens representativas do ensaio de fagocitose. As setas indicam macrófagos com fungos internalizados. Barra de escala: 10 μ m.

4.4 ANÁLISE DE LIGAÇÃO ANTÍGENO-ESPECÍFICO DOS MABS 2H1 E 3E5 POR ELISA

Estudos desenvolvidos vêm demonstrando que o isotipo do anticorpo pode afetar a especificidade fina do paratopo na ligação a antígenos polissacarídicos (CASADEVALL; JANDA, 2012; MCLEAN et al., 2002). O mAb 3E5 IgG3 mostrou se ligar de forma 10 vezes mais forte à GXM modificado se comparado com outros 3E5 (TORRES et al., 2005). Assim, avaliamos a ligação de mAbs 2H1 e 3E5 híbridos no intuito de analisar qual parte da região constante desses mAbs podem ser responsáveis por modificar a especificidade fina. Dessa forma, testamos sua reatividade à GXM nativo de H99, GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1* Δ . Os mAbs 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3, 2H1 IgG3 com Dobradiça de IgG1, 2H1 IgG1 com Dobradiça de IgG3 e 2H1 IgG1 demonstraram reatividade diminuída para GXM de-O-acetilado obtido por reação química e GXM obtido por *cas1* Δ (Figura 14- A, B, C, D, E e F). Os mAbs 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3, já citados anteriormente, produzidos pelo Dr. André Moraes Nicola e com função definida, foram utilizados como controle experimental (Figura 14-G e H). Este ensaio não foi realizado para o mAb 2H1 IgG3 pois a concentração obtida (conforme dados

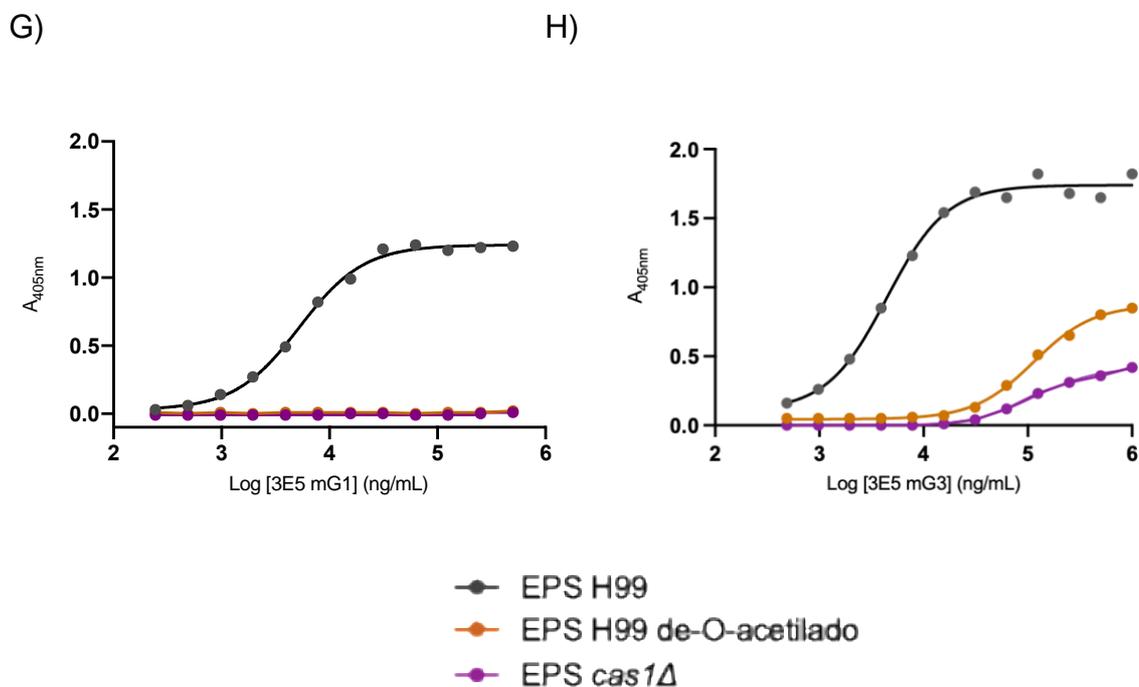
apresentados na tabela 3) foi insuficiente, inviabilizando a obtenção de um resultado adequado.

Figura 14 - Análise da ligação de mAbs 2H1 à GXM nativo de H99, GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1Δ*



Continua figura 14 na próxima página

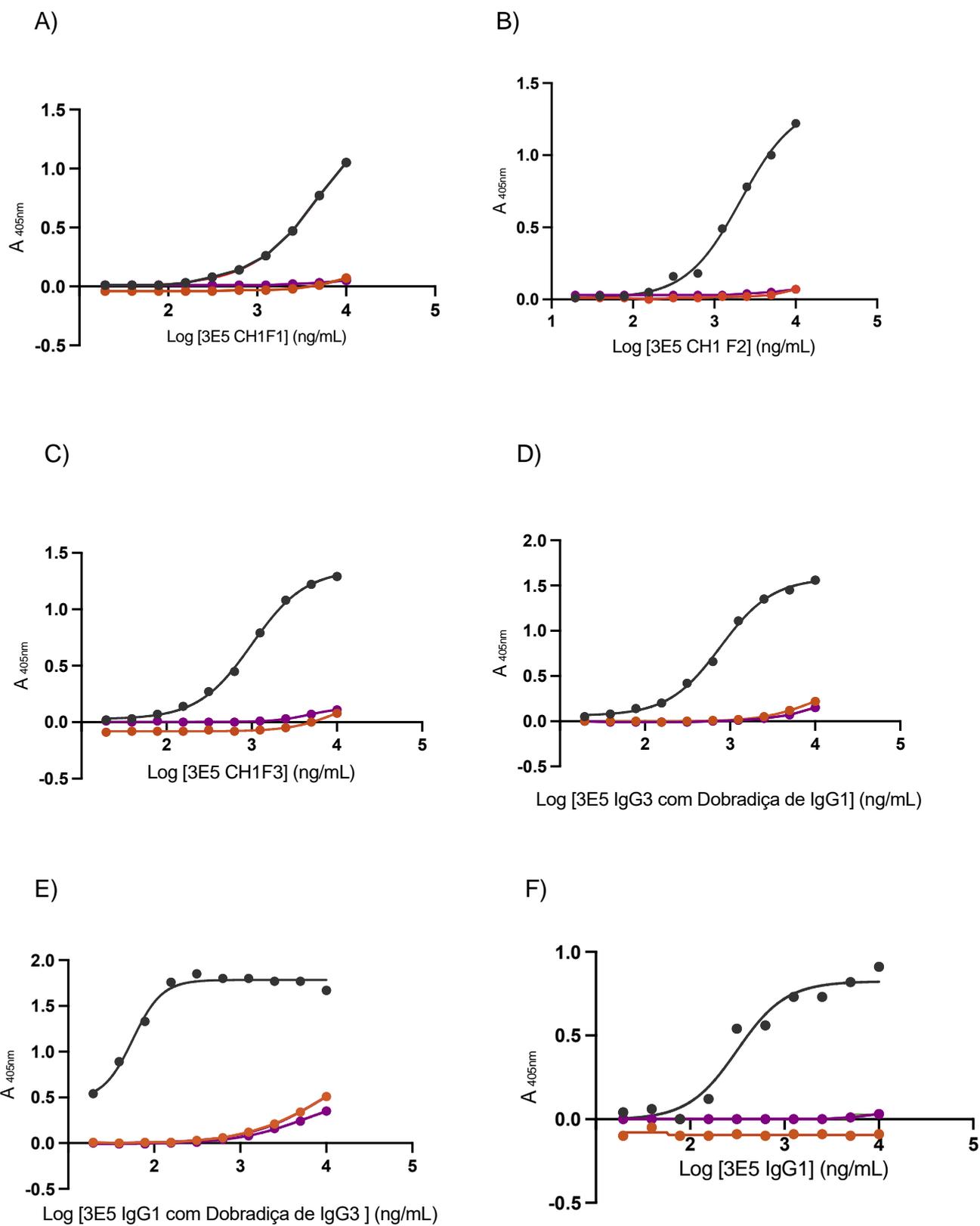
Continuação da Figura 14



Análise de ligação antígeno-específico de mAbs 2H1. Linha roxa representa EPS derivado de *cas1*Δ; linha laranja EPS de-O-acetilado quimicamente modificado de H99 e linha cinza EPS purificado de H99. Ensaio de ligação realizado por ELISA para os mAbs (A) 2H1 CH1F1, (B) 2H1 CH1F2, (C) 2H1 CH1F3, (D) 2H1 IgG3 com Dobradiça de IgG1, (E) 2H1 IgG1 com Dobradiça de IgG3 e (F) 2H1 IgG1. As figuras 14 (G) e (H) representam os mAbs 3E5 utilizados como controle experimental. O anticorpo 3E5 IgG1 não se liga à GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1*Δ, enquanto o anticorpo 3E5 IgG3 se liga. Os gráficos representam a absorbância média de duas réplicas técnicas. Dados de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro (*Kasuki*) no comprimento de onda de 405nm. Gráficos apresentados em escala logarítmica e unidade de concentração em nanogramas/mililitro (ng/mL). A análise dos dados foi realizada no programa *Excel* e representação gráfica no programa *Graph Pad Prism* versão 8.0 para sistema *MacOS*.

A etapa seguinte consistiu em testar a reatividade dos mAbs 3E5 à GXM nativo de H99, GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1*Δ. Os mAbs híbridos 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3 e 3E5 IgG3 com Dobradiça de IgG1 demonstrou diminuir sua reatividade para GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1*Δ. Para o mAb híbrido 3E5 IgG1 com Dobradiça de IgG3 o ensaio de ligação demonstrou aumentar a reatividade. O mAb 3E5 IgG1 apresentou reatividade menor em comparação ao 3E5 IgG3 (Figura 15- A, B, C, D, E, F e G). Da mesma maneira dos mAbs 2H1, os mAbs 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3 produzidos e padronizados anteriormente foram utilizados como controle experimental (Figura 15-H e I).

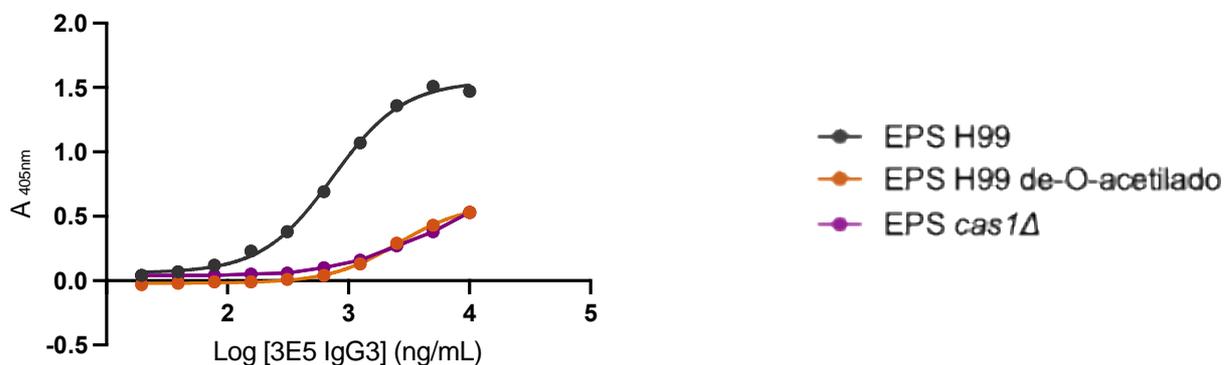
Figura 15 - Análise da ligação de mAbs 3E5 à GXM nativo de H99, GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1Δ*



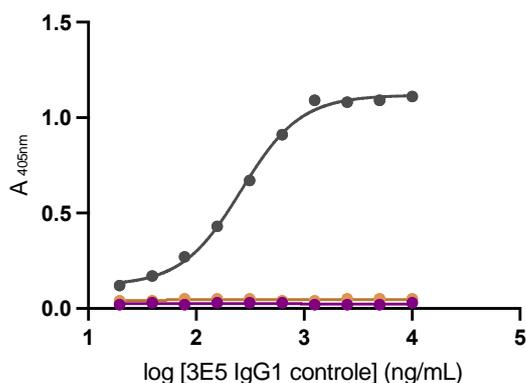
Continua figura 15 na próxima página

Continuação da Figura 15

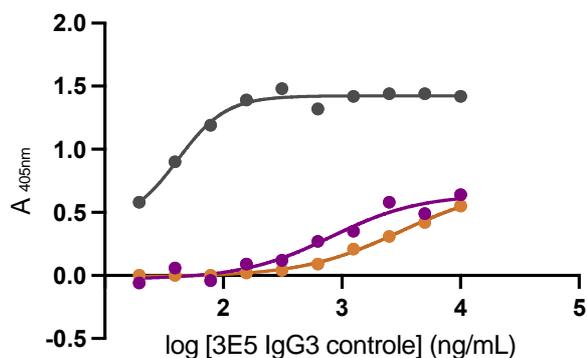
G)



H)



I)



Análise de ligação antígeno-específico de mAbs 3E5. Linha roxa representa EPS derivado de *cas1Δ*; linha laranja EPS de-O-acetilado quimicamente modificado de H99 e linha cinza EPS purificado de H99. Ensaio de ligação realizado por ELISA para os mAbs (A) 3E5 CH1F1, (B) 3E5 CH1F2, (C) 3E5 CH1F3, (D) 3E5 IgG3 com Dobradiça de IgG1, (E) 3E5 IgG1 com Dobradiça de IgG3, (F) 3E5 IgG1 e (G) 3E5 IgG3. As figuras 15 (H) e (I) representam os mAbs 3E5 utilizados como controle experimental. O anticorpo 3E5 IgG1 não se liga ao à GXM de-O-acetilado obtido de reação química e GXM obtido de *cas1Δ*, enquanto o anticorpo 3E5 IgG3 se liga. Os gráficos representam a absorbância média de duas réplicas técnicas. Dados de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro (*Kasuki*) no comprimento de onda de 405nm. Gráficos apresentados em escala logarítmica e unidade de concentração em nanogramas/mililitro (ng/mL). A análise dos dados foi realizada no programa *Excel* e representação gráfica no programa *Graph Pad Prism* versão 9.0 para sistema *MacOS*.

4.5 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DOS MABS 2H1 E 3E5 À GXM DA CÁPSULA DE *C. NEOFORMANS*

Os padrões de coloração por imunofluorescência (IF) têm sido apresentados como bons indicadores da proteção mediada por anticorpos. A ligação com coloração de aspecto anular se correlaciona com a proteção de animais, ao passo que, a ligação com coloração de aspecto puntiforme se correlaciona com a não proteção da doença, ou diminuição da sobrevivência de camundongos (FELDMESSER et al., 2000; MCLEAN et al., 2002).

Para verificar o padrão de ligação dos mAbs 2H1 híbridos à GXM da cápsula de *C. neoformans* (cepa H99), foi realizado ensaio de imunofluorescência. Os padrões de IF apresentaram aspecto anular para os mAbs 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3, 2H1 IgG3 com Dobradiça de IgG1, 2H1 IgG1 com Dobradiça de IgG3 e 2H1 IgG1 (Tabela 8). Este ensaio não foi realizado para o mAb 2H1 IgG3 pois a concentração obtida (conforme dados apresentados na tabela 3) foi insuficiente, inviabilizando a obtenção de um resultado adequado. Além disso, durante a realização deste ensaio com os mAbs 2H1 não foi possível obter o registro das imagens pois, na ocasião desse experimento, o microscópio de epifluorescência *Zeiss Axio Observer Z1* (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília) não estava com a luz do campo claro funcional e em razão da pouca quantidade de mAbs 2H1 produzido, não tivemos a oportunidade de repetir o experimento.

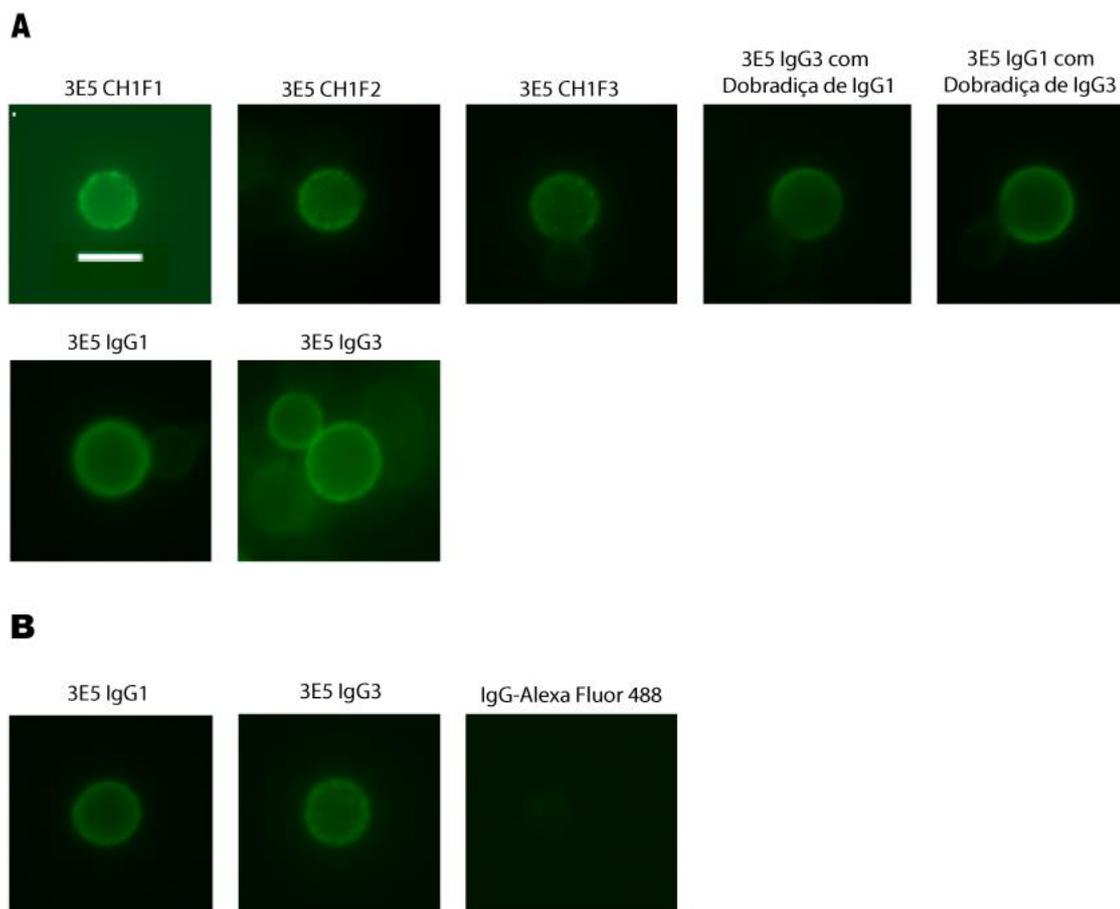
Do mesmo modo que os mAbs 2H1, analisamos o padrão de coloração da ligação dos mAbs 3E5 híbridos à GXM da cápsula de *C. neoformans* (cepa H99). Os padrões de IF apresentaram aspecto anular para os mAbs 3E5 IgG3 com Dobradiça de IgG1, 3E5 IgG1 com Dobradiça de IgG3, 3E5 IgG1 e 3E5 IgG1 controle. Já para os mAbs 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, 3E5 IgG3 e 3E5 IgG3 controle apresentaram padrão de fluorescência com aspecto puntiforme (Tabela 8 e Figura 16). Como controles positivos, utilizamos dois mAbs, 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3 estudados anteriormente e conhecidos por se ligarem a padrões anulares e puntiformes, respectivamente (TORRES et al., 2005).

