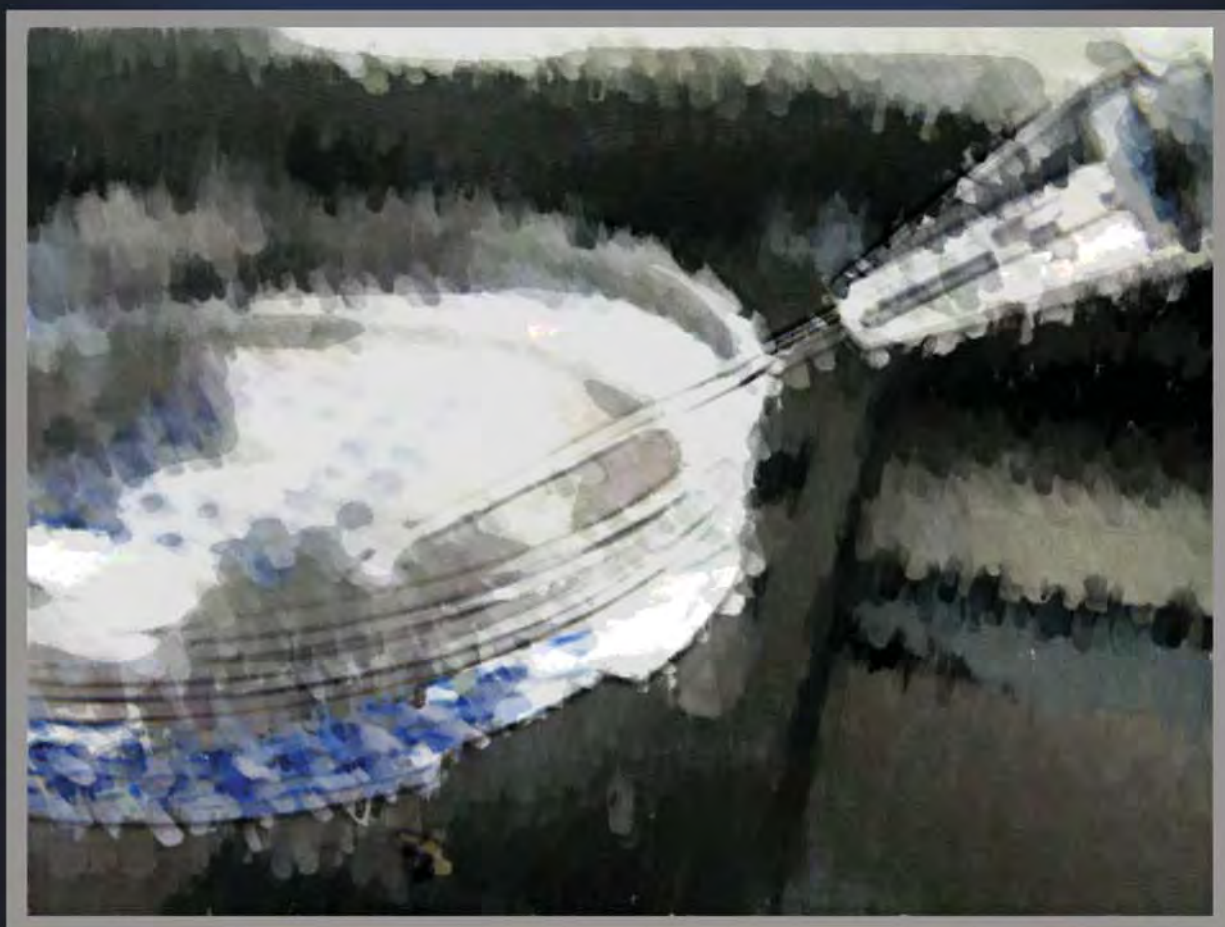


**ANÁLISE DO DESEMPENHO DA TÉCNICA
DE CLONAGEM CELULAR
POR MICROMANIPULAÇÃO**



Daniel Bassetto Jesuino

BOTUCATU

2011

Daniel Bassetto Jesuino

**Análise do desempenho da técnica de
Clonagem Celular por Micromanipulação
versus Diluição Limitante**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica do Hemocentro da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Jesuino, Daniel Bassetto.

Análise do desempenho da técnica de clonagem celular por micromanipulação versus diluição limitante / Daniel Bassetto Jesuino. - Botucatu, 2011

