





(22) Data do Depósito: 04/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 25/06/2019

República Federativa do Brasil Ministério da Economia Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(54) Título: SEQUÊNCIAS DA REGIÃO VARIÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL QUE RECONHECE CEPA PATOGÊNICA DE ACANTHAMOEBA E MÉTODOS DE USO

(51) Int. Cl.: C07K 16/20; G01N 33/569.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) Inventor(es): MICHELE MARTHA WEBER LIMA; LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA; JULIANA FERREIRA DE MOURA; ÀLÉSSANDRÀ BECKER FINCO.

(57) Resumo: SEOUÊNCIAS DA REGIÃO VARIÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL OUE RECONHECE CEPA PATOGÊNICA DE Acanthamoeba E MÉTODOS DE USO. Antígenos de Acanthamoeba foram empregados como imunógenos para a produção de um anticorpo monoclonal específico, mAb3, com capacidade de reconhecer componentes moleculares presentes em trofozoítos de Acanthamoeba com potencial patogênico. O anticorpo monoclonal mAb3 teve a sequência das regiões variáveis de cadeia leve (VL) e cadeia pesada (VL) determinada e, foi empregado no seu formato original em diferentes ensaios imunoquímicos como ELISA, Western blotting e citometria de fluxo, na presença de antígenos solúveis ou trofozoítos de diferentes isolados de Acanthamoeba. Em todos os formatos avaliados o mAb3, foi capaz de reconhecer e detectar antígenos específicos de Acanthamoeba demonstrando seu potencial para ser empregado no diagnóstico da ceratite amebiana, considerando que não apresentou reatividade cruzada com antígenos de Fusarium sp., Candida sp. e Aspergillus sp. que também são patógenos causadores de ceratite.

<sequence>CTGCGACGACGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGAGG</sequence>	TGCAAC
TGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTCGTGAAACCTTCTCAGACTCTGTCCCTCACCTGTTCTATCACT	GGCGA
CTCCATCACCAGTGGTTACTGGAACTGGATCCGGAAATTCCCAGGGAATAAACTTGAATACTTG	GGGTA
CATAAGTTACAGTGGTAGCACTTACTACAATCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCCATCACTCGAG	ACACA
TCCAAGAACCAGTGCTACCTGCACTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCTCATATTACTG	ITGTAA
GGGGGGGGCCACGGTACTAGCGACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCCCGGTCACCGTCTCCT	CAGCC
AAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGT(GACCA
TATGGGAGAGCTCCCAACGCGCTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGC	TTGGC
GTAATCATGGTAATAGCTGTTTCCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTCACAAT	

SEQUÊNCIAS DA REGIÃO VARIÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL QUE RECONHECE CEPA PATOGÊNICA DE Acanthamoeba E MÉTODOS DE USO

Campo da Invenção

[001]. O campo técnico da presente invenção está relacionado com a imunoquímica aplicada à medicina e à saúde pública. Em particular, esse documento destaca a caracterização bioquímica e imunológica de um anticorpo monoclonal murino capaz de identificar trofozoítos de Acanthamoeba com potencial patogênico demonstrando sua aplicabilidade como possível ferramenta na detecção do protozoário e, portanto, da ceratite amebiana.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. As amebas de vida livre (AVL) do gênero Acanthamoeba são protozoários encontrados em vários ambientes e com distribuição mundial (CLARKE; NIEDERKORN, 2006; VISVESVARA et al., 2007). São potencialmente patogênicas, podendo causar infecções em humanos e animais, como a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) e a ceratite amebiana (CA) (MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003; FREDERICK et al., 2004, VISVESVARA et al., 2007). A EAG é uma infecção do encéfalo bastante rara, com cerca de 150 casos humanos reportados mundialmente (TRABELSI et al., 2012). A CA, por outro lado, tem sido diagnosticada com frequência crescente durante as últimas décadas, inclusive com descrição de surtos, que estão associados principalmente ao uso de lentes contato (YODER et al., 2012; JASIM et al., 2012, ARMSTRONG, 2000).