Tabela 8 - Padrão de ligação de mAbs 2H1 e 3E5 híbridos em ensaio de Imunofluorescência

mAbs analisados para o padrão de ligação à GXM da cápsula de <i>C. neoformans</i>	Padrão de coloração apresentado no IF
2H1 CH1F1	Anular
2H1 CH1F2	Anular
2H1 CH1F3	Anular
2H1 IgG3 com D de IgG1	Anular
2H1 IgG1 com D de IgG3	Anular
2H1 IgG1	Anular
3E5 CH1F1	Puntiforme
3E5 CH1F2	Puntiforme
3E5 CH1F3	Puntiforme
3E5 IgG3 com D de IgG1	Anular
3E5 IgG1 com D de IgG3	Anular
3E5 IgG3 produzido	Puntiforme
3E5 IgG1 produzido	Anular
3E5 IgG3 controle	Puntiforme
3E5 IgG1 controle	Anular

Análise do padrão de ligação de mAbs 2H1 e 3E5 a partir do ensaio de Imunofluorescência. Coloração visualizada por meio do microscópio de epifluorescência *Zeiss Axio Observer Z1* na objetiva de 63X (NA 1,4), câmera Axio Cam MRc com CCD resfriado e estágio motorizado para coleta de séries de imagens ao longo do eixo Z. Observação realizada por dois pesquisadores diferentes.

Figura 16 - Padrões de Imunofluorescência de mAbs 3E5



A) Imunofluorescência indireta de mAbs 3E5. Os mAbs 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3, e 3E5 IgG3 mostraram padrão de fluorescência puntiforme enquanto 3E5 IgG1 com Dobradiça de IgG3 e 3E5 IgG1 mostrou padrão de fluorescência anular. Somente o mAb 3E5 IgG3 com Dobradiça de IgG1 alterou seu padrão de fluorescência para anular B) Os mAbs 3E5 IgG1 controle e 3E5 IgG3 controle apresentaram padrões de fluorescência anular e puntiforme, respectivamente. O controle negativo utilizado foi o *C. neoformans* incubado com o anticorpo IgG *Alexa Fluor 488*. Esta amostra não apresentou sinal de fluorescência significativa. Imagens analisadas a partir do programa *ZEISS Zen 3.7* para *Windows 10*. Barra de escala: 5 μ m.

5 DISCUSSÃO

Um dogma central na imunologia é de que a imunoglobulina era uma molécula bifuncional composta por duas regiões completamente independentes (PORTER; PRESS, 1957). Assim, a região variável era única responsável pela especificidade e afinidade, enquanto a região constante desempenhava funções efetoras e ativação do complemento. Atualmente, este dogma vem sendo alterado, indicando que a região constante pode influenciar a ligação do anticorpo ao antígeno, alterando seu padrão de resposta (JANDA et al., 2016). Essa hipótese surgiu quando em 1976, Huber e colaboradores, propuseram um modelo alostérico de imunoglobulina, no qual a ligação ao antígeno desencadeou um sinal que passou das regiões variáveis para constante (HUBER et al., 1976). Posteriormente, em outros estudos aprofundados demonstraram que a troca de isotipo gera variantes com propriedades diferentes (DODEV et al., 2015; XIA et al., 2012; YUAN et al., 1995). Em um desses estudos foi possível a produção de mAbs com características protetora e não protetora em camundongos (MUKHERJEE et al., 1995). Foi observado que mAbs de isotipos IgG1 e IgG3 com região variável idêntica se ligavam ao epítipo de GXM com especificidade e afinidade diferentes (MCLEAN et al., 2002). Além disso, foi analisado o padrão de ligação ao polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*. Este demonstrou que mAbs IgG1 se ligavam com padrão de ligação anular, enquanto os mAbs IgG3 se ligavam com padrão de ligação puntiforme (OLIVEIRA et al., 2022; TORRES et al., 2005). Assim, identificamos possíveis porções das regiões constantes de mAbs IgG1 e IgG3 com região variável idêntica, responsáveis por modificar a especificidade fina e gerar a alteração do padrão de ligação à GXM da cápsula de *C. neoformans*.

Atualmente, a tecnologia de expressão recombinante em cultura de células de mamíferos é o principal meio para a produção comercial de anticorpos. Para a produção dos mAbs 2H1 e 3E5 foi realizado uma otimização do processo, nos quais foram utilizadas as linhagens celulares CHODHFR^{-/-}, NSO-BCL-2 e ExpiCHO-S. O sistema ExpiCHO-S se mostrou mais eficiente pois reúne uma linha celular CHO de alta expressão. Assim, a partir dessa linhagem foi possível a produção de mAbs 3E5 híbridos em quantidades suficientes para a realização dos experimentos necessários (JAIN et al., 2017; KIM; KIM; LEE, 2012; TEY et al., 2000).

Na metodologia proposta neste trabalho, as linhagens CHODHFR^{-/-} e NSO-BCL-2 não apresentaram boa eficiência de produção. Esse resultado pode ser

ocasionado por instabilidade genética da linhagem celular, alteração no nível e consistência da expressão de cadeias pesadas e leves ou ainda desequilíbrios nas quantidades estequiométricas de cadeias pesadas e leves nas linhas celulares de produção. Tais desequilíbrios na produção das cadeias podem ser tóxicos para as células ou podem resultar em cadeias de imunoglobulina não funcionais no sobrenadante. Outras duas observações podem explicar essa ineficiência de produção. A primeira é que o design, o desenvolvimento do gene e do vetor de expressão são especificamente adaptados ao sistema de expressão para maximizar a expressão do mAb e a estabilização da linha celular por meio da otimização do códon da célula hospedeira e da adição de elementos altamente eficientes de transcrição, secreção, seleção e integração. Dessa forma, os vetores utilizados e adquiridos podem não ter sido os mais apropriados para as linhagens celular CHO DHFR^{-/-} e NSO-BCL-2, acarretando uma ineficácia de produção dos mAbs 2H1 e 3E5. A segunda observação é que os sistemas de produção baseados em cultura de células de mamíferos fornecem pouco controle sobre a glicosilação dos mAbs, podendo gerar mAbs com funcionalidade e estruturas modificadas (IANNELLO; AHMAD, 2005; SAMARANAYAKE et al., 2009; SIFNIOTIS et al., 2019).

Após padronizar a produção dos mAbs, focamos em analisar sua funcionalidade. Essa validação foi possível a partir da análise da fagocitose de *C. neoformans* opsonizados. Aumentar a função de macrófagos através de anticorpos parece ser um mecanismo de proteção. A opsonização melhora a detecção de antígenos de maneira eficiente por macrófagos e ajuda no desenvolvimento da imunidade mediada por células T. Além disso, a fagocitose mediada por anticorpos permite a redução do antígeno polissacarídico no tecido, inibe a proliferação fúngica por meio da resposta de receptores Fc e prolonga a sobrevivência. Todos esses efeitos ajudam a melhorar a função imunológica do hospedeiro (C. LEE et al., 1995; MUKHERJEE; LEE; CASADEVALL, 1995).

Diante da importância da fagocitose dentro do processo patológico desencadeado por *C. neoformans*, analisamos os mAbs 3E5 híbridos quanto a sua atividade fagocítica. Todos os mAbs 3E5 híbridos foram capazes de se ligar à cápsula de *C. neoformans* e aumentar a fagocitose por células semelhantes a macrófagos J774.16. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores demonstrando que os mAbs que se ligam a GXM são potentes opsoninas capazes de promover a fagocitose e morte de *C. neoformans* por células semelhantes a

macrófagos J774.16 e mAbs 2H1 ligado à GXM da cápsula gerou aumento da fagocitose por micróglia (C. LEE et al., 1995; MUKHERJEE; FELDMESSER; CASADEVALL, 1996; MUKHERJEE; LEE; CASADEVALL, 1995). Os mecanismos que geram um aumento na fagocitose provocado por mAbs 3E5 híbridos podem estar relacionados ao aumento na produção de óxido nítrico, uma vez que o óxido nítrico parece ser uma importante molécula antifúngica contra *C. neoformans*; relacionados a alterações na efetiva ativação de respostas mediadas por células T; ou ainda relacionados na mudança de estrutura que facilita as interações diretas do polissacarídeo capsular com receptores (ALVAREZ; SAYLOR; CASADEVALL, 2008; MOZAFFARIAN; BERMAN; CASADEVALL, 1995; YUAN et al., 1997).

Embora as taxas de fagocitose observadas no ensaio realizado sejam semelhantes, o mAb 3E5 IgG3 com dobradiça de IgG1 apresentou um maior índice de fagocitose se comparado aos outros mAbs 3E5 híbridos. Isso sugere que a dobradiça do mAb IgG1 pode favorecer o reconhecimento e fagocitose de *C. neoformans* por células J774.16 de forma mais efetiva. Assim, diferenças na atividade fagocítica de isotipos murinos sugerem diferenças funcionais que podem se traduzir em modificação da eficácia *in vivo* (LEE et al., 2019; MUKHERJEE; LEE; CASADEVALL, 1995). Do mesmo modo, mAbs quiméricos 18B7 com a região constante de IgG1 humana substituída foi mais potente na sua capacidade opsonica em relação ao seu precursor 18B7 murino. Esses dados mostram que a região constante pode alterar o estímulo à fagocitose de *C. neoformans* (ZEBEDEE et al., 1994). A eficácia opsonica provavelmente reflete a afinidade do anticorpo para o antígeno, a densidade do epítipo de superfície na célula alvo e o número de receptores Fc na célula efetora. Essas diferenças podem refletir em variação na especificidade do epítipo ou ainda posteriores diferenças de respostas *in vivo* (MACURA; ZHANG; CASADEVALL, 2007; VALIM; LACHMANN, 2008).

Os mAbs 2H1 e 3E5 para o polissacarídeo capsular GXM de *C. neoformans* compartilham os mesmos elementos gênicos, derivados de uma única linhagem de células B (MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992). Embora no início a interpretação era a de que os mAbs apresentavam a mesma especificidade, investigações posteriores observaram que a especificidade fina era diferente para cada mAb e um importante determinante da eficácia de proteção (MALISHENI et al., 2022; MCFADDEN; CASADEVALL, 2004; NAKOUZI et al., 2001). Diferenças de especificidade fina entre mAbs de idiotipos diferentes podem ser atribuídas a

mutações somáticas ou diferenças de aminoácidos na linhagem germinativa VH usada (CASADEVALL et al., 1994). Associado a isso, existem hipóteses de que a sinalização conformacional acontece através da interface VH/CH1, estabelecendo restrições estruturais e/ou cinéticas no sítio de ligação anticorpo-antígeno (PRITSCH et al., 1996). A partir de estudo utilizando técnicas de cristalografia, foi verificado que os aminoácidos dentro da ligação entre o domínio variável CH1 e CL são flexíveis e permitem reorganização espacial de modo facilitar a ligação do antígeno na região Fab (ROUX; GREENSPAN, 1994). Dessa forma, mudanças na região CH podem afetar a afinidade funcional e a especificidade do anticorpo por mecanismos que envolvem a flexibilidade do anticorpo e interações cooperativas (KHAMASSI et al., 2020; MALISHENI et al., 2022; TORRES et al., 2005).

O conhecimento antecipado dos efeitos das mutações do paratopo na ligação ao antígeno, do epítipo na ligação do anticorpo e da disponibilidade de vários anticorpos com especificidades finas diferentes contra o mesmo alvo podem ajudar a ultrapassar a resistência terapêutica relacionada à evolução do epítipo, além de evitar desfechos desfavoráveis durante a utilização de mAbs em tratamentos para criptococose (ROJAS, 2022). Análises da especificidade fina de mAbs foram realizadas em estudos anteriores. A partir de variantes de *C. neoformans* com cápsulas estruturalmente diferentes, que expressam GXM com a O-acetilação defeituosa foi observado que o isotipo IgG1 (protetor) não se liga ao polissacarídeo GXM de-O-acetilado, enquanto o IgG3 (não protetor) se liga com uma maior afinidade. Isso indica que o grupo acetil parece fazer parte do epítipo reconhecido pelos mAbs, sendo necessário para a integridade estrutural do epítipo (MCLEAN et al., 2002; MUKHERJEE; SCHARFF; CASADEVALL, 1992; TORRES et al., 2005)

A análise da especificidade fina dos mAbs 2H1 híbridos e 3E5 híbridos produzidos neste projeto foram realizados utilizando um polissacarídeo GXM de-O-acetilado quimicamente modificado, que possui uma O-acetilação alterada e uma cepa de *C. neoformans* mutante para o gene de *Cas1*, que produz uma enzima necessária para a O-acetilação de GXM (JANBON et al., 2001). Os ensaios realizados com os mAbs 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3 e 2H1 IgG3 com dobradiça de IgG1 demonstraram diminuir a ligação à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado e GXM derivado de *cas1Δ*, mantendo sua ligação à GXM derivado de H99. Isso demonstra que quando são adicionados os fragmentos da região CH1 do mAb 2H1 IgG1 em mAbs 2H1 IgG3 eles possivelmente alteram sua

especificidade fina de modo a não se ligar mais à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado e GXM derivado de *cas1Δ*. Já o mAb 2H1 IgG1 e o mAb híbrido 2H1 IgG1 com dobradiça de IgG3 manteve sua especificidade de não ligação à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado e GXM derivado de *cas1Δ*. Esses dados indicam que, as regiões CH1 e dobradiça de mAbs 2H1 IgG1 podem estar relacionados com a alteração da especificidade fina. Uma limitação deste ensaio foi a não inclusão do mAb 2H1 IgG3 por insuficiência da concentração obtida no ensaio de produção 1 (conforme dados apresentados na tabela 3), inviabilizando a obtenção de um resultado adequado.

Os ensaios realizados com os mAbs 3E5 híbridos indicaram que o 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3 e 3E5 IgG3 com dobradiça de IgG1 influenciaram sua especificidade fina ocasionando uma diminuição da ligação à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado e GXM derivado de *cas1Δ*. O mAb 3E5 IgG1 com dobradiça de IgG3 de maneira contrária demonstrou aumentar a ligação à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado e GXM derivado de *cas1Δ*. O par de mAbs 3E5 IgG1 e 3E5 IgG3 não híbridos se comportaram de maneira similar ao descrito na literatura. Ao ser testado o mAb 3E5 IgG1 perde sua afinidade à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado, enquanto o mAb 3E5 IgG3 mantém sua ligação à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado. Esses dados reforçam o indício de que a região constante afeta a especificidade fina e possivelmente a afinidade da região variável e que o grupo O-acetil faz parte do local de reconhecimento pelos mAbs 3E5 híbridos. Além disso, indica uma participação de fragmentos da região CH1 de mAbs 3E5 IgG1 e região da dobradiça tanto de 3E5 IgG1 quanto de 3E5 IgG3 na alteração da região variável afetando a ligação anticorpo-antígeno.

Um mecanismo potencial para essas alterações na especificidade fina são as mudanças nos arranjos espaciais das regiões variáveis após a modificação das regiões constantes. Essas modificações estruturais podem alterar as interações inter/intramoleculares das regiões variáveis, alterando seu arcabouço de ligação e assim influenciando na sua funcionalidade e sua ligação à GXM de-O-acetilado quimicamente modificado e GXM derivado de *cas1Δ* (BOUNE et al., 2020; EDWARDS et al., 2022; HIGEL et al., 2016; REVERBERI; REVERBERI, 2007; ZHENG; BANTOG; BAYER, 2011). Uma outra hipótese para esses achados de modificação de especificidade fina por mudança de regiões CH1 e dobradiça é a glicosilação dos mAbs 2H1 e 3E5 híbridos na região Fab durante a sua produção

(FRILIGOU et al., 2021; HOSSLER; KHATTAK; LI, 2009). A glicosilação do anticorpo é uma modificação pós-traducional comum e tem um papel crítico na função efetora do anticorpo. Glicofomas específicas são necessárias para alcançar a eficácia terapêutica. Uma vez que a glicosilação é específica do tipo de célula utilizado durante a produção do mAb, células hospedeiras diferentes contêm padrões de oligossacarídeos diferentes, afetando suas funções biológicas. Vários mecanismos sobre como o O-glicano e N-glicano, em regiões variáveis do anticorpo, afetam a ligação ao epítopo foram propostos, incluindo o tamanho do molécula para preencher o espaço entre o epítopo do antígeno e o paratopo do anticorpo (SONG et al., 2013; VAN DE BOVENKAMP et al., 2018), a interação carga-carga entre O-glicano/N-glicanos de ácidos siálicos e o antígeno (KANYAVUZ et al., 2019; VAN DE BOVENKAMP et al., 2018), e através de efeitos de impedimento estérico que podem afetar a ligação (JACQUEMIN et al., 2006). Assim, os mAbs 2H1 e 3E5 após modificação de suas regiões constantes podem ter influenciado na alteração do padrão de glicosilação de sua região Fab. Dessa forma, seria de grande interesse a análise da glicosilação apresentada por esse grupo de mAbs 2H1 híbridos e 3E5 híbridos, a fim de verificar possíveis alterações nas glicosilações pós-traducionais.

Durante a produção de mAbs anti-criptocócicos, em estudos anteriores, foi observado que mAbs de isotipos diferentes apresentavam respostas diferentes, nos quais os mAbs IgG1 eram protetores e IgG3 não protetores (MCLEAN et al., 2002; MUKHERJEE et al., 1995; NUSSBAUM et al., 1997; YUAN et al., 1995). Esses achados se correlacionam com o padrão de ligação do mAb ao polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*. O padrão anular é caracterizado por uma borda estreita, nítida e contínua ao redor de toda a cápsula, enquanto o padrão puntiforme é um padrão descontínuo de manchas que é mais difuso/pontilhado. O padrão anular se correlaciona com a capacidade do mAb de proteger os camundongos contra a infecção pelo sorotipo D, enquanto o padrão puntiforme se correlaciona com a não proteção do mAb contra esse sorotipo (CASADEVALL; PIROFSKI, 2005; NUSSBAUM et al., 1997; MUKHERJEE et al., 1995).

A análise dos mAbs 2H1 e 3E5 híbridos produzidos foram realizados. Os mAbs 2H1 CH1F1, 2H1 CH1F2, 2H1 CH1F3 e 2H1 IgG3 com dobradiça de IgG1 apresentaram padrão de ligação anular ao polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*. Esses dados indicam que os fragmentos da região CH1 e dobradiça do mAb 2H1 IgG1 podem alterar o padrão de ligação à GXM da cápsula de *C.*

neoformans de mAbs 2H1 IgG3 híbridos de modo a modificar o padrão de ligação puntiforme para o padrão anular. O mAb 2H1 IgG1 com adição da dobradiça de 2H1 IgG3 e o mAb 2H1 IgG1 controle se comportaram de maneira semelhante ao observado na literatura. Contudo, uma limitação deste ensaio foi a não inclusão do mAb 2H1 IgG3 por insuficiência da concentração obtida no ensaio de produção 1 (conforme dados apresentados na tabela 3), inviabilizando a obtenção de um resultado adequado.

Em relação ao padrão de ligação dos mAbs 3E5 híbridos demonstramos que os mAbs 3E5 CH1F1, 3E5 CH1F2, 3E5 CH1F3 apresentaram padrão de ligação puntiforme. Isso indica que a alteração dos fragmentos da região CH1 de mAbs 3E5 IgG3 por fragmentos de CH1 de mAbs 3E5 IgG1 não foram capazes de alterar o padrão de ligação à GXM da cápsula. O mAb 3E5 IgG3 com dobradiça de IgG1 e o 3E5 IgG1 com dobradiça de 3E5 IgG3 apresentaram padrão de ligação anular. O fato do mAb 3E5 IgG3 apresentar padrão de ligação anular indica que a região da dobradiça é necessária, mas não suficiente para alterar o padrão de ligação, já que a adição da dobradiça de 3E5 IgG3 no mAb 3E5 IgG1 não alterou seu padrão de ligação. Esses achados corroboram com dados publicados recentemente, no qual o mAb 2H1 IgG3 com dobradiça de IgG1 modificou seu padrão de ligação de puntiforme para o padrão de ligação anular (OLIVEIRA et al., 2022). Isso traz indícios de que a modificação dessa região pode ocasionar um efeito padrão dos mAbs IgG, apoiando a hipótese da influência da dobradiça na resposta relacionada à alteração do padrão de ligação.