[003]. O diagnóstico da CA tem sido geralmente realizado por identificação do agente, em meio de cultura de material raspados da córnea. Nas fases iniciais, a CA é muitas vezes confundida com outras infecções como as fúngicas e as virais, o que leva ao tratamento tardio e aumenta as chances de sequelas oculares (ALVARENGA et al., 2000; LORENZO-MORALES et al., 2015). As técnicas moleculares de detecção de DNA são oferecidas como alternativa diagnóstica, mas nem sempre são acessíveis em todos os centros de diagnóstico (WALOCHNIK et al., 2000 b; KHAN; TAREEN, 2003, COSTA et al., 2017).

Costa et al. (2017) avaliaram um método de extração de DNA que foi eficiente para detectar um trofozoíto e um cisto por snPCR, em amostras de córnea de animais e de humanos. No entanto, existem ainda algumas limitações das técnicas moleculares devido ao baixo número de amebas encontradas nas raspagens da córnea e a maior resistência dos cistos à extração e liberação de DNA que devem ser considerados no estabelecimento de um protocolo quando se utilizam técnicas moleculares.

[004]. Nesse sentido, abordagens com outros princípios de detecção de Acanthamoeba como a utilização de métodos imunológicos são promissores para identificação específica dos agentes patogênicos no sítio de infecção.

[005]. Adicionalmente, o emprego de anticorpos pode auxiliar no entendimento da imunopatogenia da infecção, na medida em que podem ser testados em ensaios para avaliar a importância de antígenos específicos envolvidos na invasão do parasito.

[006]. Em 2012, Becker-Finco e colaboradores, descreveram a produção de anticorpos policionais e monocionais murinos específicos para proteínas presentes em *Acanthamoeba*. Um desses anticorpos, denominado mAb3, foi capaz de identificar 3 isolados com potencial patogênico e não reconheceu antígenos de isolado sem patogenicidade, demostrando assim sua capacidade de diferenciação entre isolados de *Acanthamoeba*. Neste documento procura-se caracterizar os dados desse anticorpo tanto bioquimicamente quanto imunoquimicamente e documentar a capacidade mínima de mAb3 capaz de reconhecer antígenos específicos em diferentes ensaios imunoquímicos.

Descrição da abordagem do problema técnico

[007]. A ceratite por Acanthamoeba é frequentemente confundida com outras ceratites infecciosas (causadas por fungos, bactérias e vírus) que acabam retardando o início do tratamento específico (ALVARENGA et al., 2000; WALOCHNIK et al., 2000 b; KHAN; TAREEN, 2003; LORENZO-MORALES et al., 2015). Geralmente o estágio inicial da CA é confundido com a ceratite herpética, e quando o paciente apresenta um estágio avançado, é similar à ceratite fúngica (ALKHARASHI et al., 2015).

[008]. Outra questão importante são as infecções mistas, com bactérias e fungos. O tratamento para Acanthamoeba deve ser mais intenso, com drogas específicas, podendo durar até um ano ou mais, dependendo do grau, devido ao encistamento dos trofozoítos e consequentemente maior resistência do agente (IOVIENO et al., 2010). O diagnóstico e tratamento da CA são essenciais, pois se não iniciados precocemente, podem levar a perda de visão (DUA et al., 2009).

[009]. O prognóstico é, geralmente, ruim devido ao atraso significativo no diagnóstico e frequente falta de tratamento médico efetivo (ALKHARASHI et al., 2015; LOENZO-MORALES et al., 2015).

[010]. O método atual de detecção da CA envolve a cultura e identificação microscópica do raspado de córnea (THOMPSON et al., 2008). Dependendo assim da capacidade do técnico para identificação.

[011]. Dados adicionais podem ser obtidos da análise de todo o material utilizado no manuseio, desinfecção e armazenamento das lentes de contato, como por exemplo, a cultura desses materiais. Técnicas baseadas na detecção de DNA do parasito (THOMPSON et al., 2008) e a microscopia confocal, (DAAS et al., 2017) também vem sendo utilizadas, porém seu uso ainda é mais restrito para a realidade de muitos centros oftalmológicos ou apresentam limitações.