A partir dos experimentos realizados, foi possível obter três resultados. Primeiro, demonstramos que os mAbs 3E5 híbridos possuem função de opsonização, aumentando a fagocitose de *C. neoformans* por células semelhantes a macrófagos J774.16. Segundo, a região CH1 e a dobradiça dos mAbs de isotipo 2H1 IgG1 e 3E5 IgG1 podem ser as regiões responsáveis por influenciar a especificidade fina dos mAbs, ocasionando a alteração da ligação do anticorpo com o epítipo. Terceiro, a dobradiça do mAbs de isotipo 3E5 IgG1 quando inserida em 3E5 IgG3 modifica seu padrão de ligação de puntiforme para anular. Isso sugere que a região da dobradiça seja necessária, mas não suficiente para modificar a ligação ao antígeno.

Estes achados trouxeram indícios da influência da região constante na região variável de mAbs contra o polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*. Esses efeitos podem estar associados a sinalizações moleculares advindas da região

constante que acarretam modificações estruturais na região variável e conseqüentemente na interação com o epítopo ou podem estar associadas a glicosilação da região Fab a partir da produção dos mAbs, ocasionando a alteração da ligação ao epítopo. O estudo da região constante na funcionalidade de anticorpos IgG devem ser consideradas importantes no desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais para uso terapêutico, pois suas interações são complexas e imprevisíveis. Além disso, colaboram com o desenvolvimento de futuras vacinas, tratamentos e diagnósticos mais eficientes, eficazes e seguros para criptococose e outras doenças.

6 CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho obtivemos os seguintes resultados:

- Os mAbs 3E5 híbridos possuem função de opsonização, aumentando a fagocitose de *C. neoformans* por células semelhantes a macrófagos J774.16.
- A região CH1 e a dobradiça dos mAbs de isotipo 2H1 IgG1 e 3E5 IgG1 podem ser as regiões responsáveis por influenciar a especificidade fina dos mAbs.
- A dobradiça do mAb de isotipo 3E5 IgG1 quando inserida em 3E5 IgG3 modifica seu padrão de ligação de puntiforme para anular. Esses dados sugerem que a região da dobradiça seja necessária, mas não suficiente para modificar o padrão de ligação ao polissacarídeo GXM da cápsula de *C. neoformans*.

CAPÍTULO 2: RISCO DE TRANSFUSÃO DE PLASMA CONVALESCENTE COMO TERAPIA PARA COVID-19 ONDE A DENGUE É ENDÊMICA

RESUMO

A plasmoterapia é um tipo de tratamento bastante utilizado, principalmente, em doenças emergentes. A pandemia de COVID-19 mostrou ser uma oportunidade para a sua aplicação, uma vez que, em muitas regiões, ocorre falta de terapia e medicamentos específicos. Entretanto, é preciso deixar claro que, ainda que seja uma ferramenta valiosa, será preciso pensar em uma correta padronização do seu uso. A doença da COVID-19 acarretou a morte de mais de 7,58 milhões de pessoas até o início de 2023, por desenvolver reações graves ainda não completamente compreendidas. Além disso, a existência de doenças recorrentes como a dengue em regiões endêmicas alerta para riscos de novas complicações em caso de coinfeção do vírus SARS-CoV-2 e DENV. A limitação de recursos em grande parte desses locais ocasiona a subnotificação desses casos. Devido à alta incidência de COVID-19 e dengue em regiões tropicais, casos de coinfeção podem ocorrer com maior frequência. Nesses locais, a plasmoterapia é uma boa opção para o tratamento da COVID-19. Porém, pode desencadear o desenvolvimento de efeitos como o *antibody-dependent enhancement* (ADE), que é considerado fator de risco para o agravamento da dengue. A fim de avaliar esses riscos, realizamos testes de sorologia de dengue em doadores de plasma convalescentes para COVID-19 para analisar a incidência de pessoas com presença de anticorpos IgG e/ou IgM contra os 4 sorotipos de dengue. Experimentos revelaram que cerca de 25% dos doadores apresentaram sorologia IgG positiva, enquanto aproximadamente 5% apresentaram sorologia positiva para IgM de dengue. Desses, cerca de 3% apresentaram sorologia positiva tanto para IgG quanto para IgM. Esses dados demonstraram uma alta taxa de doadores com presença de anticorpos IgG de dengue, indicando o risco de desenvolvimento de complicações por ADE, em pacientes coinfectados. Assim, entender e discutir sobre a ocorrência dessa complicação durante a plasmoterapia para COVID-19 em pacientes coinfectados em regiões endêmicas de dengue é essencial para não piorar a evolução do paciente. Além disso, esses conhecimentos

podem ser aplicados em caso de surgimento de novas variantes ou de doenças futuras semelhantes.

Palavras-chave: Plasmoterapia, Sorologia, Doença Endêmica, Coinfecção

ABSTRACT

Plasma therapy is a type of treatment widely used, mainly in emerging diseases. The COVID-19 pandemic proved to be an opportunity for its application, since, in many regions, there is a lack of therapy and specific drugs. However, it must be made clear that, even though it is a valuable tool, it will be necessary to think about correctly standardizing its use. The COVID-19 disease caused the death of more than 7,58 million people by the beginning of 2023, due to the development of severe reactions that are still not completely understood. In addition, the existence of recurrent diseases such as dengue in endemic regions warns of the risk of new complications in case of coinfection of the SARS-CoV-2 and DENV. The limitation of resources in most of these places causes the underreporting of these cases. Due to the high incidence of COVID-19 and dengue in tropical regions, cases of coinfection may occur more frequently. In these places, plasma therapy is a good option for treating COVID-19. However, it can trigger the development of effects such as antibody-dependent enhancement, which is considered a risk factor for severe the worsening of dengue. To assess these risks, we performed dengue serology tests on convalescent plasma donors for COVID-19 to analyze the incidence of people with IgG and/or IgM antibodies against the 4 dengue serotypes. Experiments revealed that about 25% of donors had positive IgG serology, while approximately 5% had positive serology for dengue IgM. Of these, about 3% had positive serology for both IgG and IgM. These data demonstrated a high rate of donors with dengue IgG antibodies, indicating the risk of developing complications due to antibody-dependent enhancement in coinfecting patients. Thus, understanding and discussing the occurrence of this antibody-dependent enhancement complication during plasma therapy for COVID-19 in coinfecting patients in dengue-endemic regions is essential in order not to worsen the patient's evolution. In addition, this knowledge can be applied in the event of the emergence of new variants or similar future diseases.

Keywords: Plasma therapy, Serology, Endemic Disease, Coinfection

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO DO ENSAIO CLÍNICO COM PLASMA DE CONVALESCENTE DA COVID-19

No início da pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) o grupo do Dr. André Moraes Nicola, da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, em colaboração com outros grupos de pesquisa, desenvolveram um ensaio clínico randomizado de fase IIa no intuito de testar se a terapia com plasma de convalescentes da COVID-19 seria eficaz na prevenção do agravamento do quadro em pacientes internados com COVID-19 de grau moderado. Foi realizado no hospital responsável pelo atendimento da maior parte dos pacientes com COVID-19 no início da pandemia, Hospital Regional da Asa Norte (HRAN), localizado na Asa Norte, Brasília, Distrito Federal. Após análises de dados dessa colaboração indicando que o uso de plasma de convalescente em pacientes internados com COVID-19 moderada não possuía boa eficácia, o ensaio clínico foi paralisado. A partir da participação neste ensaio clínico surgiram dois projetos paralelos. O primeiro visando a pesquisa e identificação de anticorpos que se ligassem de forma específica ao vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), podendo ser utilizados posteriormente na terapia e diagnóstico da COVID-19, e o segundo buscando analisar e discutir o possível desenvolvimento de complicações por ADE na utilização de plasmoterapia para tratamento de COVID-19 em pacientes coinfectedados com dengue.

1.2 COVID-19

1.2.1 Origem

No final de 2019, um novo vírus detectado em Wuhan, na China, deu origem a um complexo problema de saúde global. O primeiro relatório reportando pacientes com pneumonia de causa desconhecida à Organização Mundial da Saúde (OMS) ocorreu em 31 de dezembro de 2019. Em janeiro, foi detectado como agente etiológico um novo coronavírus diferente dos já conhecidos como os da Síndrome

Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e Síndrome Respiratória Aguda Grave do Coronavírus (SARS-CoV). Após o sequenciamento de seu genoma, a OMS nomeou o novo coronavírus de SARS-CoV-2 e sua doença de COVID-19. Apesar do esforço para conter a doença, sua disseminação por outros continentes ocorreu rapidamente. Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi declarada uma pandemia (LI et al., 2021; OMS, 2020).

Com grande capacidade de evolução genética, o SARS-CoV-2 desenvolve mutações ao longo do tempo. Diferentes subconjuntos de mutações presentes em uma mesma cepa podem ser classificados como diferentes variantes que se caracterizam por sua transmissibilidade, gravidade da doença e capacidade de escapar da imunidade humoral. O aumento da transmissibilidade é demonstrado pela capacidade de uma variante em competir com outras variantes e exibir uma taxa de reprodução efetiva e/ou de ataque secundário mais alta em comparação com outras variantes circulantes (MARIA et al., 2022). Durante o curso da pandemia, foram descritas novas variantes, as quais cinco foram consideradas mais preocupantes pela OMS, devido ao impacto na saúde pública global. Essas variantes são denominadas Alfa, Beta, Gama, Delta, Ômicron e Éris (EG.5) (ABBASI, 2023; CASCELLA et al., 2022). A variante Alfa apresentou aumento de cerca de 50% na transmissibilidade, aumentando a mortalidade; a Beta aumentou a evasão imunológica e transmissibilidade em 50%; a Gama aumentou a transmissibilidade e gravidade da doença; a Delta é quase duas vezes mais contagiosa que as variantes anteriores e pode causar doenças mais graves, aumentando a mortalidade; a Ômicron possui mais de 50 mutações na proteína *spike* e acarreta o aumento do risco de gravidade da doença; e a Éris demonstrou aumento nos casos de hospitalizações (ABBASI, 2023; AL-AWWAL et al., 2022; HERNÁNDEZ-ACEITUNO; GARCÍA-HERNÁNDEZ; LARUMBE-ZABALA, 2023).

1.2.2 Vírus SARS-CoV-2 e seu mecanismo de ação

O SARS-CoV-2 é considerado o terceiro coronavírus a causar uma pandemia com doença grave em humanos nas últimas duas décadas. Este vírus possui características geneticamente semelhantes aos coronavírus de morcego. O SARS-CoV-2 compartilha cerca de 79% de sua sequência genética com os responsáveis

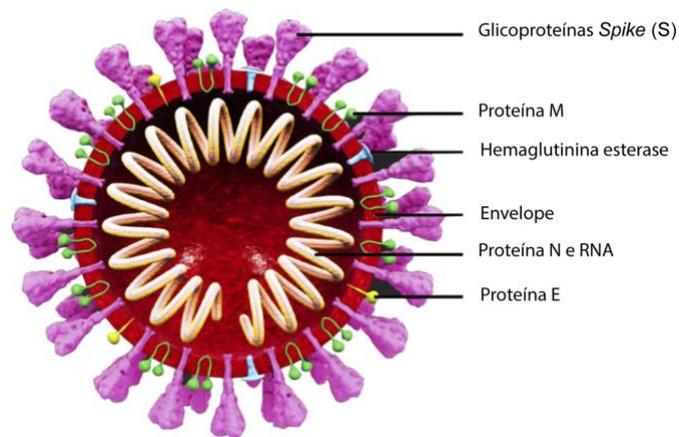
pelo SARS e 50% com os responsáveis pela MERS. Pertencentes aos betacoronavírus, são vírus compostos por RNA de fita simples de sentido positivo e com envelope, variando seu tamanho entre 60 nm e 140 nm de diâmetro, com projeções semelhantes a coroas em sua superfície devido a presença de glicoproteínas (LU et al., 2020a).

O genoma do coronavírus é composto por aproximadamente 30.000 nucleotídeos. Ele codifica quatro proteínas estruturais, membrana (M), considerado o organizador central da montagem do vírus; *spike* (S), composta por três cadeias idênticas com 1273 resíduos de aminoácidos cada, possuindo duas regiões de domínio proteico bem definidas, as subunidades S1 e S2, que estão associadas ao reconhecimento celular e à fusão das membranas virais e celulares, respectivamente (BOOPATHI; POMA; KOLANDAIVEL, 2021); envelope (E), envolvida na entrada do vírus e nucleocapsídeo (N) que regula o processo de replicação viral (Figura 18) (UZUNIAN, 2020). Além dessas proteínas, possuem ainda 16 proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NSP7, NSP8, NSP9, NSP10, NSP11, NSP12, NSP13, NSP14, NSP15 e NSP16), que desempenham inúmeras funções nos processos de replicação e montagem do vírus. Todo esse arcabouço favorece a instalação, replicação e montagem do vírus (WU et al., 2020; YAN et al., 2022).

No início da infecção, o SARS-CoV-2 tem como alvo, principalmente, as células epiteliais nasais, brônquicas e pneumócitos. Nestas, estão presentes receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) que se ligam às subunidades S1. As subunidades S2 são responsáveis por ancorar a proteína S na membrana. Após a ancoragem, ocorre uma clivagem por *transmembrane serine protease 2* (TMPRSS2) de superfície ou proteases endossomais como Catepsina L, no local interno da subunidade S2 denominado sítio S2', liberando o peptídeo de fusão. Todas essas interações geram alterações conformacionais responsáveis pela formação de poros de fusão, permitindo a entrada do vírus na célula e a liberação do genoma viral no citoplasma. Em seguida, o material genético viral inicia seu processo de transcrição/tradução e replicação (JACKSON et al., 2022). O genoma viral recém-sintetizado forma um complexo com a proteína N para a montagem de novas partículas SARS-CoV-2 em um evento mediado pela proteína M e com contribuições da proteína E. Novas partículas virais emergem do retículo endoplasmático e são transportadas através de vesículas para serem liberadas no meio extracelular por

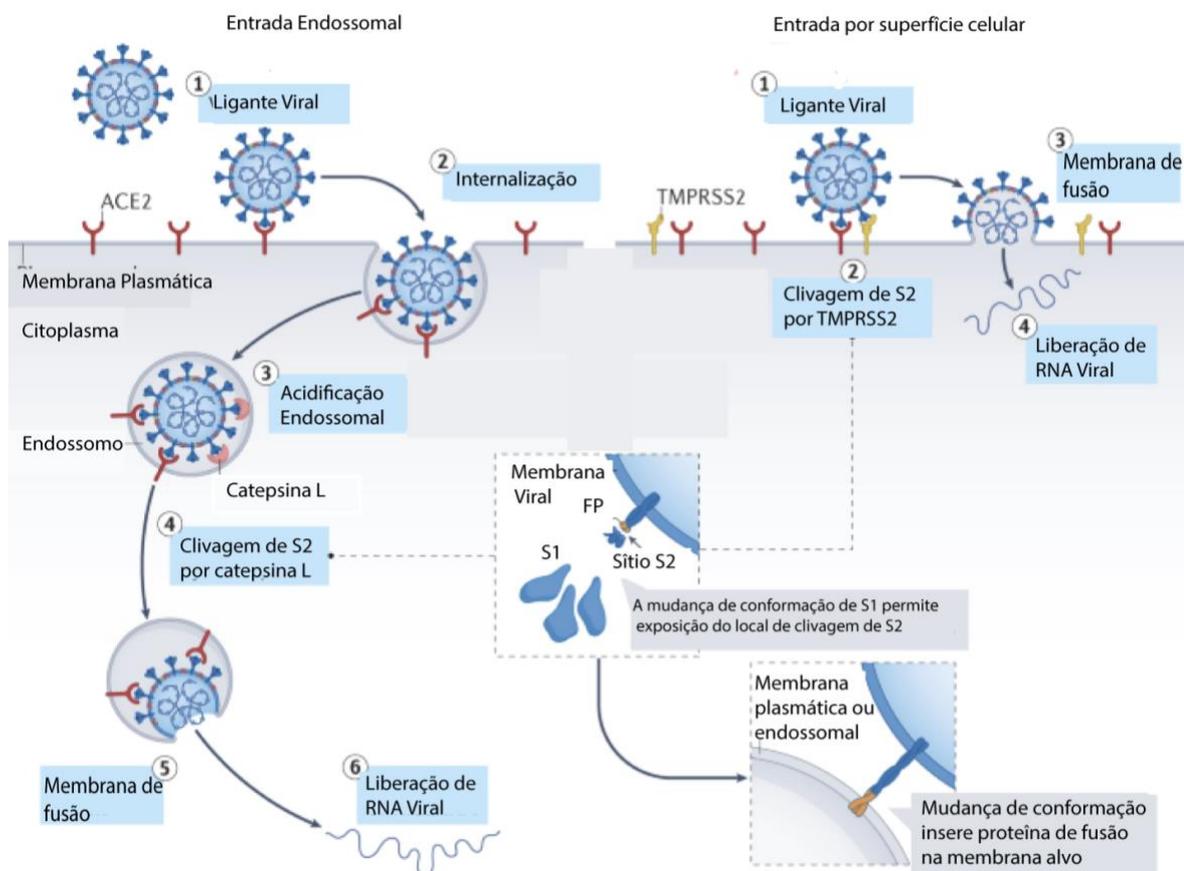
exocitose (Figura 19). As interações do vírus com as células causam alterações no sistema renina-angiotensina-aldosterona com efeitos nocivos como remodelamento cardíaco, vasoconstrição, lesão aguda pulmonar e permeabilidade vascular, desencadeando eventos graves, que podem levar a morte (DE FIGUEIREDO NETO et al., 2020; MARIA et al., 2022).

Figura 17 - Estrutura do SARS-CoV-2



Representam as estruturas de glicoproteínas *Spike* (S), Proteína M, Hemaglutinina esterase, Envelope, Proteína N e RNA e Proteína E. Fonte: Adaptado de (D'ANGELO; PALMIERI, 2020).

Figura 18 - Vias de entrada do vírus SARS-CoV-2



Dois eventos de clivagem de proteína *spike* (S) são necessários para o processo de entrada do coronavírus: um na junção das subunidades S1 e S2 e outro no local S2', interno à subunidade S2. No caso do SARS-CoV-2, S1-S2 é clivada durante a maturação do vírus em uma célula infectada, mas o sítio S2' é clivado após a ligação da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) na célula-alvo. A ligação do vírus a ECA2 (etapa 1) induz alterações conformacionais na subunidade S1 e expõe o local de clivagem S2' na subunidade S2. Dependendo da via de entrada do SARS-CoV-2, o sítio S2' é clivado por diferentes proteases. Via indicada na esquerda: Se a célula-alvo expressar protease de serina transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) insuficiente ou se um complexo vírus-ECA2 não encontrar TMPRSS2, o complexo vírus-ECA2 é internalizado via endocitose mediada por clatrina (etapa 2) nos endossomos, onde a clivagem S2' é realizada por catepsina L, que requer um ambiente ácido para sua atividade (etapas 3 e 4). Via indicada na direita: Na presença de TMPRSS2, a clivagem S2' ocorre na superfície da célula (etapa 2). Em ambas as vias de entrada, a clivagem do sítio S2' expõe o peptídeo de fusão (FP) e a dissociação S1 de S2 induz mudanças conformacionais significativas na subunidade S2, impulsionando o peptídeo de fusão para a frente na membrana alvo, iniciando assim a fusão da membrana (etapa 5 à esquerda e etapa 3 à direita). A fusão entre as membranas virais e celulares formam um poro de fusão, no qual o RNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira para replicação (etapa 6 à esquerda e etapa 4 à direita). Fonte: Adaptado e descrito em (JACKSON et al., 2022).