[012]. A avaliação da expressão proteica e estudo antigênico de protozoários fornecem uma perspectiva promissora na diferenciação e caracterização funcional dos diferentes componentes presentes em cada cepa (GARATE et al., 2006; TURNER et al., 2005; WALOCHNIK et al., 2004). As análises de propriedades bioquímicas e imunológicas das proteínas podem contribuir com informações importantes sobre possíveis marcadores de patogenicidade, além de permitirem a caracterização de antígenos estágio-específico, o que é relevante considerando que o ciclo da Acanthamoeba envolve duas formas evolutivas (cisto e trofozoíto). Outros estudos já veêm utilizando os perfis proteicos antigênicos como estratégia para diferenciar е Acanthamoeba patogênica e não patogênica (WALOCHNIK et al., 2004).

[013]. O anticorpo mAb3 produzido por Becker-Finco et al. (2012) é capaz de identificar domínios antigênicos compartilhados por isolados clínicos e ambientais potencialmente patogênicos, porém não reconhece isolados ambientais sem aparente patogenicidade. Sendo assim, este foi empregado frente a antígenos de Acanthamoeba de diferentes isolados (ALX, AP2, AP4, AR14, AR15, LG, R2P5 e AC-G1) nos ensaios de Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western Bloting e citometria de fluxo.

Descrição detalhada da Invenção

<u>Amplificação dos hibridomas e purificação dos anticorpos</u> <u>monoclonais anti-Acanthamoeba</u> [014]. Os hibridomas produtores de anticorpos anti-Acanthamoeba (mAb3), foram produzidos pelo Laboratório de Imunoquímica (Limq) da UFPR (BECKER-FINCO et al., 2012). As células foram descongeladas e amplificadas com base no protocolo descrito pelo autor, o sobrenadante celular foi submetido a uma purificação de imunoafinidade para purificação das imunoglobulinas, que foram posteriormente armazenadas e testadas, por ELISA, Western Bloting e citometria de fluxo.

[015]. Para sequenciamento das regiões variáveis foi realizado a extração do RNA mensageiro dos hibridomas mAb3 pelo método trizol. Foi obtido o cDNA por transcrição reversa e então realizada a amplificação por PCR e sequenciamento das regiões que codificam as cadeias variáveis leves e pesadas do anticorpo. O sequenciamento foi realizado de acordo com o protocolo usado por Fields et al. (2013). A cadeia variável pesada (VH) amplificada com a utilização de primers degenerados IGH-For (GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG) e IGH-Rev (GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG) e a cadeia variável leve (VL) com os primers V-LAMBDA-Rev (CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA) e V-LAMBDA-For (CTT GGG CTG ACC TAG GAC AGT). Após verificação da presença do fragmento de DNA que codifica as cadeias por gel de agarose 1,5%, cada fragmento foi purificado e clonado em vetor PGEM T-easy por meio de ligação usando ligase T4 e transformado em células competentes E. coli TG1. Após transformação os plasmídeos contendo o inserto foram selecionados, analisados em gel de agarose 1,5% e recuperados pela técnica de extração de DNA plasmidial (miniprep), foram então purificados, novamente analisados em gel de agarose 1,5% e dosados por espectrofotômetro (Thermo Scientific Nano Drop 2000). Realizou-se a purificação do DNA e reação de seguenciamento, o primer utilizado para seguenciamento foi o T7 universal (TAA TAC GAC

TCA CTA TAG GG), no sequenciador 3500XL, Applied Biosystems, Genetic Analyzer, seguindo o modelo de sequenciamento de DNA por SANGER.

Pesquisa e análise das sequências obtidas em bancos de dados

[016]. Para comparar as sequências da região V (variável) de imunoglobulinas foi utilizado o ImMunoGenetTics (IMGT), numeração única, e padrões aprovados pela Organização Mundial de Saúde (OMS)/União Internacional de Sociedades de Imunologia (IUIS) para a IG e TR. Para tanto foram utilizadas as ferramentas de interfaces Web IMGT (IMGT / V-QUEST) e bases de dados (IMGT / LIGM-DB e IMDT / 3D estrutura-DB) (LEFRANC et al., 2015).

[017]. De acordo com a ferramenta IMGT a sequência variável da cadeia pesada do anticorpo (VH) apresentou 96,84% de similaridade com sequência murina IGHV3-8*02 F (Ref.AJ972403) e a sequência variável de cadeia leve (VL) apresentou 97,92% de similaridade com a sequência murina IGLV1*01 F (Ref.J00590).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

[018]. Placas NUNC de 96 wells foram incubadas com 100 µL de uma solução de 10 µg/mL dos antígenos solúveis de trofozoítos em tampão carbonato (NaHCO3 100 mmol/L, pH 9,6) durante 12-16 h a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de lavagem (0,05% Tween-salina-SL) e bloqueadas com a solução de bloqueio (caseína a 2% diluída em PBS), por 1 h a 37°C. A placa foi incubada com uma solução contendo o anticorpo mAb3, ou sobrenadantes celulares diluídos em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína, 0,05% tween 20). Foram adicionados à placa anticorpos secundários, imunoglobina heteróloga a anti-IgG murino conjugada com a enzima peroxidase (Sigma, diluído 1:4000 em tampão de incubação). Para revelar a interação específica dos anticorpos adicionou-se uma solução de ortofenilenodiamino (OPD), e após 15 min de incubação, o processo foi interrompido pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico diluído 1:20. A leitura da absorbância em 490 nm foi então realizada.

Eletroforese SDS-PAGE

[019]. As proteínas solúveis dos diferentes isolados (1,5 ou 5 μg) por SDS-PAGE (12,5% de gel de poliacrilamida) foram resolvidas por eleroforese segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A migração ocorreu em tampão de migração (Tris 0,025 mol/L, glicina 0,2 mol/L e SDS 0,5%, pH 8,3) sob voltagem de 100 V por 180 min.

Western blotting

[020]. As proteínas do gel foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon[™] Transfer Membranes – MILLIPORE) de 0,22 µm, submetidas a uma corrente de 24 V durante 16 h e, posteriormente, por mais uma hora a 48 V em tampão de transferência com pH 8,3 contendo glicina 0,2 mol/L, Tris 0,025 mol/L e metanol 20% (v/v). Após a eletrotransferência, a presença das proteínas foi verificada mergulhando-se a membrana de PVDF em solução de Ponceau 0,2% e 10% de ácido acético. Com a visualização das bandas, a membrana foi lavada em tampão PBS-Tween (PBS-T) 0,05% por três vezes de 5 min e, posteriormente, bloqueada com tampão PBS-T 0,3%, por 1 h, sob agitação e a 37°C. Após o bloqueio, a membrana foi lavada novamente por três vezes em tampão PBS-T 0,05% e, em seguida foi acrescentado 0 anticorpo monoclonal mAb3 em diferentes concentrações (0,5 a 5,0 µg/mL), ou soros murinos contendo anticorpos policlonais anti-AP4 e anti-AP2 (1:100) diluídos em PBS-T 0,05%. As membranas foram então incubadas a 37°C por 2 h. Após três lavagens como descrito anteriormente, as membranas foram incubadas por 1 h a 37°C e, sob agitação, na presença de anticorpos anti-mouseperoxidaseanti-his (Sigma) em diluição 1:4000. Foram realizadas duas lavagens de PBS-T 0,05%, seguidas de mais três lavagens com PBS. Para revelação foi utilizada uma solução de PBS contendo 0,025% de 4-cloro 1-naftol diluído em 1 mL de metanol, 0,05% de diaminobenzidina (DAB) em presença de H_2O_2 0,04% (v/v) ou por quimiluminescência utilizando uma solução de revelação como luminol e filme fotográfico.