1.2.3 Epidemiologia e Clínica

Até agosto de 2023, foram confirmados mais de 770 milhões de casos e 7 milhões de mortes por COVID-19 globalmente (OMS, 2023b). Atualmente, as subnotificações de casos de COVID-19 acarretam números sobre infecções e

reinfecções globais abaixo do real. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde até o período 21/03/2023, foram registrados 37.204.677 casos confirmados de COVID-19 e mais de 699.917 óbitos. Esses dados mostram a gravidade dessa doença (BRASIL, 2023b).

A COVID-19 é uma doença do sistema respiratório altamente contagiosa que afeta diretamente o parênquima pulmonar. Possui um período de incubação entre 2 e 14 dias. A transmissão de pessoa para pessoa pode ocorrer por meio de gotículas contendo partículas infecciosas espalhadas pela fala, tosse ou espirro, que podem atingir as membranas mucosas dos olhos, nariz ou boca como porta de entrada, ou por contato direto com superfícies contaminadas. Em humanos, podem causar infecções assintomáticas ou acompanhadas de febre, tosse, cansaço, falta de ar e irritação gastrointestinal. Em alguns casos, os pacientes podem ter ainda fortes dores, congestão nasal, corrimento nasal, dor de garganta, diarreia, perda de paladar ou olfato, tremores e calafrios (RAHMAN et al., 2020).

Os quadros mais graves acometem principalmente grupos de indivíduos com comorbidades e idade avançada. O desencadeamento de pneumonia grave é uma das principais causas de complicações da doença. Outro fator que pode gerar uma piora na COVID-19 é a inflamação prolongada dos pulmões, que ocorre a partir de células imunológicas específicas, como células T e macrófagos alveolares infectados pelo vírus, responsáveis por modular a expressão de moléculas e citocinas importantes do sistema imunológico. Além do pulmão, estudos recentes mostraram que essa doença pode afetar diversos órgãos e causar o desenvolvimento de sintomas extrapulmonares. Esses sintomas, muitas vezes, podem levar a um diagnóstico tardio ou até mesmo incorreto, sendo prejudicial aos pacientes (AL-AWWAL et al., 2022; GAVOTTE et al., 2019).

1.2.4 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico precoce e seguro da COVID-19 é de extrema importância. Atualmente, podem ser usados testes de *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), ELISA, imunoenaios de fluxo lateral, imunoenasão de quimioluminescência, amplificação isotérmica mediada por *loop*, biosensores, dentre outros (AGHAMIRZA et al., 2022). Destes, o ensaio de RT-PCR representa o padrão

ouro para o diagnóstico, sendo aprovado por diferentes agências reguladoras nacionais e internacionais. A especificidade da maioria dos ensaios de PCR comerciais para SARS-CoV-2 aprovados pela FDA é de quase 100%, desde que não haja contaminação cruzada durante o processamento da amostra. Apesar da alta sensibilidade e especificidade do ensaio de RT-PCR, a necessidade de profissionais treinados, instrumentos e reagentes caros limitam sua aplicação, dificultando seu acesso principalmente em países de baixa renda. Dessa forma, testes de antígenos, que detectam proteínas virais e testes sorológicos, que detectam anticorpos dos hospedeiros, representam as técnicas mais amplamente utilizadas para monitorar a disseminação da infecção por SARS-CoV-2 por conta do seu baixo custo e fácil aplicabilidade (FILCHAKOVA et al., 2022). Contudo, menor especificidade e sensibilidade são obtidos na sua utilização, podendo gerar resultados incorretos ou inconclusivos (PEELING et al., 2022).

Os tratamentos existentes atualmente se baseiam em terapias antivirais e terapias direcionadas ao hospedeiro como anticorpos neutralizantes (plasmoterapia) e corticóides. Um dos antivirais utilizados para COVID-19 são os inibidores de polimerase. O remdesivir é um representante desse grupo e foi aprovado para uso pelo FDA (YUAN et al., 2023). Este é considerado um pró-fármaco, sendo capaz de inibir a atividade de RNA polimerases a partir do seu metabólito ativo. Embora, seu efeito clínico antiviral ainda seja controverso, estudos vêm demonstrando diminuição da hospitalização ou risco de morte em 87% dos pacientes em comparação com o grupo placebo (GOTTLIEB et al., 2022). Além disso, associações do remdesivir com baricitinibe também demonstraram encurtar o tempo de recuperação dos pacientes (KALIL et al., 2021). Outros grupos aplicados para terapia da COVID-19 são os inibidores de protease (nirmatrelvir mais ritonavir), inibidores da transcriptase reversa (azvudina, molnupiravir), além de outros antivirais (YU; CHANG, 2022).

Terapias utilizando mAbs também vem sendo bastante estudadas, sendo o Bamlanivimab o primeiro anticorpo monoclonal com eficácia para COVID-19. Este mAb demonstrou reduzir de forma significativa o risco de hospitalização e mortalidade subsequentes em pacientes com COVID-19 não hospitalizados (TAI et al., 2023). Sua associação com Etesevimab mostrou uma eficácia aumentada na diminuição da quantidade viral em pacientes ambulatoriais. Contudo, seu uso em associação foi descontinuado por não possuir atividade contra a Ômicron (JONES et al., 2021). Já o bebtelovimab se mostrou sensível para uso contra a variante Ômicron (IKETANI et

al., 2022). Além desses, medicamentos corticóides como dexametasona, budesonida, glicorticóides (hidrocortisona, metilprednisolona) demonstraram ser capazes de melhorar a sobrevivência em casos graves de COVID-19 (DC et al., 2020; STERNE et al., 2020; YUAN et al., 2023).

1.3 ANTICORPOS POLICLONAIS

Os anticorpos policlonais (pAbs) são utilizados desde o século 19 para tratamento e profilaxia após exposição contra agentes infecciosos, toxinas e doenças autoimunes. Podem ser usadas quando uma vacina não provoca uma resposta imune humoral com rapidez suficiente ou em conjunto com vacinas. Essas preparações de imunoglobulinas heterólogas são feitas a partir de *pools* de doadores humanos selecionados ou animais hiperimunizados com altos títulos de anticorpos contra alvos antigênicos específicos. Esses tratamentos com anticorpos fornecem transferência passiva de anticorpos de alto título no intuito de obter imunização imediata de curto prazo e reduzir o risco ou a gravidade da infecção. Além disso, tem sido utilizada com sucesso e segurança na superdosagem de medicamentos, envenenamento por toxinas de serpentes, aracnídeos, marinhos e vegetais, e profilaxia pós-exposição contra o vírus da raiva (PELLETIER; MUKHTAR, 2020; THARMALINGAM et al., 2022).

A escolha do uso de pAbs ou mAbs depende de vários fatores como a finalidade de uso e a disponibilidade do anticorpo no mercado. Os pAbs são caracterizados por alta avididade, alta sensibilidade para detectar proteínas de baixa quantidade e ampla especificidade para vários epítomos. Essa heterogeneidade dos pAbs reduz a probabilidade do patógeno ou agente desenvolver mutações de epítomos específicos para evadir do tratamento. Esses anticorpos podem ser gerados de forma mais rápida, com menos custos e habilidade técnica do que o necessário para produzir mAbs. Assim, em potenciais situações de pandemia podem ser produzidos em quantidades suficientes e com uma boa relação custo-benefício. Além disso, são mais estáveis em vários valores de pH e concentração de sal, enquanto os mAbs podem ser altamente suscetíveis a pequenas mudanças desses fatores. (LIPMAN et al., 2005). Um estudo demonstrou que pAbs equinos específicos de

região F(ab')₂ direcionados para fragmentos de *receptor-binding domain* (RBD) podem reduzir a mortalidade e eventos adversos graves, diminuindo a piora clínica (KIMBER et al., 2021).

No início da utilização de anticorpos policlonais, diversas reações adversas como hipersensibilidade do tipo I e III, e doença do soro dificultaram a sua aplicação. Com o passar do tempo e com acesso a novas tecnologias foi possível modificar essas moléculas no intuito de tornar eficaz e segura a sua aplicação. A remoção da porção Fc com retenção dos componentes imunogênicos F(ab)/F(ab')₂ foi aplicada pela primeira vez ao anti-soro de digoxina em 1976 (BISMUTH; BAUD; PONTAL, 1976). Quaisquer reações que pudessem ser mediadas pelo complemento, receptores, citocinas e quimiocinas foram reduzidas pela eliminação de endotoxinas bacterianas (pirogênios), de proteínas e agregados celulares, através de pasteurização, ultrafiltração e cromatografia. Esta combinação de pureza e avanço dos processos de manipulação fizeram os eventos adversos graves diminuir drasticamente tornando essa terapia confiável, segura e eficaz. Contudo, a aplicação destas técnicas necessita de investimento e profissionais qualificados, tornando o processo mais dispendioso e menos viável em determinadas regiões (DIXIT et al., 2016; PINA; LOWE; ROQUE, 2014). Apesar disso, a utilização de pAbs para tratamentos é um tema de grande relevância e interesse.

1.4 TERAPIA COM PLASMA DE CONVALESCENTE PARA COVID-19

Vários tratamentos como mAbs e vacinas para pacientes com COVID-19 vem sendo testados e utilizados desde o início da pandemia. Apesar do desenvolvimento e sucesso da vacina, o potencial surgimento de variantes resistentes à vacina do SARS-CoV-2, bem como a diminuição da imunidade induzida pela vacina, podem comprometer seu impacto positivo. Isso demonstra a necessidade de terapias complementares para controle da doença. Além disso, os efeitos colaterais de longo prazo de vacinas e medicamentos ainda não são completamente conhecidos (SALEH, 2023). Dessa maneira, o uso do plasma de convalescente (PC) ainda continua sendo uma opção de terapia para COVID-19 e outras doenças futuras (BROWN; MCCULLOUGH, 2020; JAMKHANDE et al., 2021; MOUFFAK et al., 2021).

PC é a parte líquida do sangue coletada de pacientes que após se recuperarem de uma infecção produz anticorpos específicos contra uma determinada doença. Esses anticorpos são coletados por aférese e transfundidos para pacientes que sofrem da mesma doença no intuito de obter uma proteção passiva (PENG; RHIND; BECKETT, 2021). Sua eficácia inicial foi descrita durante o surto de influenza espanhola em 1900 (LUKE et al., 2006). Esse tipo de tratamento já tem sido usado em outros surtos, como sarampo, parvovírus B19, Ebola, SARS e MERS-CoV (BAKHTAWAR; USMAN; KHAN, 2020; MARANO et al., 2016; VAN GRIENSVEN et al., 2016).

O PC da COVID-19, ou seja, plasma coletado de indivíduos após a recuperação da COVID-19, surgiu como um dos principais tratamentos para a COVID-19. Sua utilização foi aplicada em pacientes em estágio inicial da doença, enquanto terapias monoclonais e vacinas estavam sendo desenvolvidas. Embora vários lugares tenham coletado PC para ensaios clínicos, seu uso foi mais notável nos EUA, onde foram desenvolvidos programas nacionais para aumentar as coletas para transfusões em pacientes hospitalizados graves ou com risco de vida. O uso de PC é considerado seguro, conferindo risco comparável à transfusão de plasma não imune. (BLOCH et al., 2021). Dessa forma, o PC com alto título de anticorpos é um tratamento ambulatorial precoce e eficaz com vantagens como baixo custo, ampla disponibilidade e rápida adaptação ao surgimento de variantes virais com mutações genéticas diante de uma doença em progressão (SULLIVAN et al., 2021). No entanto, muitas variáveis dessa terapia ainda necessitam de avaliação, como o intervalo de tempo limite de uso, o melhor período de coleta do plasma, os títulos de IgG/IgM dos doadores, a melhora clínica proporcionada pela terapia, sua eficácia e segurança em pacientes críticos ou não críticos e seus efeitos adversos (OLIVEIRA et al., 2021).

Diversos estudos foram realizados para analisar o uso de PC principalmente em doentes graves ou com risco de vida. Contudo, não se tem um consenso sobre a melhor forma de aplicação dessa terapia. O resultado de um estudo apresentado mostrou que a transfusão precoce (até 3 dias após a internação) de plasma de alto título está associada a menor mortalidade do paciente (KLASSEN et al., 2021). Um segundo ensaio demonstrou que na maioria dos pacientes não vacinados, a administração precoce de PC de alto título de anticorpos contra SARS-CoV-2 reduziu as hospitalizações ambulatoriais em mais de 50%. Para obtenção deste resultado, foi utilizado PC até o dia 9 após o início dos sintomas (SULLIVAN et al., 2021, 2022). Em um terceiro ensaio autores sugerem que a transfusão de PC de COVID-19 pode

estar associada a um benefício de diminuição da mortalidade para pacientes imunocomprometidos suscetíveis a infecções refratárias (SENEFELD et al., 2023). Além dessas pesquisas, outros estudos clínicos mostraram ainda a redução de 53%, 26% e de 35% a 50% na gravidade da doença, no tempo de internação e na mortalidade, respectivamente. O uso dessa terapia em diferentes doses e volumes mostrou a ocorrência de efeitos adversos em menos de 4% dos pacientes após tratamento (ABOLGHASEMI et al., 2020; LI; ER SAW; SONG, 2020; OLIVEIRA et al., 2022; XIA et al., 2020). Todos esses achados têm implicações para a saúde pública, especialmente em áreas com recursos limitados e desequilíbrios na distribuição de vacinas (GLATT et al., 2021).

Apesar da pandemia de COVID-19 estar em declínio, o vírus SARS-CoV-2 não possui uma tendência a desaparecer. Grande parte dos virologistas prevê que essa doença se tornará endêmica. Para pacientes com COVID-19 em países de baixa e média renda o custo e a disponibilidade do tratamento são fatores importantes a serem observados. Nesses locais existe grande dificuldade na obtenção de suprimentos de vacinas da COVID-19 e na aquisição de tratamentos. Embora existam desafios sistêmicos e específicos de transfusão, a terapia com PC continua sendo uma boa opção em países pobres (FEDSON, 2023). Um estudo para avaliar a eficácia clínica do tratamento com PC em pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI) com COVID-19 grave ou com risco de vida no Suriname, considerado uma região de baixa renda, demonstrou uma melhora significativa na sobrevivência em receptores de PC. O sistema utilizado neste estudo foi o *HemoClear*, considerado de baixo custo (BIHARIESINGH-SANCHIT et al., 2023). Dessa forma, aumentar o acesso ao tratamento com PC em países de baixa e média renda pode ajudar no controle da COVID-19 e seus agravos em caso de novas variantes. Além disso, é importante o desenvolvimento de pesquisas sobre o padrão de uso de PC para COVID-19 no intuito de inserir essa terapia de forma mais rápida e segura nos sistemas de saúde em caso de novas pandemias, endemias ou variantes resistentes aos tratamentos já aprovados.

1.5 DENGUE E ADE

1.5.1 Epidemiologia e Clínica

A dengue é uma doença transmitida por mosquitos fêmeas infectadas das espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. Causa cerca de 100 a 400 milhões de novos casos por ano em todo o mundo, com cerca de 96 milhões de ocorrências clínicas com alguma gravidade, chegando a 25.000 mortes. Ocorrem, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais, sendo encontrada em mais de 100 países. Acarreta anualmente epidemias nas Américas, Ásia, África e Austrália, sendo endêmica em diversos países como Filipinas, Vietnã, Índia, Colômbia e Brasil, nos quais foram relatados os casos mais frequentes de infecção por vírus da dengue (DENV) (SCHAEFER; PANDA; WOLFORD, 2023). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, durante o ano de 2022 ocorreram aproximadamente 1,5 milhões de casos prováveis de dengue no Brasil, com 1.473 casos de dengue grave e 1.016 óbitos. O centro-oeste foi a região de maior incidência (BRASIL, 2022).

O período típico de incubação da doença é de 4 a 7 dias, mas pode durar de 3 a 10 dias. As infecções podem ser assintomáticas ou apresentar sintomas como febre aguda leve, gripe, dores de cabeça, vômitos e dores nas articulações. Em casos mais graves, pode desencadear dengue hemorrágica, com aparecimento de manchas vermelhas na pele, sangramentos no nariz, gengiva, dor abdominal intensa e síndrome do choque da dengue, que se caracteriza por uma queda da pressão arterial por aumento da fragilidade vascular e extravasamento de plasma. Essa perda de fluidos desencadeia o choque hipovolêmico e falência de múltiplos órgãos. (BHATT et al., 2021; HALSTEAD, 2014; ULRICH; PILLAT; TÁRNOK, 2020).

1.5.2 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico clínico da dengue pode ser desafiador, dependendo em grande parte do estágio do processo infeccioso apresentado pelo paciente. Além da anamnese do paciente, vários ensaios são utilizados para o diagnóstico da dengue. O isolamento do vírus era considerado o método diagnóstico tradicional para detectar

a infecção pelo DENV. Contudo, por conta de limitações, como longo tempo de processamento e falta de praticidade, foi substituído pelo ensaio de RT-PCR, capaz de detectar infecção precoce por DENV e, posteriormente, pelo ensaio de ELISA que detecta o antígeno não estrutural 1 (NS1). A proteína viral NS1 é um alvo diagnóstico ideal porque é secretada por células infectadas e permanece mais tempo na corrente sanguínea de pacientes infectados por dengue, até 9 dias ou mais após o início da doença, em comparação com o RNA viral. Portanto, a maioria dos kits comerciais utiliza a detecção de NS1 como biomarcador para o diagnóstico de DENV devido a sua alta sensibilidade e especificidade e por utilizar tecnologia simples. Assim, esses ensaios de detecção de NS1 se tornaram o novo padrão para diagnóstico de dengue. Além desses, existem vários testes sorológicos disponíveis, incluindo ensaios de inibição da hemaglutinação, testes de fixação de complemento, ensaios *dot-blot*, *Western blotting*, imunofluorescência indireta e imunoensaio para detecção qualitativa de anticorpos IgM e IgG. Este último demonstrou ser um ensaio bastante útil para a detecção rotineira de DENV, ajudando na indicação diagnóstica de infecção primária ou secundária com base na proporção de IgM e IgG durante o desenvolvimento da doença (FISHER et al., 2023; LIMA; NUNES; DOS SANTOS, 2022; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

Pelo menos sete vacinas para DENV baseadas em diferentes tecnologias, incluindo vírus vivos atenuados, vírus inativados, DNA e proteínas recombinantes foram desenvolvidas e estão atualmente passando por diferentes fases de ensaios clínicos (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2018). A primeira recomendação de uma vacina contra a dengue (Dengvaxia) ocorreu nos EUA em 2021. Contudo, seu uso não foi aprovado em todos os países. Recentemente no Brasil, foi aprovada a vacina (Qdenga) direcionada para um público mais amplo e com eficácia de 66,2% (ANVISA, 2023). Embora vários medicamentos tenham sido explorados como potenciais terapêuticos para a dengue, nenhum demonstrou redução na viremia, manifestações clínicas ou complicações (WONG et al., 2022). Assim, o tratamento da dengue atualmente se concentra em cuidados de suporte (TAYAL; KABRA; LODHA, 2023).

1.5.3 Vírus da Dengue

O DENV pertence à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*. Se apresentam em 4 sorotipos diferentes, sendo eles DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. São chamadas de sorotipos porque variam na sua antigenicidade (KOTHAI; ARUL, 2020). Em 2015, foi relatado um novo sorotipo denominado DENV-5, demonstrando a ocorrência de mutações genéticas e adaptações para sua permanência no ecossistema (MUSTAFA et al., 2015). Possuem um tamanho pequeno de aproximadamente 50 nm e material genético composto de RNA de fita simples, de sentido positivo, com um genoma de 11 *kilobase* (kb). Considerado um vírion, contém três tipos de proteínas estruturais, incluindo capsídeo (C), envelope (E) e membrana (M) e sete proteínas não estruturais (NS) como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 dentro de sua estrutura envelopada (KOK et al., 2023).