<u>Citometria de fluxo</u>

[021]. Os trofozoítos de Acanthamoeba foram separados por centrifugação a 500xg por 10 min, lavados com PBS, quantificados e tiveram sua concentração ajustada para uma densidade de 1x10⁶ a 1x10³ células/mL. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min, bloqueadas com albumina 2% e lavadas com PBS 3 vezes entre cada uma das etapas. Para testar a reatividade do anticorpo frente à amostra na sua forma nativa, os trofozoítos foram incubados com mAb3 (125 µg/mL) por 12 h. As células foram então lavadas com PBS e incubadas com ALEXA flúor 488 goat anti-mouse IgG [H+L] (Molecular probes®) (1:300). A intensidade de fluorescência foi medida no citômetro (BD FACSCalibur™) utilizando o filtro FL1 - 488 nm. Como controles foi utilizado a própria fluorescência amostral e a reatividade cruzada de um anticorpo secundário.

Legendas das figuras

[022]. FIGURA 1: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA CODIFICADORA DO FRAGMENTO DE CADEIA LEVE E PESADA DO ANTICORPO mAb3. Sequência de DNA que codifica o anticorpo mAb3 (A) pares de bases nitrogenadas do fragmento de cadeia pesada (VH) e (B) pares de bases nitrogenadas do fragmento de cadeia leve (VL).

[023]. FIGURA 2: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5% DEMONSTRANDO A AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONDIFICANTE DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA (VH) E LEVE (VL). VH com tamanho de aproximado de 400 pb. VL com tamanho aproximado de 350 pb. Padrão 1 Kb Plus DNA Ladder (VIVANTIS).

[024]. FIGURA 3: SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO FRAGMENTO DE CADEIA PESADA DO ANTICORPO mAb3. Representação da estrutura secundária, pelo "Collier de Perles", do domínio variável de cadeia pesada VH do anticorpo mAb3, realizado por meio do programa IGMT.

[025]. FIGURA 4: SEQUÊNCIA DO FRAGMENTO DE CADEIA LEVE DO ANTICORPO mAb3. Representação da estrutura secundária, pelo "Collier de Perles", do domínio variável de cadeia leve VL-λ do anticorpo mAb3, realizado por meio do programa IGMT.

[026]. FIGURA 5: ELISA DE REATIVIDADE DO mAb3 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES FRENTE AOS ISOLADOS PATOGÊNICO (AP2) E NÃO PATOGÊNICO (AP4). Antígenos totais obtidos a partir dos isolados AP2 e AP4 foram adsorvidos à placa na concentração de 10 μg/mL, e testados frente ao mAb3 em diferentes concentrações (5; 2,5; 1,25 e 0,625 μg/mL).

[027]. FIGURA 6: ELISA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A ANTIGENOS DE Acanthamoeba. (A) Antígenos totais obtidos a partir dos isolados ALX, AP2, AP4, AR14, AR15, LG, R2P5 e AC-G1 de Acanthamoeba foram adsorvidos à placa na concentração de 10 µg/mL, e testados frente ao mAb3 na concentração de 5 µg/mL. Um soro murino irrelevante foi empregado como controle negativo e soros de camundongos contendo anticorpos anti-AP4 e anti-AP2, como controles positivos, na diluição (1:100).

[028]. FIGURA 7: ELISA DA REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A ANTIGENOS DE Acanthamoeba E FUNGOS. (A) Antígenos totais obtidos a partir dos isolados de Acanthamoeba AP2 e AC-G1 e fungos Fusarium sp. Aspergirllus sp. e Candida sp., foram adsorvidos à placa na concentração de 10 μg/mL, e testados frente ao mAb3 na concentração de 5 µg/mL. Um soro murino irrelevante foi empregado como controle negativo e soros de camundongos contendo anticorpos anti-AP4 e anti-AP2, como controles positivos, na diluição (1:100).

[029]. FIGURA 8: REATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA ANTÍGENOS DE Acanthamoeba VISUALIZADA POR WESTERN BLOTTING. As mesmas concentrações (2 μg/mL) de proteínas solúveis dos isolados de Acanthamoeba ALX, AP4, AP2, AR15, AR14, R2P5, LG e AC-G1 foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. (A) e transferidas para membrana de nitrocelulose (B, C e D). A imuno-reatividade do anticorpo monoclonal mAb3, na concentração de 1,5 μg/mL (B e C) e em relação aos soros de anticorpos policionais anti-AP2 e AP4 (D) foram avaliadas frente aos antígenos específicos e não específicos.