O curso exato da infecção pelo vírus da dengue após uma picada do mosquito transmissor ainda não é completamente compreendido. O entendimento atual é que inicialmente o DENV interage com as células do hospedeiro, como células dendríticas e macrófagos, a partir da ligação de proteínas do envelope viral com moléculas das células alvo (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). A entrada canônica do vírus ocorre via endocitose mediada por clatrina e o baixo pH dentro do compartimento endossomal que permite a fusão entre DENV e a membrana endossomal. Como o ambiente endossômico é ácido, favorece a liberação do genoma do RNA que atua como RNA mensageiro (mRNA), inicialmente, e sofre tradução para produzir proteínas virais para sua replicação (SLON CAMPOS; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2018). A replicação viral ocorre na membrana intracelular induzida pelo vírus que forma um complexo com RNA viral, proteínas virais e fatores da célula hospedeira. Esse processo ocorre no retículo endoplasmático, que impede o reconhecimento dessas novas proteínas pelo sistema imune. Inicialmente, se tem a formação do nucleocapsídeo, caracterizada pela partícula de DENV no seu estágio imaturo. Em seguida, uma das proteínas produzidas, a proteína pré-M é clivada em proteína M, por ação da serina protease, sofrendo o processo de maturação e sendo liberada em sua forma infecciosa (ELSHUBER et al., 2003; KOK et al., 2023). Após ser lançado no espaço extracelular as células infectadas se movem para os gânglios linfáticos e

se espalham através do sistema linfático para outros órgãos (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Uma das primeiras linhas de defesa da replicação do DENV no estágio inicial é a produção de IFNs. Além disso, o vírus é reconhecido por receptores *Toll like* como, TLR-3 e TLR-7 e receptores de lectina C. Esses fazem parte do grupo de *Pattern recognition receptor* (PRR), responsáveis por ativar respostas antivirais. A ativação de vias dependentes e independentes de TLR resulta no aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-12, IL-8, IFN γ e IFN- α . Isso, juntamente com a ativação da via de sinalização *Signal transducer and activator of transcription 1/Janus kinase* (STAT1/JAK) por IFNs, resulta na produção de radicais de NO e ajuda a limitar a replicação e disseminação do DENV (Figura 20) (HO et al., 2005; NARAYAN; TRIPATHI, 2020).

Uma infecção primária induz a produção de anticorpos neutralizantes capazes de proteger o indivíduo a longo prazo do sorotipo específico da infecção inicial, mas não protege da infecção secundária por outro sorotipo. Isso ocorre, pois esses anticorpos normalmente têm atividade neutralizante fraca e tendem a se ligar a epítomos imunodominantes com baixa disponibilidade, resultando em taxas mais altas de reatividade cruzada e ADE. Essa reação facilita a entrada viral e aumenta ainda mais a infecção viral, ocasionando a dengue grave (TAYLOR et al., 2015). Apesar do evento de ADE ter mais probabilidade de ocorrer em uma segunda infecção, casos de dengue grave também podem ocorrer no contexto de infecção por um único sorotipo (KOTHAI; ARUL, 2020). Além disso, nem todos os casos de doença grave estão associados a ADE ou ocorrem por altas cargas virais. Em alguns casos, quando dengue grave é observada, a presença de RNA viral permanece indetectável, embora isso não garanta que o vírus tenha sido eliminado dos tecidos infectados (LIBRATY et al., 2002; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

1.6 MECANISMO DE ADE ATRAVÉS DA VIA DE SINALIZAÇÃO FC γ R

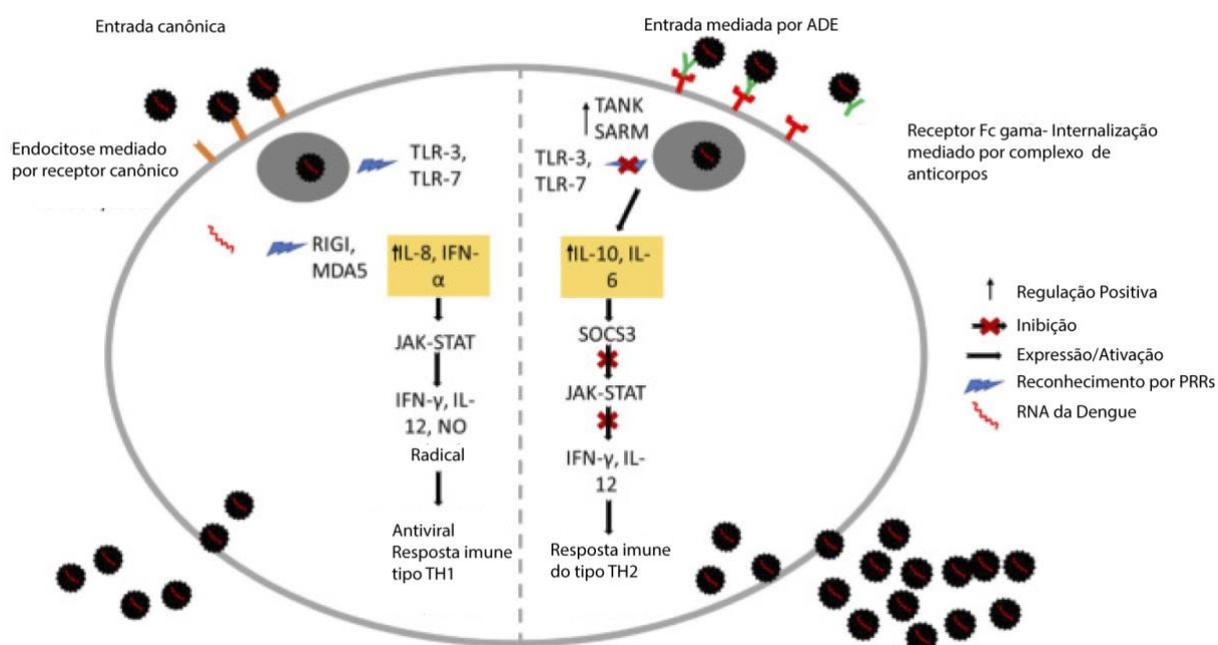
Diferente das infecções canônicas por dengue, a entrada de DENV após ser opsonizado por anticorpos sub-neutralizantes durante a reação de ADE ocorre por meio de uma via semelhante à fagocitose. A patogenicidade grave associada, principalmente, à infecção secundária por dengue parece ocorrer por meio de dois

mecanismos diferentes de ADE, denominados ADE extrínseco e ADE intrínseco. O ADE extrínseco é o aumento da captação de complexos vírus-anticorpo, aumentando a quantidade de células infectadas, enquanto o ADE intrínseco é a supressão das respostas imunes inatas e promoção da proliferação viral (SAWANT; PATIL; KURLE, 2023; WIKAN et al., 2015). O ADE intrínseco tem maior contribuição para aumentar a replicação do vírus da dengue em comparação com o ADE extrínseco. O mecanismo de ADE se baseia em anticorpos sub-neutralizantes que opsonizam partículas virais favorecendo a entrada desses imunocomplexos a partir da interação da região Fc de anticorpos com receptores Fc γ R ativador presentes em superfícies de células fagocíticas permitindo o aumento da ligação do vírus à superfície celular (CHAN et al., 2014).

A entrada de imunocomplexos mediados por ADE pode induzir a supressão da atividade antiviral de três formas diferentes. Primeiro, os imunocomplexos se ligam a receptores Fc γ RIIa aumentando proteínas relacionadas à autofagia como, *autophagy related 5* e *autophagy related 12* (Atg5-Atg12) e *Dihydroxyacetone kinase* (DAK), resultando na inibição da cascata de sinalização *Retinoic acid-inducible gene I/Melanoma Differentiation-Associated protein 5* (RIG-I/MDA-5), que são os componentes da via antiviral independente de TLR, resultando na supressão do interferon tipo 1 e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Segundo, a ação desses imunocomplexos podem aumentar a expressão de *sterile-alpha armadillo motif* (SARM), e ativador *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) associado à família TAF (TANK). O SARM e TANK inibem a expressão e sinalização de TLR-3 e TLR-7 em células infectadas com DENV. Os efeitos disso são a redução de citocinas do tipo Th1, como IL-12 e TNF α , e aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2, IL-10 e IL-6. Essas citocinas são responsáveis por causar a superexpressão do gene *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3), que acarreta diminuição da via JAK-STAT (Figura 20). Terceiro, a ligação de Fc γ R a *leukocyte immunoglobulin like receptor B1* (LILRB1), resulta na desfosforilação e inativação da *spleen tyrosine kinase* (Syk), um regulador chave da sinalização de Fc γ R, e supressão do *Interferon-stimulated gene* (ISGs). Esses três mecanismos reduzem a expressão de genes antivirais e suprimem a expressão de IFN do tipo 1, favorecendo a replicação de RNA viral da dengue (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; NARAYAN; TRIPATHI, 2020; SAWANT; PATIL; KURLE, 2023). Além disso, essas citocinas do tipo Th2 desempenham um papel na transformação de células B em células plasmáticas,

estimulando a produção adicional de anticorpos específicos para DENV, que ao invés de proteger o hospedeiro se tornam sub-neutralizantes desencadeando uma maior infecção celular, replicação e liberação viral. Toda essa cadeia de respostas alteradas pode ocasionar uma piora do quadro clínico da dengue (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; LEE et al., 2022; NARAYAN; TRIPATHI, 2020).

Figura 19 - Resposta imune inata durante a infecção por dengue ADE e não ADE



A entrada canônica não mediada por ADE ocorre via endocitose mediada por receptor. Após a entrada, as partículas de DENV são internalizadas nos endossomos e são reconhecidas pelos receptores de reconhecimento de patógenos TLR-3 e TLR-7. A liberação de RNA viral dos endossomos é reconhecida por RIGI e MDA5, o que desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e IL-8. Isso ativa a via JAK/STAT, resultando na expressão de radicais IFN- γ , IL-12 e óxido nítrico. A entrada do vírus via anticorpo Fc γ R em dengue-ADE causa a expressão de TANK e SARM que inibe a sinalização de TLR. A produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-6 ocorre e a expressão de SOCS3 como resultado inibe a via JAK/STAT. Essa modificação induz uma resposta do tipo TH2, anti-inflamatória, que promove a liberação de mais anticorpos sub-neutralizantes, responsáveis por auxiliar na entrada de DENV em células permissíveis. Fonte: Adaptado e descrito em (NARAYAN; TRIPATHI, 2020).

1.7 COINFECÇÃO DE DENGUE E COVID-19

A circulação de doenças como a dengue durante a pandemia da COVID-19 foi grande em diversos países, representando uma ameaça significativa à saúde pública. Uma pesquisa realizada na Angola com 105 indivíduos testados encontrou uma taxa de coinfeção de 10,3% de DENV e SARS-CoV-2 (SEBASTIÃO et al., 2022). Já no

Brasil, cidade de Brasília, a quantidade de pacientes com coinfeção foi de 13 e 43 em diferentes hospitais públicos (SCHULTE et al., 2021; TEOTÔNIO et al., 2021). Ambas as doenças compartilham características clínicas e laboratoriais semelhantes, dificultando sua diferenciação. A coinfeção está associada a muitos sintomas, como febre, dor de cabeça, mialgia, fadiga, diarreia, dor abdominal e vômitos (NASOMSONG; LUVIRA; PHIBOONBANAKIT, 2021). Além disso, tanto o DENV quanto o SARS-CoV-2 têm a capacidade de se infiltrar no SNC, causando danos graves e complicações neurológicas (DOMINGUES et al., 2008; HARAPAN et al., 2021). Já os achados laboratoriais demonstram a ocorrência de leucopenia, linfopenia, trombocitopenia, transaminase e glicose aumentadas. Essas semelhanças tornam o diagnóstico diferencial e o tratamento correto desafiador, especialmente em regiões tropicais onde as duas doenças coexistem. O desfecho e a dinâmica de cada uma das doenças, quando ocorrem simultaneamente, podem ser alterados. A coinfeção acarreta o aumento da gravidade e das complicações clínicas dos pacientes infectados por SARS-CoV-2 em comparação com o de uma única infecção. Em revisão sistemática, foi observado que a coinfeção por COVID-19 e dengue estava associada a complicações graves e desfechos fatais (OLADIPO; RABIU; TAJUDEEN, 2022; TSHETEN et al., 2021; YONG et al., 2022).

A associação entre SARS-CoV-2 e o DENV pode prejudicar as respostas imunes inatas e adaptativas. Na coinfeção ocorrem tempestades de citocinas que parecem desempenhar um papel fundamental na forma grave da dengue e da COVID-19. Níveis elevados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β , IL-8, *CXC motif chemokine ligand 9* (CXCL9), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e proteína 10 induzida por interferon gama (IP-10), bem como IL-10, foram correlacionadas com a gravidade da doença clínica. Além disso, a coinfeção pode resultar em comprometimento pulmonar grave, com aumento na expressão de molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e do *CC motif chemokine ligand 2* (CCL2) nos pulmões, induzindo maiores taxas de hospitalização e desfechos clínicos graves (YONG et al., 2022; ZHENG et al., 2021).

A coinfeção dessas duas doenças é considerada um desafio, especialmente em países mais pobres e que possuem recursos limitados. Nestes locais a dengue está recebendo menos atenção, ocasionando subnotificação de novos casos. Isso ocorre, principalmente, por remanejamento de recursos destinados a programas, como controle de vetores, para serem utilizados na COVID-19 (OLADIPO; RABIU;

TAJUDEEN, 2022). Além disso, os testes sorológicos que são os mais utilizados para um diagnóstico rápido e em estudos epidemiológicos apresentam uma precisão limitada e a possibilidade de reação cruzada muito alta (SADDIQUE et al., 2020). Estudos na Indonésia e Cingapura relataram alguns casos com resultados falso-positivos para dengue com base em testes sorológicos rápidos, que foram posteriormente confirmados como positivos para COVID-19. Anticorpos contra DENV podem reagir de forma cruzada com o RBD da proteína *spike* de SARS-CoV-2 com base em análise computacional. A reatividade cruzada sorológica entre DENV e SARS-CoV-2 pode dificultar o diagnóstico em locais endêmicos da dengue (SANTOSO et al., 2021; YAN et al., 2020). Dessa forma, é preferível confirmar o diagnóstico através do teste de RT-PCR conjuntamente aos testes de anticorpos. Essa detecção molecular precoce de ambos os vírus e o tratamento oportuno podem ajudar o paciente a obter uma recuperação favorável (ABORODE et al., 2022; NATH et al., 2021; ZEPEDA-CARRILLO et al., 2022).

Dados mostram que a coinfeção do SARS-CoV-2/DENV aumenta o número de hospitalizações e desfechos clínicos desfavoráveis (TEOTÔNIO et al., 2021; TSHETEN et al., 2021). Existem diversos desafios no diagnóstico diferencial e testes rápidos não específicos. A subnotificação de infecções concomitantes faz com que os dados atuais de coinfeção dessas duas doenças sejam insuficientes (DALUGAMA; SENEVIRATNE, 2023; PRAPTY et al., 2023). O ADE na doença da dengue demonstra grande relevância devido às suas graves consequências (FLIPSE et al., 2016). Diante dessas observações, surgiu a hipótese de que pacientes com COVID-19 que estão coinfectados com algum tipo de dengue podem desenvolver o fenômeno de ADE ao receber PC de doadores que possuam anticorpos IgG positivos para dengue. A abordagem desses conhecimentos pode contribuir no direcionamento do uso seguro e eficaz da plasmoterapia e nortear protocolos e diretrizes de triagem para condutas mais assertivas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar o risco de transfusão de plasma convalescente como terapia para COVID-19 onde a dengue é endêmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Verificar a taxa de doadores de plasma convalescente para tratamento de COVID-19 com anticorpos IgG positivos para um dos 4 sorotipos de dengue;
- Avaliar o risco de complicações por ADE em pacientes tratados com plasmoterapia que possam estar coinfectados com SARS-CoV-2/DENV;
- Discutir as implicações, os impactos e os riscos do uso da plasmoterapia em pacientes que estejam coinfectados com SARS-CoV-2/DENV em regiões endêmicas de dengue e com recursos limitados.

3 METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO DE DOADORES

A seleção dos doadores de plasma de convalescentes para COVID-19 foi realizada de acordo com critérios pré-estabelecidos pelo Hemocentro de Brasília, localizado na Asa Norte, Brasília, Distrito Federal. Para isso, os doadores preencheram um formulário no site, os quais foram submetidos a análise. Foram utilizados, para fins de elegibilidade, os seguintes critérios de exclusão: Ter endereço fora da Região de Desenvolvimento Integrado do Distrito Federal (RIDE), peso abaixo de 60kg, falta de confirmação laboratorial de infecção por SARS-CoV-2, sintomas atuais compatíveis com COVID-19, gestantes primigestas, menores de 18 anos e que preencheram erroneamente o formulário.

3.2 TRIAGEM DOS DOADORES

Dos 452 pacientes cadastrados no site do Hemocentro de Brasília a partir do formulário online para doação de plasma, apenas 180 foram selecionados para participar da pesquisa. Os que não atenderam a todos os critérios estabelecidos foram excluídos. Destes, 83 pacientes compareceram à entrevista, os quais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Um dos doadores passou por intercorrência durante a coleta e por este motivo não foi possível realizar sua triagem sorológica. Assim permaneceram nessa etapa 82 doadores. A idade dos participantes da pesquisa variou de 21 a 58 anos, sendo 25,61% dos doadores analisados do sexo feminino e 74,39% do sexo masculino.

3.3 COLETA DE SORO

Este estudo foi devidamente analisado e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), com registro de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 30931820.3.0000.5558. Todos os pacientes foram

orientados sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A entrevista e coleta de sangue foram realizadas no HUB (Hospital Universitário de Brasília), localizado na Asa Norte, Brasília, Distrito Federal. A coleta de sangue foi realizada por uma profissional da área de enfermagem devidamente treinada que coletou 4 mL de sangue em tubo identificado que continha gel separador. Após centrifugação, por 5 min a 2000g, o soro de cada doador foi dividido em 2 tubos criogênicos rotulados e armazenados à temperatura de -80°C na UnB, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal.

3.4 TESTE DE SOROLOGIA PARA COVID-19

A confirmação de anticorpos para COVID-19 foi realizada por meio de ensaio de quimioluminescência. A metodologia aplicada seguiu protocolo do Hemocentro de Brasília, Asa Norte, Brasília, Distrito Federal, sendo realizada por profissionais qualificados e especializados da instituição.

3.5 TESTES DE SOROLOGIA DE DENGUE

Para a realização dos ensaios de sorologia de dengue, as amostras de soro foram descongeladas e deixadas em gelo e, em seguida, foi realizado o teste rápido utilizando o kit da *WAMA Diagnostic* IgG e IgM. Utilizando o protocolo recomendado pelo fabricante, foram adicionados 10 µL de soro à lâmina de teste, seguidos de 3 gotas do tampão fornecido pelo kit. Após 10 min (máx. 15 min) de reação, os resultados qualitativos foram avaliados a olho nu. Com o aparecimento da linha avermelhada na zona de IgG eram considerados com sorologia positiva para IgG de dengue. Da mesma maneira, com o aparecimento da linha avermelhada na zona de IgM eram considerados com sorologia positiva para IgM de dengue. Apenas os testes que continham a linha de controle positivo foram considerados validados. A intensidade da cor não foi avaliada. Os dados qualitativos dos testes positivos e negativos para sorologia IgG e IgM de dengue foram adicionados em uma tabela e

transformados em porcentagem positiva e porcentagem negativa de sorologia IgG e IgM de dengue. Essas análises foram realizadas no programa *Excel* versão 16.46 para *MacOS*.

4 RESULTADOS

4.1 TESTE SOROLÓGICO PARA DENGUE DOS DOADORES DE PC

No teste rápido realizado para detectar a presença de anticorpos IgM e IgG para dengue foi possível verificar que dos 82 doadores de plasma, 20 doadores apresentaram sorologia IgG positiva para um dos 4 sorotipos de dengue, enquanto 62 apresentaram sorologia IgG negativa para dengue. Já para detectar a presença de anticorpos IgM de dengue foi verificado que dos 82 doadores de plasma, 4 doadores apresentaram sorologia IgM positiva para um dos 4 sorotipos de dengue, enquanto 78 doadores apresentaram sorologia IgM negativa para dengue (Tabela 9). Dos 4 doadores que apresentaram sorologia IgM positiva para dengue apenas 2 apresentaram, concomitantemente, sorologia IgG positiva. Assim, um total de 60 plasmas foram considerados aprovados para os estudos futuros na aplicação de plasmoterapia da COVID-19.

Tabela 9 - Sorologia de dengue dos doadores de plasma convalescente de COVID-19

Sorologia para um dos 4 sorotipos de dengue	IgG DENGUE	IgM DENGUE
Positivo	20	4
Negativo	62	78
Total	82	82

Quantidade de doadores positivos e negativos para sorologia de IgG e IgM.

5 DISCUSSÃO

Mesmo após a declaração do fim da pandemia pela OMS, a COVID-19 continua sendo uma doença relevante com agravamentos e sequelas significativas. A coinfeção SARS-CoV-2/DENV piora ainda mais esse quadro. A plasmoterapia é considerada uma das opções para tratamento de doenças emergentes. Embora seja uma ferramenta valiosa, ainda possui necessidade de padronização e avaliação dos riscos associados à sua aplicação. Um desses riscos é o desenvolvimento de complicações de ADE em pacientes tratados com plasma de doadores convalescentes para COVID-19 que possuem anticorpos IgG para algum dos 4 sorotipos de dengue. Assim, a análise e discussão dos benefícios e malefícios observados na utilização da plasmoterapia, principalmente em locais que possuem recursos limitados, norteiam a aplicação dessa terapia e esclarece riscos associados ao seu uso em determinados grupos, como os coinfectados com SARS-CoV-2/DENV.

O ensaio clínico randomizado de fase IIa desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. André Moraes Nicola foi realizado para avaliar o possível benefício da plasmoterapia em pacientes hospitalizados com COVID-19 moderada. Para isso, foram analisadas características demográficas e clínicas dos pacientes, como por exemplo, idade, sexo, comorbidades médicas, dentre outros. Esses dados colaboraram com o desenvolvimento de uma ferramenta denominada de índice de benefício do tratamento utilizada para quantificar o benefício relativo do tratamento com PC para cada paciente hospitalizado com COVID-19, ou seja, calcular a probabilidade do tratamento com PC beneficiar um paciente com COVID-19. Essa ferramenta possibilita uma melhor orientação e recomendação de tratamento, sendo útil em cenários de pandemia ou outras situações similares (PARK et al., 2022).

A análise dos resultados deste ensaio clínico realizado pelo nosso grupo demonstrou não haver associação entre a melhora clínica de pacientes que receberam a plasmoterapia de convalescente para COVID-19 e os pacientes que não receberam o tratamento. Dessa forma, para o grupo específico de pacientes com COVID-19 moderada essa estratégia terapêutica não demonstrou eficácia positiva. No estudo de meta-análise, no qual estes resultados apresentados foram inseridos, foram analisados mais 8 estudos internacionais. Nas observações encontradas por outros pesquisadores que colaboraram no COMPILE, também não foram observados

nenhuma associação do uso de plasmoterapia com melhores resultados clínicos em relação ao grupo de pacientes sem uso da terapia (TROXEL et al., 2022).

Apesar das evidências indicando a ineficácia do uso da plasmoterapia em pacientes com COVID-19 moderada, a aplicação dessa ferramenta para tratamento da COVID-19 ainda é controversa. Embora, recomendações contrárias à sua utilização tenham sido relatadas, muitas destas indicações foram baseadas em resultados negativos de estudos em pacientes hospitalizados que possuíam, muitas vezes, processo inflamatório avançado. Nestes casos, a plasmoterapia pode ser ineficaz no processo de reversão do quadro. Isso pode ter gerado resultados com interpretações errôneas do real efeito desse tratamento em pacientes moderados. Este fato foi demonstrado durante ensaio que verificou que a plasmoterapia em pacientes em estágio moderado quando aplicado em períodos iniciais dos sintomas (entre 3 e 9 dias) apresentaram eficácia positiva, acarretando a diminuição em 50% das hospitalizações. Da mesma maneira, o uso anterior de terapias com anticorpos apresentou eficácia no início da doença (CASADEVALL; PIROFSKI, 2023; GRUBOVIC RASTVORCEVA et al., 2022; LEVINE et al., 2023; VENTURA-ENRÍQUEZ et al., 2022). A eficácia do plasma de convalescente no início do COVID-19 é consistente com sua atividade antiviral e sua ineficácia na fase inflamatória. (CASADEVALL; PIROFSKI, 2023).

Os poucos estudos acerca da coinfeção SARS-CoV-2/DENV e das consequências do uso da plasmoterapia para COVID-19 neste grupo de pacientes são reflexos de subnotificação de casos de coinfeção, limitação de recursos e dificuldade no diagnóstico diferencial. Apesar da discussão científica insuficiente sobre o tema, para casos de coinfeção foram relatadas implicações como baixa contagem de linfócitos e monócitos circulantes, linfocitopenia e aumento de monócitos ativados. Essas complicações podem prejudicar as respostas imunes inatas e adaptativas, acarretando aumento de hospitalizações (SADDIQUE et al., 2020; TEOTÔNIO et al., 2021; YUAN et al., 2023; ZHOU et al., 2020b). Assim como essas implicações podem alterar o prognóstico do paciente, o desenvolvimento de complicações como ADE na dengue também podem modificar o curso da doença, piorando o prognóstico do paciente coinfectado. Esse risco pode ser intensificado por negligência na triagem assertiva e no diagnóstico da dengue em regiões endêmicas para a doença. Todos esses fatores durante a aplicação da plasmoterapia para

COVID-19 podem comprometer a segurança, eficácia e eficiência do tratamento e a melhora do paciente.

Para possibilitar a análise do risco de complicação por ADE, foram dosadas as sorologias de dengue dos doadores de PC de COVID-19. Embora os testes de ELISA sejam os testes laboratoriais mais comumente utilizados para verificar anticorpos IgG para dengue, estes são mais demorados e necessitam de reagentes específicos que não estavam disponíveis durante o desenvolvimento do projeto. Dessa forma, neste projeto foram utilizados testes sorológicos rápidos para detectar anticorpos IgG para dengue em doadores de PC de COVID-19. Este possui boa sensibilidade e especificidade, além de possuir um baixo custo, facilitando seu acesso durante a realização deste trabalho (LUO et al., 2019).

Neste estudo, foi possível verificar que aproximadamente 25% dos doadores de plasma de convalescentes de COVID-19 possuem anticorpos IgG positivos e 5% possuem anticorpos IgM positivos para dengue na região do Distrito Federal, considerada uma região endêmica para dengue. Essa alta taxa de sorologia positiva tanto para IgG quanto para IgM de dengue demonstra o alto risco de utilização de plasmoterapia para COVID-19 e o desenvolvimento de complicações por ADE em pacientes que possam estar coinfetados com dengue e utilizando a plasmoterapia. Esse risco se mostra relevante pois a maior parte dos casos de dengue na região do Distrito Federal e em regiões endêmicas para dengue são associadas a DENV 1 e DENV 2. Para esses dois sorotipos foram relatados um aumento acentuado na gravidade associado a uma infecção inicial por DENV 1 e uma infecção secundária por DENV 2. Além disso, algumas sequências de infecção, como DENV 1 seguido de DENV 2 e DENV 1 seguido de DENV 3, foram associadas também a uma maior gravidade da doença (GUZMÁN et al., 2002). Uma das limitações durante a realização deste projeto foi a não verificação da coinfeção SARS-CoV-2/DENV nos pacientes que receberam a plasmoterapia para COVID-19 durante a realização do ensaio clínico. A obtenção desse dado não foi viável pois o desenvolvimento deste projeto ocorreu após a paralisação do ensaio clínico. Com isso, a análise de possíveis desfechos como complicações ADE não puderam ser verificadas.

Embora o risco de ADE possa ser reduzido utilizando técnicas nas quais seja removido a região Fc dos anticorpos, minimizando a ativação de funções efetoras como ligação a receptores em células de defesa e a ativação do complemento, o custo e necessidade de estrutura laboratorial e profissionais qualificados dificultam a

aplicação dessa estratégia em regiões mais pobres que utilizam a plasmoterapia como ferramenta de tratamento. Assim, a implementação desse tipo de terapia seria inviabilizada (NOROUZNEJAD et al., 2022). Um estudo realizado no Suriname, considerado local de baixa renda, indica benefícios do uso de plasmoterapia em pacientes de UTI, a partir do uso de pequenos filtros denominados *HemoClear* (BIHARIESINGH-SANCHIT et al., 2023). Isso indica a necessidade de obtenção de informações e orientações de protocolos assertivos para aplicação da plasmoterapia na COVID-19 e o uso de tecnologias mais acessíveis em locais mais vulneráveis.

A existência de pacientes com sorologia IgM positiva nos testes realizados (5% dos doadores), pode ser considerada inconclusiva, já que a presença de anticorpos IgM para dengue pode permanecer circulante por mais de um ano após a infecção. Assim, pode representar a persistência de anti-DENV IgM do ano anterior e não uma infecção aguda (CHIEN et al., 2018). Para obter um diagnóstico mais assertivo a detecção do antígeno NS1 é o mais robusto de todos os métodos para dengue. Contudo, a detecção de NS1 pode ser prejudicada pela formação de imunocomplexos em infecções secundárias, encurtando assim sua janela de detecção. Nesse caso, a combinação da detecção de NS1 com a detecção de IgM e/ou IgG demonstrou melhorar drasticamente o diagnóstico positivo de dengue. Atualmente, existem testes de diagnósticos rápidos disponíveis que aproveitam essa abordagem em pontos de atendimento. Dessa forma, pode ser recomendado o uso desses testes combinados em locais com menos recursos por possuir sensibilidades de quase 100% e necessitarem de menos infraestrutura para serem aplicados (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

Assim, uma das possíveis condutas a serem implementadas para melhorar a segurança durante a aplicação da plasmoterapia para COVID-19 diante de um cenário de coinfeção SARS-CoV-2/DENV em regiões endêmicas para dengue é a adição de testes de diagnóstico combinados tanto para dengue quanto para COVID-19. A inserção desse protocolo durante a triagem pode minimizar os riscos de complicações por ADE durante o tratamento e possibilitam o desenvolvimento de ensaios clínicos mais eficazes, seguros e confiáveis. Além disso, podem diminuir diagnósticos incorretos que geralmente ocasionam na utilização de medicamentos que podem agravar o quadro do paciente (OLADIPO; RABIU; TAJUDEEN, 2022; WAGGONER et al., 2016).

Todos os conhecimentos aplicados neste trabalho podem ser utilizados em caso de surgimento de novas variantes e doenças emergentes futuras. Em agosto de 2023 foi relatada uma nova variante EG.5, que é considerada variante de risco. Sua prevalência global vem aumentando e embora não haja evidências de que causa doença mais grave, o número de hospitalizações e mortes vem crescendo (ABBASI, 2023). Além disso, o estudo dessa nova variante para compreensão da dimensão do grau de acometimento da saúde da população ainda está em estágio inicial. A COVID-19 ainda é uma doença relativamente nova e possui um campo em rápida mudança com uma base de conhecimento em constante evolução (COLTART; COLLET-FENSON, 2021). A perspectiva futura de surgimento de doenças emergentes e a resposta global à atual pandemia demonstra que há a necessidade urgente de uma padronização na abordagem para controle e prevenção de futuras pandemias (MCCLYMONT et al., 2022). Além disso, pensar em maneiras de conter essas possíveis emergências de saúde futuras, com a aplicação de ensaios clínicos bem delineados e executados mais rapidamente, a realização de triagens com protocolos e diretrizes que contemplem o diagnóstico diferencial de dengue e COVID-19 e a padronização de uso da plasmoterapia, ajudam no desenvolvimento de tratamentos eficazes, seguros, específicos e sensíveis para o controle da COVID-19 e de outras doenças futuras.

Portanto, foi possível observar uma alta taxa de doadores de plasma convalescente para COVID-19 com presença de anticorpos IgG para dengue na região do DF. Esse panorama demonstra o potencial risco de complicações por ADE durante a plasmoterapia para COVID-19 em pacientes que estejam coinfectados com SARS-CoV-2/DENV. A implementação de diretrizes e protocolos de triagem com inclusão de métodos diagnósticos rápidos para dengue e COVID-19 em locais endêmicos e com menos recursos podem minimizar os riscos associados a essa complicação. Além disso, foi observado a necessidade de desenvolvimento de ensaios clínicos bem delineados para permitir a padronização do uso de plasmoterapia para COVID-19 e outras doenças futuras. Todas essas ações ajudam a aumentar a viabilidade, eficácia, segurança e confiabilidade da plasmoterapia e podem ser aplicadas no surgimento de novas variantes ou de outras doenças futuras.

6 CONCLUSÃO

Ao longo deste trabalho obtivemos os seguintes resultados:

- Identificamos alta taxa de doadores de plasma convalescente para COVID-19 com anticorpos IgG positivos para um dos 4 sorotipos de dengue na região do Distrito Federal;
- Observamos que existe um potencial de risco de complicações por ADE em pacientes tratados com plasmoterapia que possam estar coinfectados com SARS-CoV-2/DENV;
- Identificamos que a dificuldade de diagnóstico diferencial da COVID-19 e dengue afetam o uso da plasmoterapia para COVID-19, principalmente em locais com recursos limitados.

7 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos dois trabalhos apresentados foi possível verificar atividades de anticorpos IgG tanto para o fungo *C. neoformans* quanto para o vírus SARS-CoV-2. No primeiro capítulo demonstramos que os anticorpos IgG 3E5 híbridos desempenham importantes ações contra o fungo *C. neoformans*. Dentre essas, foram observadas funções de modulação da fagocitose de *C. neoformans* por células J774.16 semelhantes a macrófagos; alteração da especificidade fina de anticorpos monoclonais 3E5 IgG1 e IgG3 híbridos com a região CH1 ou dobradiça substituídas; e modificação do padrão de fluorescência de ligação do mAb 3E5 IgG3 com dobradiça de IgG1 ao polissacarídeo GXM cápsula de *C. neoformans*, alterando o padrão puntiforme para anular.

No capítulo 2 identificamos uma alta taxa de doadores de plasma convalescente para COVID-19 com sorologia IgG positiva para dengue na região do Distrito Federal. Isso demonstrou o alto risco de complicações por ADE em pacientes tratados com plasmoterapia para COVID-19 que possam estar coinfectados com SARS-CoV-2/DENV, principalmente, em região endêmica de dengue. Além disso, verificamos a importância de ensaios clínicos bem delineados para padronização da aplicação da plasmoterapia e aplicação de triagens assertivas para diferenciar a doença da COVID-19 e dengue. Esses novos conhecimentos abordados poderão ser utilizados tanto na doença da COVID-19 quanto no surgimento de novas variantes ou outras doenças futuras semelhantes.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9. ed. Elsevier, 2019.
- ABBASI, J. What to Know About EG.5, the Latest SARS-CoV-2 “Variant of Interest”. **JAMA**, 18 ago. 2023.
- ABOLGHASEMI, H. et al. Clinical efficacy of convalescent plasma for treatment of COVID-19 infections: Results of a multicenter clinical study. **Transfusion and apheresis science**, v. 59, n. 5, p. 102875, 1 out. 2020.
- ABORODE, A. T. et al. Dengue and Coronavirus disease (COVID-19) syndemic: Double threat to an overburdened healthcare system in Africa. **The International journal of health planning and management**, v. 37, n. 3, p. 1851–1854, 1 maio 2022.
- AGHAMIRZA, H. et al. COVID-19: A systematic review and update on prevention, diagnosis, and treatment. **MedComm**, v. 3, n. 1, p. e115, 1 mar. 2022.
- AL-AWWAL, N. et al. A Review of SARS-CoV-2 Disease (COVID-19): Pandemic in Our Time. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 368., 2022.
- ALT, F. W. et al. VDJ recombination. **Immunology Today**, v. 13, n. 8, p. 306–314, jan. 1992.
- ALVAREZ, M.; SAYLOR, C.; CASADEVALL, A. Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 8, p. 1622, ago. 2008.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anvisa aprova nova vacina contra a dengue**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-aprova-nova-vacina-para-a-dengue>>. Acesso em: 22 ago. 2023.
- ATTAELMANNAN, M.; LEVINSON, S. S. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. **Clinical chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1230–8, ago. 2000.
- AZIZ, M.; IHEANACHO, F.; HASHMI, M. F. Physiology, Antibody. **StatPearls**, 8 maio 2022.
- BAKHTAWAR, N.; USMAN, M.; KHAN, M. M. U. Convalescent Plasma Therapy and Its Effects On COVID-19 Patient Outcomes: A Systematic Review of Current Literature. **Cureus**, v. 12, n. 8, p. e9535, 3 ago. 2020.
- BAYER, V. An Overview of Monoclonal Antibodies. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, p. 150927, 1 out. 2019.
- BELAY, T. et al. Reactivity Patterns and Epitope Specificities of Anti-*Cryptococcus neoformans* Monoclonal Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Dot Enzyme Assay. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 718–728, 1997.
- BENGTÉN, E. et al. Immunoglobulin isotypes: Structure, function, and genetics. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 248, p. 189–219, 2000.
- BHATT, P. et al. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 17–32, 1 jan. 2021.
- BIHARIESINGH-SANCHIT, R. et al. Reduced Mortality among COVID-19 ICU Patients after Treatment with HemoClear Convalescent Plasma in Suriname. **mBio**, v. 14, n. 2, p. e03379-22, 25 abr. 2023.

BISMUTH, C.; BAUD, F.; PONTAL, P. Reversal of advanced digoxin intoxication with Fab fragments of digoxin-specific antibodies. **The New England journal of medicine**, v. 294, n. 15, p. 250, 1976.

BLOCH, E. M. et al. Promoting access to COVID-19 convalescent plasma in low- and middle-income countries. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 60, n. 1, p. 102957, fev. 2021.

BOOPATHI, S.; POMA, A. B.; KOLANDAIVEL, P. Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. **Journal of biomolecular structure and dynamics**, v. 39, n. 9, p. 3409–3418, 30 jun. 2021.

BOSE, I. et al. A yeast under cover: The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 4, p. 655–663, ago. 2003.

BOUNE, S. et al. Principles of N-Linked Glycosylation Variations of IgG-Based Therapeutics: Pharmacokinetic and Functional Considerations. **Antibodies**, v. 9, n. 2, p. 22, 10 jun. 2020.

BRANDISH, P. E. et al. Development of Anti-CD74 Antibody-Drug Conjugates to Target Glucocorticoids to Immune Cells. **Bioconjugate chemistry**, v. 29, n. 7, p. 2357–2369, 18 jul. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico - Volume 54 - nº 01**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/view>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica — Micoses endêmicas**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/micoses-endemicas/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 14 mar. 2023a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Covid-19 situação epidemiológica do Brasil até a SE 11.**, 2023b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/view>>. Acesso em: 27 mar. 2023

BREEDVELD, F. C. Therapeutic monoclonal antibodies. **Lancet**, v. 355, n. 9205, p. 735–740, 26 fev. 2000.

BROWN, B. L.; MCCULLOUGH, J. Treatment for emerging viruses: Convalescent plasma and COVID-19. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 59, n. 3, p. 102790, 1 jun. 2020.