[030]. FIGURA 9: HISTOGRAMA EVIDENCIANDO A REATIVIDADE DO mAb3 FRENTE A DIFERENTES ISOLADOS DE Acanthamoeba sp. POR CITOMETRIA DE FLUXO. Emissão da fluorescência dos diferentes trofozoítos de Acanthamoeba, fluorescência dos diferentes trofozoítos de Acanthamoeba frente ao mAb3 (125 μ/mL) e fluorescência dos diferentes trofozoítos de Acanthamoeba frente a ALEXA flúor ® 488 goat anti-mouse IgG [H+L] (1:300), para os diferentes isolados, a média de variação corresponde a tabela apresentada abaixo.

[031]. FIGURA 10: HISTOGRAMA DA QUANTIDADE MÍNIMA DE TROFOZOÍTOS CAPAZES DE SER DETECTADOS PELO mAb3, AVALIADO POR CITOMETRIA DE FLUXO. (A) ALX 1×10^6 , (B, C, D e E) ALX 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3 frente a 125 µ/mL de mAb3, respectivamente. A média de variação, que corresponde a diferença entre as amostras, corresponde a tabela apresentada abaixo. *Apenas ALX, controle negativo de reatividade.

11/13

<u>Referências</u>

ALKHARASHI, M.; LINDSLEY, K.; LAW, H. A.; SIKDER, S. Medical interventions for *Acanthamoeba* keratitis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.2, p. 2-28, 2015.

ALVARENGA, L. S.; FREITAS, D.; HOFLING-LIMA, A. L. Ceratite por *Acanthamoeba*. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63 n.2, p.155-159, 2000.

ARMSTRONG, M. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 65-73, 2000.

BECKER-FINCO, A.; COSTA, A. O.; SILVA, S. K.; RAMADA, J. S.; FURST, C.; STINGHEN, A. E.; DE FIGUEIREDO, B. C.; DE MOURA, J.; ALVARENGA, L. M. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*. **Parasitology First View**, p. 1-10, 2012.

CLARKE, D. W.; NIEDERKORN, J. Y. The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1400-1405, 2006.

COSTA, A. O.;FURST, C.;ROCHA, L. O.;CIRELLI, C.;CARDOSO, C. N.;NEIVA, F. S.;POSSAMAI, C. O.;DE ASSIS SANTOS, D.;THOMAZ-SOCCOL, V. Molecular diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis: evaluation in rat model and application in suspected human cases. **Parasitology Research**, v. 116 (4), p. 1339-1344, 2017.

DAAS, L.; VIESTENZ, A.; SCHNABEL, P.; FRIES, F. N.; HAGER, T.; SZENTMÁRY, N.; SEITZ, B. Confocal microscopy in *Acanthamoeba* keratitis as an early relapse-marker. **Clinical Anatomy**, 2017.

DUA, H. S.; ARALIKATTI, A.; SAID, D. G. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 93, p. 1555-1556, 2009.

FIELDS, C.; O'CONNELL, D.; XIAO, S.; LEE, G.; BILLIALD, P.; MUZARD, J. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nature Protocols**, v. 8, n. 6, p. 1125-1144, 2013.

FREDERICK L. SCHUSTER, GOVINDA S. VISVESVARA. Free-living as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. International Journal for Parasitology, v. 34, p. 1001-1027, 2004.

GARATE, M.; MARCHANT, J.; CUBILLOS, I.; CAO, Z.; KHAN, N. A.; PANJWANI, N. In vitro pathogenicity of *Acanthamoeba* is associated with the expression of the mannose-binding protein. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, p. 1056-1062, 2006.

IOVIENO, A.; LEDEE, D. R.; MILLER, D.; ALFONSO, E. C. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. **Ophthalmology**, v. 117, p. 441-443, 2010.

JASIM, H.; KNOX-CARTWRIGHT, N.; COOK, S.; TOLE, D. Increase in *Acanthamoeba* keratitis may be associated with use of multipurpose contact lens solution. **British Medical Journal**, 2012.

KHAN, N. A.; TAREEN, N. K. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorisation of *Acanthamoeba* trains. **Folia Parasitologica**, v. 2, p. 97-104, 2003.

LEFRANC, M. P.; GIUDICELLI, V.; DUROUX, P.; JABADO-MICHALOUD, J.; FOLCH, G.; AOUINTI, S.; CARILLON, E.; DUVERGEY, H.; HOULES, A.; PAYSAN-LAFOSSE, T.; HADI-SALJOQI, S.; SASORITH, S.; LEFRANC, G.; KOSSIDA, S. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. **Nucleic Acids Research**, p. 413-422, 2015.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, p. 1-20, 2015.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 273-307, 2003.

THOMPSON, P. P.; KOWALSKI, R. P.; HANKS, R. M. Q.; GORDON, Y. J. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 3232-3236, 2008. TURNER, M. L.; COCKERELL, E. J; BRERETON, H. M.; BADENOCH, P. R.; TEA, M.; COSTER, D. J.; WILLIAMS, K. A. Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies. International Journal for Parasitology, v. <u>35</u>, p. 981-990, 2005.

TRABELSI, H.; DENDANA, F.; SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; CHEIKHROUHOU, F.; NEJI, S.; MAKNI, F.; AYADI, A. Pathogenic freeliving amoebae: epidemiology and clinical review. **Pathologie Biologie**, v. 60(6), p. 399-405, 2012.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, p. 1-26, 2007.

WALOCHNIK, J.; SOMMER, K.; OBWALLER, A. E.; SCHOBER M. H.; ASPOCK, H. Characterisation and differentiation of pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* strains by their protein and antigen profiles. **Parasitology Research**, v. 92, p. 289-298, 2004.

YODER, J. S.; VERANI, J.; HEIDMAN, N.; ALFONSO, E. C.; JONES, D. B.; BRUCKNER, D.; LANGSTON, R.; JENG, B. H.; JOSLIN, C. E.; TU, E.; COLBY, K.; VETTER, E.; RITTERBAND, D.; MATHERS, W.; KOWALSKI, R. P.; ACHARYA, N. R.; LIMAYE, A. P.; LEITER, C.; ROY, S.; ROBERTS, J.; BEACH, M J. *Acanthamoeba* keratitis: the persistence of cases following a multistate outbreak. **Ophthalmic Epidemiology**, v. 19, p. 221-225, 2012.

REIVINDICAÇÕES

- A presente invenção aqui descrita trata-se de sequências aminoacídicas da região variável de anticorpo monoclonal murino, mAb3, anti cepa patogênica de Acanthamoeba caracterizado por possuir:
- A) um domínio variável de cadeia pesada incluindo as regiões determinantes de complementariedade ou CDR (do inglês "complementarity determining regions") 1, 2 e 3 (CDR1, CDR2 e CDR3) constituído da seguinte sequência aminoacídica: SEQ ID N° 1 EVQLQESGPSLVKPSQTLSLTCSITGDSITSGYWNWIRKFPG NKLEYLGYI SYSGSTYYNPSLKSRISITRDTSKNQCYLHLNSVTTEDTASYYCVRGGHGTSDF DVWGAGTPVTVSS.
- B) um domínio variável de cadeia leve incluindo as regiões determinantes de complementariedade CDR1, CDR2 e CDR3 constituindo a seguinte sequência aminoacídica: SEQ ID Nº 2 QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGT NNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEATYFCALWYNNLWVFGGG TNLTVL
- 2. Sequências aminoacídicas de anticorpo monoclonal murino que participam da interação com antígenos específicos de Acanthamoeba. de acordo com reivindicação а 1. caracterizadas por possuírem como CDRs do fragmento variável de cadeia pesada as sequências: CDR1: SEQ ID Nº 3 GDSITSGY, CDR2: SEQ ID Nº 4 ISYSGST e CDR3: SEQ ID Nº 5 VRGGHGTSDFDV. Para as CDRs do fragmento variável de cadeia leve compreendendo: CDR1: SEQ ID Nº 6 TGAVTTSNY, CDR2: SEQ ID Nº 7 GTN e CDR3: SFQ ID Nº 8 AI WYNNI WV.