BRUHNS, P. et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3716–3725, 16 abr. 2009.

BRUHNS, P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5640–5649, 14 jun. 2012.

BRUHNS, P.; JÖNSSON, F. Mouse and human FcR effector functions. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 25–51, nov. 2015.

BURTON, D. R. Antibody: the flexible adaptor molecule. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 64–69, 1990.

C. LEE, S. et al. Human microglia mediate anti-*Cryptococcus neoformans* activity in the presence of specific antibody. **Journal of Neuroimmunology**, v. 62, n. 1, p. 43–52, 1995.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 4, p. 421–33, 2005.

CASADEVALL, A. et al. Antibodies elicited by a *Cryptococcus neoformans*-tetanus toxoid conjugate vaccine have the same specificity as those elicited in infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 165, n. 6, p. 1086–1093, 1992.

CASADEVALL, A. et al. Molecular and idiotypic analysis of antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. **Infection and immunity**, v. 62, n. 9, p. 3864–3872, 1994.

CASADEVALL, A. et al. Characterization of a Murine Monoclonal Antibody to *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Is a Candidate for Human Therapeutic Studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437, 1998.

CASADEVALL, A.; JANDA, A. Immunoglobulin isotype influences affinity and specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12272–3, 31 jul. 2012.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Misinterpretation of Clinical Research Findings and COVID-19 Mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 176, n. 7, p. 993–994, 16 jul. 2023.

CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. The mouse antibody response to infection with *Cryptococcus neoformans*: VH and VL usage in polysaccharide binding antibodies. **J.Exp.Med.**, v. 174, n. 1, p. 151–160, 1991.

CASCELLA, M. et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). **StatPearls**, 13 out. 2022.

CASTELLI, M. S.; MCGONIGLE, P.; HORNBY, P. J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 7, n. 6, p. 00535, 1 dez. 2019.

CHAN, K. R. et al. Leukocyte immunoglobulin-like receptor B1 is critical for antibody-dependent dengue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 7, p. 2722–2727, 18 fev. 2014.

CHAU, C. H.; STEEG, P. S.; FIGG, W. D. Antibody-drug conjugates for cancer. **Lancet**, v. 394, n. 10200, p. 793–804, 31 ago. 2019.

CHI, X.; LI, Y.; QIU, X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. **Immunology**, v. 160, n. 3, p. 233, 1 jul. 2020.

CHIEN, Y. W. et al. Prolonged persistence of IgM against dengue virus detected by commonly used commercial assays. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 156, 2 dez. 2018.

CHRISTIE, S. M.; FIJEN, C.; ROTHENBERG, E. V(D)J Recombination: Recent Insights in Formation of the Recombinase Complex and Recruitment of DNA Repair Machinery. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 886718, 29 abr. 2022.

CHU, T. H. et al. Hinge length contributes to the phagocytic activity of HIV-specific IgG1 and IgG3 antibodies. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008083, 24 fev. 2020.

CLEARE, W.; CASADEVALL, A. The different binding patterns of two immunoglobulin M monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* serotype A and D strains correlate with serotype classification and differences in functional assays. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 2, p. 125–129, 1998.

COELHO, C.; BOCCA, A. L.; CASADEVALL, A. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Em: **Advances in Applied Microbiology**. 1. ed. : Elsevier Inc., 2014. v. 87p. 1–41.

COLTART, C. E. M.; COLLET-FENSON, L. B. Future developments in the prevention, diagnosis and treatment of COVID-19. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 73, p. 56–80, jun. 2021.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 1 mar. 2015.

DALUGAMA, C.; SENEVIRATNE, S. L. Dengue and COVID-19 co-infections: an important consideration in the tropics. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 117, n. 4, p. 241–254, 3 abr. 2023.

DAM, T. K. et al. Isothermal titration calorimetry reveals differential binding thermodynamics of variable region-identical antibodies differing in constant region for a univalent ligand. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 46, p. 31366–31370, 2008.

D'ANGELO, G.; PALMIERI, F. Discovering genomic patterns in SARS-CoV-2 variants. **International Journal of Intelligent Systems**, v. 35, n. 11, p. 1680–1698, 24 nov. 2020.

DC, A. et al. Effect of hydrocortisone on mortality and organ support in patients with severe COVID-19: The REMAP-CAP COVID-19 corticosteroid domain randomized clinical trial. **JAMA**, v. 324, n. 13, p. 1317–1329, 2020.

DE FIGUEIREDO NETO, J. A. et al. Coronavirus disease 2019 and the myocardium. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 6, p. 1051–1057, 2020.

DE TAEYE, S. W.; RISPENS, T.; VIDARSSON, G. The Ligands for Human IgG and Their Effector Functions. **Antibodies**, v. 8, n. 2, p. 30, 25 abr. 2019.

DEL POETA, M. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, p. 1067, out. 2004.

DIAMOND, R. D. Antibody-dependent Killing of *Cryptococcus neoformans* by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Nature**, v. 247, n. 5437, p. 148–150, jan. 1974.

DIXIT, R. et al. Benefits of using heterologous polyclonal antibodies and potential applications to new and undertreated infectious pathogens. **Vaccine**, v. 34, n. 9, p. 1152, 2 fev. 2016.

DO CARMO, F. N. et al. *Cryptococcus spp.* and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1321–1337, 29 abr. 2022.

DODEV, T. S. et al. Inhibition of allergen-dependent IgE activity by antibodies of the same specificity but different class. **Allergy**, v. 70, n. 6, p. 720–724, 28 jun. 2015.

DOMINGUES, R. B. et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 267, n. 1–2, p. 36–40, abr. 2008.

DRAGOVICH, P. S. Antibody–Drug Conjugates for Immunology. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 6, p. 4496–4499, 24 mar. 2022.

DUARTE, J. H. Functional switching. **Nature Immunology**, v. 17, n. S1, p. S12–S12, 2 dez. 2016.

EDWARDS, E. et al. Strategies to control therapeutic antibody glycosylation during bioprocessing: Synthesis and separation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 1343, 1 jun. 2022.

ELSEGEINY, W.; MARR, K. A.; WILLIAMSON, P. R. Immunology of Cryptococcal Infections: Developing a Rational Approach to Patient Therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 651, 4 abr. 2018.

ELSHUBER, S. et al. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 1, p. 183–191, 1 jan. 2003.

ESPARVARINHA, M. et al. The role of free *kappa* and *lambda* light chains in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 632–644, 1 jul. 2017.

FEDSON, D. S. Treating COVID-19: Targeting the Host Response, Not the Virus. **Life**, v. 13, n. 3, p. 712, 6 mar. 2023.

FELDMESSER, M. et al. Antibody interactions with the capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3642–50, jun. 2000.

FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. Effect of serum IgG1 to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan on murine pulmonary infection. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 2, p. 790–799, 15 jan. 1997.

FIGUEIREDO, A. B. C. et al. Monoclonal Antibodies against Cell Wall Chitooligomers as Accessory Tools for the Control of Cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. e0118121, 1 dez. 2021.

FILCHAKOVA, O. et al. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. **Talanta**, v. 244, p. 123409, 1 jul. 2022.

FIRACATIVE, C.; TRILLES, L.; MEYER, W. Recent advances in *cryptococcus* and cryptococcosis. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 13, 1 jan. 2022.

FISHER, R. et al. The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections. **Viruses**, v. 15, n. 2, p. 572, 19 fev. 2023.

FLIPSE, J. et al. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 6 jul. 2016.

FRILIGOU, I. et al. Glycosylation of recombinant rabbit immunoglobulins influences protease susceptibility as shown by comprehensive mass spectrometric glycan analysis. **Glycobiology**, v. 31, n. 7, p. 762–771, 7 ago. 2021.

GAVOTTE, L. et al. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. **Frontiers in Public Health**, v. 1, p. 582932, 2019.

GLATT, T. N. et al. Rapid and Successful Implementation of a COVID-19 Convalescent Plasma Programme—The South African Experience. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 2050, 1 out. 2021.

GOLDMAN, D. L. et al. Serologic Evidence for *Cryptococcus neoformans* Infection in Early Childhood. **Pediatrics**, v. 107, n. 5, p. e66–e66, 1 maio 2001.

GOTTLIEB, R. L. et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. **The New England journal of medicine**, v. 386, n. 4, p. 305–315, 27 jan. 2022.

GOUVEIA, V. A. et al. Características Clínicolaboratoriais da Criptococose em Pacientes Admitidos em Pronto Socorro Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Referência Terciária do Sistema Unico de Saúde: Análise Retrospectiva desde 2000 a 2013. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, n. 1, p. 1–12, 2018.

GRUBOVIC RASTVORCEVA, R. M. et al. Efficacy and Safety of COVID-19 Convalescent Plasma in Hospitalized Patients—An Open-Label Phase II Clinical Trial. **Life**, v. 12, n. 10, p. 1565, 9 out. 2022.

GUZMÁN, M. G. et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 223–227, abr. 2002.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2649–2662, 8 dez. 2010.

HALSTEAD, S. B. Dengue Antibody-Dependent Enhancement: Knowns and Unknowns. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 6, 21 nov. 2014.

HAN, J. et al. Relative quantitation of subclass-specific murine IgG Fc N - Glycoforms by multiple reaction monitoring. **ACS Omega**, v. 5, n. 15, p. 8564–8571, 21 abr. 2020.

HARAPAN, H. et al. Covid-19 and dengue: Double punches for dengue-endemic countries in Asia. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 2, p. e2161, 18 mar. 2021.

HARDING, F. A. et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions. **mAbs**, v. 2, n. 3, p. 256, maio 2010.

HERNÁNDEZ-ACEITUNO, A.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, A.; LARUMBE-ZABALA, E. COVID-19 long-term sequelae: Omicron versus Alpha and Delta variants. **Infectious Diseases Now**, v. 53, n. 5, p. 104688, ago. 2023.

HIGEL, F. et al. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 100, p. 94–100, 1 mar. 2016.

HO, L. J. et al. Dengue Virus Type 2 Antagonizes IFN- α but Not IFN- γ Antiviral Effect via Down-Regulating Tyk2-STAT Signaling in the Human Dendritic Cell. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 8163–8172, 15 jun. 2005.

HOFFMAN, W.; LAKKIS, F. G.; CHALASANI, G. B cells, antibodies, and more. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 137–154, 7 jan. 2016.

HORGAN, C.; BROWN, K.; PINCUS, S. H. Studies on antigen binding by intact and hinge-deleted chimeric antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 12, p. 5400–7, 1993.

HOSSLER, P.; KHATTAK, S. F.; LI, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. **Glycobiology**, v. 19, n. 9, p. 936–49, set. 2009.

HUBER, R. et al. Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. **Nature**, v. 264, n. 5585, p. 415–420, dez. 1976.

IANNELLO, A.; AHMAD, A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. **Cancer metastasis reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–499, dez. 2005.

IKETANI, S. et al. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. **Nature**, v. 604, n. 7906, p. 553–556, 21 abr. 2022.

ISHIDA, T.; IMAI, K. The expression technology of chimeric and humanized antibodies. **Japanese journal of clinical medicine**, v. 60, n. 3, p. 439–44, mar. 2002.

IWASAKI, Y. W. et al. Generation of bispecific antibodies by structure-guided redesign of IgG constant regions. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1063002, 10 jan. 2023.

IYER, K. R. et al. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 454–466, 8 fev. 2021.

JACKSON, C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3–20, 1 jan. 2022.

JACQUEMIN, M. et al. Variable region heavy chain glycosylation determines the anticoagulant activity of a factor VIII antibody. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 4, n. 5, p. 1047–1055, maio 2006.

JAIN, N. K. et al. A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. **Protein expression and purification**, v. 134, p. 38–46, 1 jun. 2017.

JAMKHANDE, A. et al. A review of approved COVID-19 vaccines. **Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny**, v. 72, n. 3, p. 245–252, 2021.

JANBON, G. et al. Cas1p is a membrane protein necessary for the O-acetylation of the *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 2, p. 453–467, 2001.

JANDA, A. et al. Ig Constant Region Effects on Variable Region Structure and Function. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 22, 2016.

JONES, B. E. et al. The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates. **Science translational medicine**, v. 13, n. 593, p. eabf1906, 12 maio 2021.

KALIL, A. C. et al. Baricitinib plus Remdesivir for Hospitalized Adults with Covid-19. **The New England journal of medicine**, v. 384, n. 9, p. 795–807, 4 mar. 2021.

KANYAVUZ, A. et al. Breaking the law: unconventional strategies for antibody diversification. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 6, p. 355–368, 1 jun. 2019.

KHAMASSI, M. et al. The CH1 α domain of mucosal gp41 IgA contributes to antibody specificity and antiviral functions in HIV-1 highly exposed Sero-Negative individuals. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009103, 14 dez. 2020.

KHONGORZUL, P. et al. Antibody-Drug Conjugates: A Comprehensive Review. **Molecular cancer research : MCR**, v. 18, n. 1, p. 3–19, 2020.

KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 917–930, fev. 2012.

KLASSEN, S. A. et al. The Effect of Convalescent Plasma Therapy on Mortality Among Patients With COVID-19: Systematic Review and Meta-analysis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 96, n. 5, p. 1262–1275, 1 maio 2021.

KOK, B. H. et al. Dengue virus infection - a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. **Virus research**, v. 324, p. 199018, 15 jan. 2023.

KOTHAI, R.; ARUL, B. Dengue Fever: An Overview. **Dengue Fever in a One Health Perspective**, 28 out. 2020.

KOZEL, T. R. Dissociation of a hydrophobic surface from phagocytosis of encapsulated and non-encapsulated *cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 39, n. 3, p. 1214–1219, 1983.

KUROSAWA, K.; LIN, W.; OHTA, K. Chimeric antibodies. **Methods in molecular biology**, v. 1060, p. 139–48, 2014.

KUTTEL, M. M.; CASADEVALL, A.; OSCARSON, S. *Cryptococcus neoformans* Capsular GXM Conformation and Epitope Presentation: A Molecular Modelling Study. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2651, 1 jun. 2020.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LABRIJN, A. F. et al. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 18, n. 8, p. 585–608, 1 ago. 2019.

LEE, S. BIN et al. Effects of altered N-glycan structures of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins, MP98 (Cda2) and MP84 (Cda3), on interaction with host cells. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1175, 20 jan. 2023.

LEE, H. H. et al. Reduced phagocytosis and killing of *Cryptococcus neoformans* biofilm-derived cells by J774.16 macrophages is associated with fungal capsular production and surface modification. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p. 103258, 1 nov. 2019.

LEE, M. F. et al. Innate and adaptive immune evasion by dengue virus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 16 set. 2022.

LEOPOLD WAGER, C. M. et al. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 105, 9 fev. 2016.

LETURCQ, D. J. et al. Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 7, p. 1533–1538, 1 out. 1996.

LEVINE, A. C. et al. Coronavirus Disease 2019 Convalescent Plasma Outpatient Therapy to Prevent Outpatient Hospitalization: A Meta-Analysis of Individual Participant Data From 5 Randomized Trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 12, p. 2077–2086, 16 jun. 2023.

LEVITZ, S. M.; TABUNI, A. Binding of *Cryptococcus neoformans* by human cultured macrophages. Requirements for multiple complement receptors and actin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 2, p. 528, 1991.

LI, H. et al. A comprehensive review of coronavirus disease 2019: Epidemiology, transmission, risk factors, and international responses. **Yonsei Medical Journal**, v. 62, n. 1, p. 1–11, 1 jan. 2021.

LI, H.; ER SAW, P.; SONG, E. Challenges and strategies for next-generation bispecific antibody-based antitumor therapeutics. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 5, p. 451, 1 maio 2020.

LIBRATY, D. H. et al. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213–1221, 1 maio 2002.

LIMA, M. R. Q.; NUNES, P. C. G.; DOS SANTOS, F. B. Serological Diagnosis of Dengue. p. 173–196, 2022.

LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258–268, 1 jan. 2005.

LIU, Q. et al. Cytokine profiles in cerebrospinal fluid of patients with meningitis at a tertiary general hospital in China. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 53, n. 2, p. 216–224, 1 abr. 2020.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 22 fev. 2020a.

LU, R. M. et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, 2 jan. 2020b.

LUKE, T. C. et al. Meta-analysis: Convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: A future H5N1 treatment? **Annals of Internal Medicine**, v. 145, n. 8, p. 599–609, 17 out. 2006.

LUO, R. et al. Rapid diagnostic tests for determining dengue serostatus: a systematic review and key informant interviews. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 6, p. 659–666, jun. 2019.

MA, H.; O'KENNEDY, R. The structure of natural and recombinant antibodies. **Methods in Molecular Biology**, v. 1348, p. 7–11, 2015.

MACURA, N.; ZHANG, T.; CASADEVALL, A. Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration. **Infection and immunity**, v. 75, n. 4, p. 1904–15, abr. 2007.

MALIK, B.; GHATOL, A. Understanding How Monoclonal Antibodies Work. **StatPearls**, 4 jul. 2022.

MALISHENI, M. M. et al. Switching Heavy Chain Constant Domains Denatures the Paratope 3D Architecture of Influenza Monoclonal Antibodies. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 51, 28 dez. 2022.

MARANO, G. et al. Convalescent plasma: New evidence for an old therapeutic tool? **Blood Transfusion**, v. 14, n. 2, p. 152–157, 1 mar. 2016.

MARIA, K. DA S. T. et al. The Complexity of SARS-CoV-2 Infection and the COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 789882, 10 fev. 2022.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564, out. 2009.

MCBRIDE, O. W. et al. Chromosomal location of human *Kappa* and *Lambda* Immunoglobulin light chain constant region genes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 155, n. 5, p. 1480–90, 1982.

MCCLYMONT, H. et al. Future perspectives of emerging infectious diseases control: A One Health approach. **One Health**, v. 14, p. 100371, jun. 2022.

MCFADDEN, D. C.; CASADEVALL, A. Unexpected diversity in the fine specificity of monoclonal antibodies that use the same V region gene to glucuronoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of immunology**, v. 172, n. 6, p. 3670–3677, 15 mar. 2004.

MCLEAN, G. R. et al. Isotype Can Affect the Fine Specificity of an Antibody for a Polysaccharide Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 3, p. 1379–1386, 1 ago. 2002.

MESTECKY, J. Structure of antibodies. **Journal of oral pathology**, v. 1, n. 6, p. 288–300, 1972.

MOUFFAK, S. et al. Recent advances in management of COVID-19: A review. **Biomedicine and pharmacotherapy**, v. 143, p. 112107, 1 nov. 2021.

MOYO-GWETE, T. et al. Enhanced neutralization potency of an identical HIV neutralizing antibody expressed as different isotypes is achieved through genetically distinct mechanisms. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 16473, 1 out. 2022.

MOZAFFARIAN, N.; BERMAN, J. W.; CASADEVALL, A. Immune complexes increase nitric oxide production by interferon-gamma-stimulated murine macrophage-like J774.16 cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 57, n. 4, p. 657–662, 1995.

MUKHERJEE, J. et al. Antibody-mediated protection in mice with lethal intracerebral *Cryptococcus neoformans* infection. **Immunology**, v. 90, n. 8, p. 3636–3640, 1993.

MUKHERJEE, J. et al. Therapeutic efficacy of monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan alone and in combination with amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 3, p. 580–587, 1994a.

MUKHERJEE, J. et al. Protective and Nonprotective Monoclonal Antibodies to *Cryptococcus neoformans* originating from one B cell. **The Journal of experimental medicine**, v. 181, n. 1, p. 405–9, 1995.

MUKHERJEE, J.; CASADEVALL, A.; SCHARFF, M. D. Molecular Characterization of the Humoral Responses to *Cryptococcus neoformans* Infection and Glucuronoxylomannan-Tetanus Toxoid Conjugate Immunization. **The Journal of experimental medicine**, v. 177, n. 4, p. 1105–16, 1993.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*. **Infection and immunity**, v. 60, n. 11, p. 4534–41, 1 nov. 1992.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. Variable efficacy of passive antibody administration against diverse *Cryptococcus neoformans* strains. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3353–3359, 1995.

MUKHERJEE, S. et al. Monoclonal Antibodies to *Cryptococcus neoformans* Capsular Polysaccharide Modify the Course of Intravenous Infection in Mice. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 1079–1088, 1994b.

MUKHERJEE, S.; FELDMESSER, M.; CASADEVALL, A. J774 murine macrophage-like cell interactions with *Cryptococcus neoformans* in the presence and absence of opsonins. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 5, p. 1222–31, maio 1996.

MUKHERJEE, S.; LEE, S. C.; CASADEVALL, A. Antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan enhance antifungal activity of murine macrophages. **Infection and immunity**, v. 63, n. 2, p. 573–579, 1995.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. S2, p. S89–S95, 1 mar. 2017.

MURRAY, K. et al. NSO myeloma cell death: Influence of bcl-2 overexpression. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, n. 3, p. 298–304, 5 ago. 1996.

MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 1 jan. 2015.

NAKOUZI, A. et al. Molecular Basis for Immunoglobulin M Specificity to Epitopes in *Cryptococcus neoformans* Polysaccharide That Elicit Protective and Nonprotective Antibodies. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3398–3409, maio 2001.

NARAYAN, R.; TRIPATHI, S. Intrinsic ADE: The Dark Side of Antibody Dependent Enhancement During Dengue Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 548, 2 out. 2020.

NASOMSONG, W.; LUVIRA, V.; PHIBOONBANAKIT, D. Case Report: Dengue and COVID-19 Coinfection in Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 487–489, 3 fev. 2021.

NATH, H. et al. Computational modelling supports that dengue virus envelope antibodies can bind to SARS-CoV-2 receptor binding sites: Is pre-exposure to dengue virus protective against COVID-19 severity? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 459–466, 1 jan. 2021.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 599–609, 1 nov. 2012.

NGAN, N. T. T.; FLOWER, B.; DAY, J. N. Treatment of Cryptococcal Meningitis: How Have We Got Here and Where are We Going? **Drugs**, v. 82, n. 12, p. 1237, 1 ago. 2022.

NIMRICHTER, L. et al. Self-aggregation of *Cryptococcus neoformans* capsular glucuronoxylomannan is dependent on divalent cations. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 8, p. 1400–1410, ago. 2007.

NISONOFF, A.; WISSLER, F. C.; LIPMAN, L. N. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. **Science**, v. 132, n. 3441, p. 1770–1771, 1960.

NOROUZNEJAD, N. et al. Purification of Therapeutic Serums of Snake Anti-Venom with Caprylic Acid. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 25, n. 2, p. 114–120, 30 jun. 2022.

NUSSBAUM, G. et al. Epitope Location in the *Cryptococcus neoformans* Capsule Is a Determinant of Antibody Efficacy. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 4, p. 685, 2 fev. 1997.

OLADIPO, H. J.; RABIU, I.; TAJUDEEN, Y. A. Dengue virus and SARS-CoV-2 Co-infection dynamics: An emerging threat among African countries. **Annals of medicine and surgery**, v. 82, p. 104398, 1 out. 2022.

OLIVEIRA, D. S. L. **Anticorpos IgG murinos de diferentes isotipos e região variável idêntica se ligam de forma diferente à cápsula de *cryptococcus neoformans* e a receptores Fc-Gama**. Brasília: Universidade de Brasília, 2016.

OLIVEIRA, D. S. L. DE et al. Hinge influences in murine IgG binding to *Cryptococcus neoformans* capsule. **Immunology**, v. 165, n. 1, p. 110–121, 7 jan. 2022.

OLIVEIRA, F. A. DE et al. Convalescent plasma therapy in COVID-19 critically ill patients during advanced phases of clinical trials and their preliminary results. **Einstein**, v. 19, p. eRW6186, 9 abr. 2021.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Novel Coronavirus (2019-nCoV) SITUATION REPORT - 1**. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330760>>. Acesso em: 24 jun. 2023.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 19 ago. 2023.

PARK, H. et al. Development and Validation of a Treatment Benefit Index to Identify Hospitalized Patients With COVID-19 Who May Benefit From Convalescent Plasma. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 1, p. e2147375, 25 jan. 2022.

PARRAY, H. A. et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. **International immunopharmacology**, v. 85, p. 106639, 1 ago. 2020.

PEELING, R. W. et al. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. **Lancet**, v. 399, n. 10326, p. 757, 19 fev. 2022.

PELLETIER, J. P. R.; MUKHTAR, F. Passive Monoclonal and Polyclonal Antibody Therapies. **Immunologic Concepts in Transfusion Medicine**, p. 251–348, 1 jan. 2020.

PENG, H. T.; RHIND, S. G.; BECKETT, A. Convalescent Plasma for the Prevention and Treatment of COVID-19: A Systematic Review and Quantitative Analysis. **JMIR Public Health and Surveillance**, v. 7, n. 4, p. e25500, 7 abr. 2021.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837–874, 1 dez. 2002.

PETTINATO, M. C. Introduction to Antibody-Drug Conjugates. **Antibodies**, v. 10, n. 4, p. 42, 1 dez. 2021.

PINA, A. S.; LOWE, C. R.; ROQUE, A. C. A. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 366–381, mar. 2014.

PIROFSKI, L. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans*: paradigm for the role of antibody immunity against fungi? **Journal of medical microbiology**, v. 284, n. 4, p. 475–495, 1996.

PORTER, R. R.; PRESS, E. M. The fractionation of bovine delta-globulin by partition chromatography. **The Biochemical journal**, v. 66, n. 4, p. 600–603, 1 ago. 1957.

PRAPTY, C. N. B. S. et al. SARS-CoV-2 and dengue virus co-infection: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment, and management. **Reviews in medical virology**, v. 33, n. 1, p. e2340, jan. 2023.

PRITSCH, O. et al. Can immunoglobulin C(H)1 constant region domain modulate antigen binding affinity of antibodies? **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 10, p. 2235–2243, 15 nov. 1996.

RAHMAN, H. S. et al. The transmission modes and sources of COVID-19: A systematic review. **International Journal of Surgery Open**, v. 26, n. 6, p. 125–136, 17 set. 2020.

RAJASINGHAM, R. et al. The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 1748–1755, 1 dez. 2022.

RATHORE, S. S. et al. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. **Microbial pathogenesis**, v. 166, p. 105521, 1 maio 2022.

RAY, S.; DIAMOND, B. Generation of a fusion partner to sample the repertoire of splenic B cells destined for apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 12, p. 5548–5551, 7 jun. 1994.

REVERBERI, R.; REVERBERI, L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. **Blood transfusion**, v. 5, n. 4, p. 227–40, nov. 2007.

ROJAS, G. Understanding and Modulating Antibody Fine Specificity: Lessons from Combinatorial Biology. **Antibodies**, v. 11, n. 3, p. 48, 14 jul. 2022.

ROUX, K. H.; GREENSPAN, N. S. Monitoring the formation of soluble immune complexes composed of idiotype and anti-idiotype antibodies by electron microscopy. **Molecular Immunology**, v. 31, n. 8, p. 599–606, jun. 1994.

SADDIQUE, A. et al. Emergence of co-infection of COVID-19 and dengue: A serious public health threat. **The Journal of Infection**, v. 81, n. 6, p. e16, 1 dez. 2020.

SALEH, F. The need for COVID-19 clinical trials in LMICs. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 1038840, 9 jan. 2023.

SAMARANAYAKE, H. et al. Challenges in monoclonal antibody-based therapies. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 5, p. 322–331, 8 jan. 2009.

SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei blastomiceti che si sviluppano nei succhi di alcuni frutti. **Ann Igien**, v. 4, p. 463–495, 1894.

SANTOSO, M. S. et al. Assessment of dengue and COVID-19 antibody rapid diagnostic tests cross-reactivity in Indonesia. **Virology Journal**, v. 18, n. 1, p. 54, 11 dez. 2021.

SAWANT, J.; PATIL, A.; KURLE, S. A Review: Understanding Molecular Mechanisms of Antibody-Dependent Enhancement in Viral Infections. **Vaccines**, v. 11, n. 7, p. 1240, 14 jul. 2023.

SCHAEFER, T. J.; PANDA, P. K.; WOLFORD, R. W. Dengue Fever. **StatPearls**, p. 5–6, 14 nov. 2023.

SCHARF, O. et al. Immunoglobulin G3 from Polyclonal Human Immunodeficiency Virus (HIV) Immune Globulin Is More Potent than Other Subclasses in Neutralizing HIV Type 1. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6558–6565, 15 jul. 2001.

SCHEINFELD, N. Adalimumab (Humira): a brief review for dermatologists. **The Journal of dermatological treatment**, v. 15, n. 6, p. 348–352, dez. 2004.

SCHULTE, H. L. et al. SARS-CoV-2/DENV co-infection: a series of cases from the Federal District, Midwestern Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 727, 1 dez. 2021.

SELA-CULANG, I. et al. The structural basis of antibody-antigen recognition. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 302, 2013.

SELA-CULANG, I.; ALON, S.; OFRAN, Y. A Systematic Comparison of Free and Bound Antibodies Reveals Binding-Related Conformational Changes. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 10, p. 4890–4899, 15 nov. 2012.

SENEFELD, J. W. et al. COVID-19 Convalescent Plasma for the Treatment of Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v. 6, n. 1, p. e2250647, 12 jan. 2023.

SIFNIOTIS, V. et al. Current Advancements in Addressing Key Challenges of Therapeutic Antibody Design, Manufacture, and Formulation. **Antibodies**, v. 8, n. 2, p. 36, 3 jun. 2019.

SLON CAMPOS, J. L.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. The immune response against flaviviruses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 11, p. 1189–1198, 17 out. 2018.

SONG, R. et al. Strategic addition of an N-linked glycan to a monoclonal antibody improves its HIV-1-neutralizing activity. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1047–1052, nov. 2013.

STERNE, J. A. C. et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. **JAMA**, v. 324, n. 13, p. 1330–1341, 2020.

SU, C. et al. Allosteric Effects between the Antibody Constant and Variable Regions: A Study of IgA Fc Mutations on Antigen Binding. **Antibodies**, v. 7, n. 2, p. 20, 7 jun. 2018.

SULLIVAN, D. J. et al. Randomized controlled trial of early outpatient COVID-19 treatment with high-titer convalescent plasma. **medRxiv**, 21 dez. 2021.

SULLIVAN, D. J. et al. Early Outpatient Treatment for Covid-19 with Convalescent Plasma. **The New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 18, p. 1700–1711, 5 maio 2022.

SVENDSEN, P. et al. Antibody-Directed Glucocorticoid Targeting to CD163 in M2-type Macrophages Attenuates Fructose-Induced Liver Inflammatory Changes. **Molecular Therapy - Methods & Clinical Development**, v. 4, p. 50–61, 17 mar. 2017.

TAI, Y.-L. et al. Effects of bamlanivimab alone or in combination with etesevimab on subsequent hospitalization and mortality in outpatients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **PeerJ**, v. 11, p. e15344, 8 maio 2023.

TAYAL, A.; KABRA, S. K.; LODHA, R. Management of Dengue: An Updated Review. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 90, n. 2, p. 168, 1 fev. 2023.

TAYLOR, A. et al. Fc receptors in antibody-dependent enhancement of viral infections. **Immunological Reviews**, v. 268, n. 1, p. 340–364, 1 nov. 2015.

TEOTÔNIO, I. M. S. N. et al. Clinical and biochemical parameters of COVID-19 patients with prior or active dengue fever. **Acta Tropica**, v. 214, p. 105782, 1 fev. 2021.

TEY, B. T. et al. Bcl-2 mediated suppression of apoptosis in myeloma NS0 cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 147–159, 28 abr. 2000.

THARMALINGAM, T. et al. Polyclonal hyper immunoglobulin: A proven treatment and prophylaxis platform for passive immunization to address existing and emerging diseases. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 18, n. 2, p. 1886560, 29 abr. 2022.

TISSI, L. et al. Glucuronoxylomannan, the Major Capsular Polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, Inhibits the Progression of Group B Streptococcal Arthritis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6367, nov. 2004.

TORRES, M. et al. Variable-Region-Identical Antibodies Differing in Isotype Demonstrate Differences in Fine Specificity and Idiotype. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 2132–2142, 2005.

TORRES, M. et al. The Immunoglobulin Heavy Chain Constant Region Affects Kinetic and Thermodynamic Parameters of Antibody Variable Region Interactions with Antigen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 18, p. 13917–13927, 4 maio 2007.

TORRES, M.; CASADEVALL, A. The immunoglobulin constant region contributes to affinity and specificity. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 2, p. 91–97, fev. 2008.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1919, 23 ago. 2018.

TROXEL, A. B. et al. Association of Convalescent Plasma Treatment With Clinical Status in Patients Hospitalized With COVID-19. **JAMA**, v. 5, n. 1, p. e2147331, 25 jan. 2022.

TSHETEN, T. et al. Clinical features and outcomes of COVID-19 and dengue co-infection: a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 729, 2 dez. 2021.

TUDOR, D. et al. Isotype modulates epitope specificity, affinity, and antiviral activities of anti-HIV-1 human broadly neutralizing 2F5 antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12680–12685, 31 jul. 2012.

ULRICH, H.; PILLAT, M. M.; TÁRNOK, A. Dengue Fever, COVID-19 (SARS-CoV-2), and Antibody-Dependent Enhancement (ADE): A Perspective. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 97, n. 7, p. 662–667, 7 jul. 2020.

UNKELESS, J. C.; SCIGLIANO, E.; FREEDMAN, V. H. Structure and Function of Human and Murine Receptors for IgG. **Annual Review of Immunology**, v. 6, n. 1, p. 251–281, abr. 1988.

UZUNIAN, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. 1–4, 25 set. 2020.

VAISMAN-MENTESH, A. et al. The molecular mechanisms that underlie the immune biology of anti-drug antibody formation following treatment with monoclonal antibodies. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1951, 18 ago. 2020.

VALIM, Y. M. L.; LACHMANN, P. J. The effect of antibody isotype and antigenic epitope density on the complement-fixing activity of immune complexes: a systematic study using chimaeric anti-NIP antibodies with human Fc regions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 84, n. 1, p. 1–8, 28 jun. 2008.

VAN DE BOVENKAMP, F. S. et al. Adaptive antibody diversification through N-linked glycosylation of the immunoglobulin variable region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 8, p. 1901–1906, 20 fev. 2018.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Evaluation of Convalescent Plasma for Ebola Virus Disease in Guinea. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 1, p. 33–42, 7 jan. 2016.

VASWANI, S. K.; HAMILTON, R. G. Humanized antibodies as potential therapeutic drugs. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 81, n. 2, p. 105–119, ago. 1998.

VENTURA-ENRÍQUEZ, Y. et al. Convalescent Plasma to Treat COVID-19: A Two-Center, Randomized, Double-Blind Clinical Trial. **Life**, v. 12, n. 11, p. 1767, 2 nov. 2022.

VIDARSSON, G.; DEKKERS, G.; RISPENS, T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 520, 2014.

WAGGONER, J. J. et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1584–1590, 15 dez. 2016.

WANG, Y. et al. Specificity of mouse and human Fcγ receptors and their polymorphic variants for IgG subclasses of different species. **European Journal of Immunology**, v. 52, n. 5, p. 753–759, 1 maio 2022.

WEI, J. et al. Current landscape and future directions of bispecific antibodies in cancer immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 1035276, 28 out. 2022.

WIESNER, D. L. et al. Chitin recognition via chitotriosidase promotes pathologic type-2 helper T cell responses to cryptococcal infection. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 3, p. 1–28, 1 mar. 2015.

WIKAN, N. et al. Delayed antibody dependent enhancement of low passage dengue virus 4 isolates. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2 set. 2015.

WONG, J. M. et al. Dengue: A Growing Problem With New Interventions. **Pediatrics**, v. 149, n. 6, p. e2021055522, 1 jun. 2022.

WU, A. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325, 3 mar. 2020.

XIA, X. et al. Improved clinical symptoms and mortality among patients with severe or critical COVID-19 after convalescent plasma transfusion. **Blood**, v. 136, n. 6, p. 755–759, 6 ago. 2020.

XIA, Y. et al. The constant region contributes to the antigenic specificity and renal pathogenicity of murine anti-DNA antibodies. **Journal of Autoimmunity**, v. 39, n. 4, p. 398–411, dez. 2012.

YAN, G. et al. Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 536, 1 maio 2020.

YAN, W. et al. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 26, 27 jan. 2022.

YANG, C. et al. *Cryptococcus* escapes host immunity: What do we know? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1570, 13 out. 2022.

YANG, D. et al. IgG cooperativity—Is there allostery? Implications for antibody functions and therapeutic antibody development. **mAbs**, v. 9, n. 8, p. 1231–1252, 17 nov. 2017.

YONG, Y. K. et al. Dengue Infection - Recent Advances in Disease Pathogenesis in the Era of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 889196, 6 jul. 2022.

YOUNG, A. C. M. et al. The three-dimensional structures of a polysaccharide binding antibody to *Cryptococcus neoformans* and its complex with a peptide from a

phage display library: implications for the identification of peptide mimotopes. **Journal of Molecular Biology**, v. 274, n. 4, p. 622–634, 1997.

YU, B.; CHANG, J. The first Chinese oral anti-COVID-19 drug Azvudine launched. **The Innovation**, v. 3, n. 6, p. 100321, 11 nov. 2022.

YU, J.; SONG, Y.; TIAN, W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 13, n. 1, p. 45, 5 maio 2020.

YUAN, R. et al. Isotype switching from IgG3 to IgG1 converts a nonprotective murine antibody to *Cryptococcus neoformans* into a protective antibody. **Journal of immunology**, v. 154, n. 4, p. 1810–1816, 1995.

YUAN, R. et al. T cells cooperate with passive antibody to modify *Cryptococcus neoformans* infection in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2483–2488, 18 mar. 1997.

YUAN, R. R. et al. Isotype switching increases efficacy of antibody protection against *Cryptococcus neoformans* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 1057–1062, 1998.

YUAN, Y. et al. The development of COVID-19 treatment. **Frontiers in immunology**, v. 14, p. 1125246, 26 jan. 2023.

ZEBEDEE, S. L. et al. Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, n. 7, p. 1507–1514, 1994.

ZEPEDA-CARRILLO, E. A. et al. SARS-CoV-2 and Dengue Virus Coinfection in a Mexican Pediatric Patient: A Case Report from Early Molecular Diagnosis. **Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1360, 16 nov. 2022.

ZHANG, C. Hybridoma Technology for the Generation of Monoclonal Antibodies. **Methods in molecular biology**, v. 901, p. 117–135, 2012.

ZHAO, J. et al. *In Silico* Methods in Antibody Design. **Antibodies**, v. 7, n. 3, p. 22, 29 jun. 2018.

ZHAO, J.; NUSSINOV, R.; MA, B. Antigen binding allosterically promotes Fc receptor recognition. **mAbs**, v. 11, n. 1, p. 58–74, 2 jan. 2019.

ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: sex, morphogenesis, and virulence. **Infection, genetics and evolution**, v. 89, p. 104731, 1 abr. 2021.

ZHENG, K.; BANTOG, C.; BAYER, R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. **mAbs**, v. 3, n. 6, p. 568–76, 2011.

ZHENG, W. et al. Identification of COVID-19 and Dengue Host Factor Interaction Networks Based on Integrative Bioinformatics Analyses. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 707287, 28 jul. 2021.

ZHOU, J. et al. Bovine serum albumin affects N-glycoforms of murine IgG monoclonal antibody purified from hybridoma supernatants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 4, p. 1583–1594, 1 fev. 2020a.

ZHOU, Y. et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 998–1002, 1 jun. 2020b.