Uso de anticorpo monoclonal, de acordo com as reivindicações 1
 e 2, caracterizado por detectar proteínas solúveis de Acanthamoeba
 sp. com potencial patogênico por imunoensaios.

4. Uso de anticorpo monoclonal, de acordo com as reivindicações
1, 2 e 3, caracterizado por diferenciar cepas de Acanthamoeba sp.
com potencial patogênico das não patogênicas por imunoensaios.

Uso de anticorpo monoclonal, de acordo com as reivindicações
 2 e 4, caracterizado por detectar trofozoítos de Acanthamoeba
 sp. por citometria de fluxo sem a utilização de permeabilizantes
 celulares.

6. Uso anticorpo monoclonal, de acordo com a reivindicação 3, 4 e 5, caracterizado por ser um insumo de imunensaio para detecção de antígenos de trofozoítos de Acanthamoeba que apresentam potencial patogênico no que se refere a induzir a ceratite amebiana. <sequence>CTGCGACGACGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCGCGGGAATTCGATTGAGGTGCAAC TGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTCGTGAAACCTTCTCAGACTCTGTCCCTCACCTGTTCTATCACTGGCGA CTCCATCACCAGTGGTTACTGGAACTGGATCCGGAAATTCCCAGGGAATAAACTTGAATACTTGGGGTA CATAAGTTACAGTGGTAGCACTTACTACAATCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCCATCACTCGAGACACA TCCAAGAACCAGTGCTACCTGCACTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCTCATATTACTGTGTAA GGGGGGGCCACGGTACTAGCGACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCC AAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCA TATGGGAGAGCTCCCAACGCGCTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGC GTAATCATGGTAATAGCTGTTTCCTGTGTGAAAATTGTTATCCGCTCACAAT</sequence>

Β.

Fig. 1



Fig. 2







Fig.4



Fig. 5











Fig. 8



Isolado	Média (fluorescência frente à <i>Acanthamoeba</i>)	Média (isolados na presença de mAb3)	Média (isolados na presença de ALEXA flúor 488)
ALX	40,68	523,30	76,35
AP2	44,11	582,94	46,14
AR14	46,98	50,03	50,48
AR15	47,40	70,41	50,94
LG	44,91	61,53	42,17
R2P5	40,32	53,28	47,40
AC-G1	41,79	42,17	46,98

Fig. 9



ĺ.



ΠĽ

FL1-H

Fig. 10

<u>RESUMO</u>

SEQUÊNCIAS DA REGIÃO VARIÁVEL DE ANTICORPO MONOCLONAL QUE RECONHECE CEPA PATOGÊNICA DE Acanthamoeba E MÉTODOS DE USO

de Acanthamoeba foram Antígenos empregados como imunógenos para a produção de um anticorpo monoclonal específico, mAb3, com capacidade de reconhecer componentes moleculares presentes em trofozoítos de Acanthamoeba com potencial patogênico. O anticorpo monoclonal mAb3 teve a sequência das regiões variáveis de cadeia leve (VL) e cadeia pesada (VL) determinada e, foi formato original diferentes empregado no seu em ensaios imunoquímicos como ELISA, Western blotting e citometria de fluxo, na presença de antígenos solúveis ou trofozoítos de diferentes isolados de Acanthamoeba. Em todos os formatos avaliados o mAb3, foi capaz de reconhecer e detectar antígenos específicos de Acanthamoeba demonstrando seu potencial para ser empregado no diagnóstico da ceratite amebiana, considerando que não apresentou reatividade cruzada com antígenos de Fusarium sp., Candida sp. e Aspergillus sp. que também são patógenos causadores de ceratite.