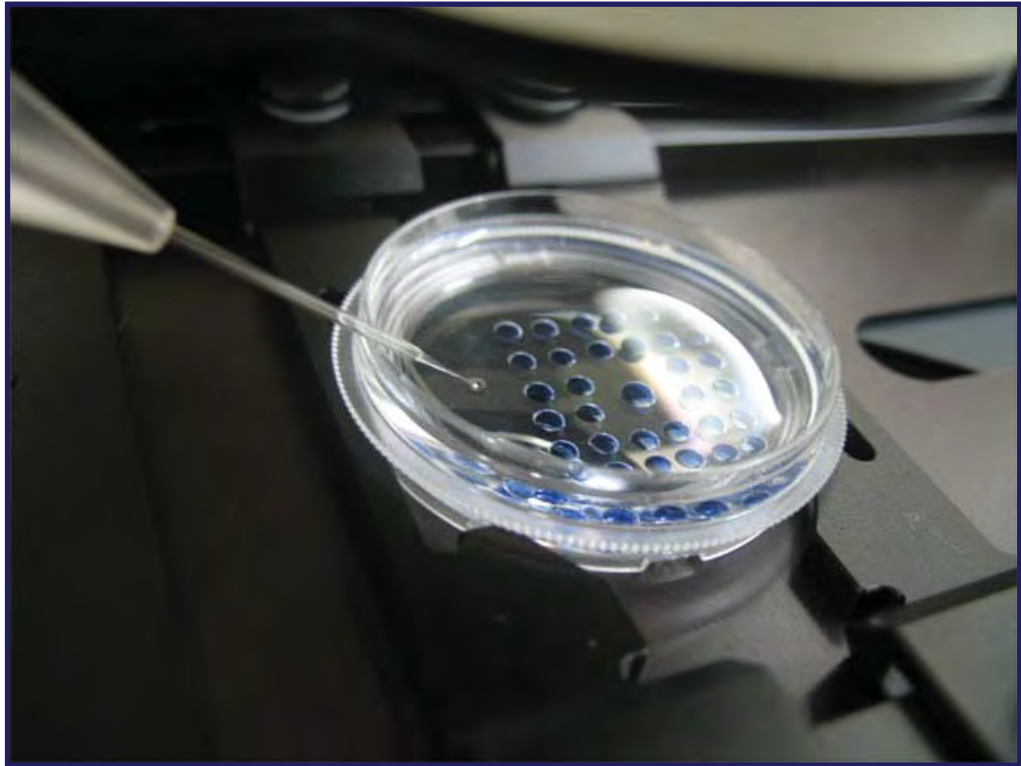
Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 90400003

1. Clonagem – Técnica.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Clonagem celular; Diluição limitante; Híbridomas; Micromanipulação



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

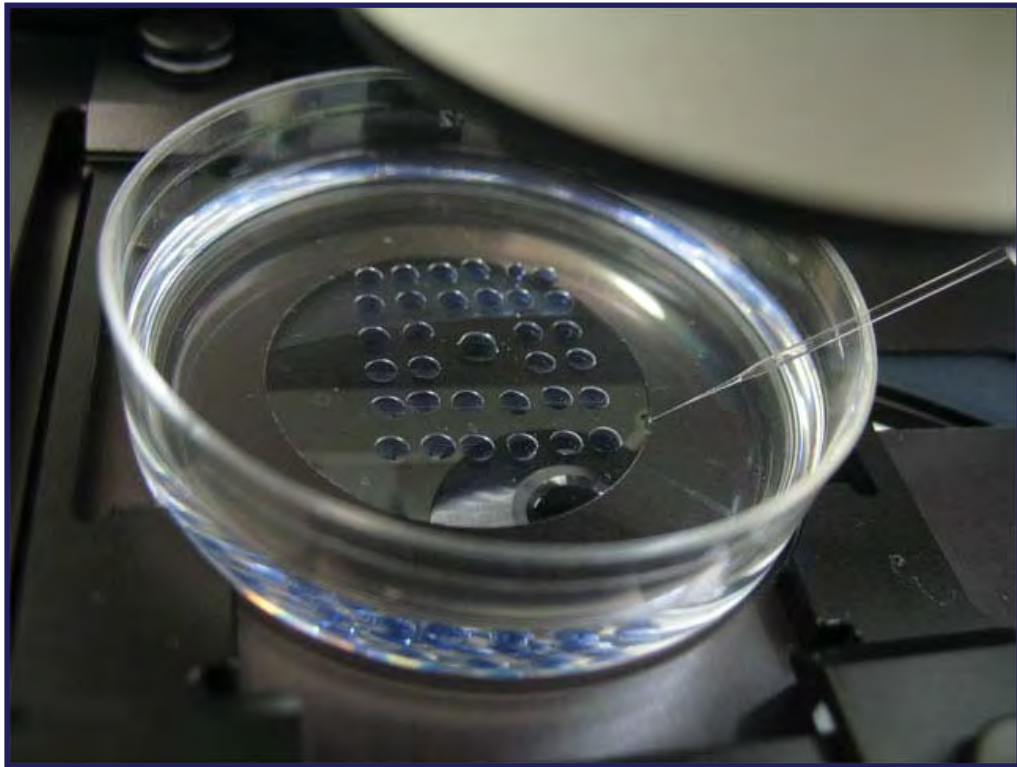
**Aos meus pais, Paulo e Cláudia,
à minha irmã Aline,
à minha namorada Camila,
aos meus familiares e amigos.**



ΕΠΪΓΡΑΦΕ

"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho
original."

Albert Einstein



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente...

A Deus, acima de tudo e todos e por tudo... Seja lá qual for o nome que você dá ao seu, não há como negar que não fazemos nada sozinhos...

Ao meu pai Paulo, exemplo de honestidade, força, determinação, trabalho e alegria! Mesmo quando não está por perto está me ensinando algo! Com você aprendi que nada é impossível, basta "querer fazer"! Tenho muito orgulho de ser seu filho!

À minha mãe Claudia, exemplo de doçura e energia, criatividade e ternura, "loucura" e seriedade! Sempre com idéias para mudar algo... Mãe coruja, meu porto seguro sempre... Que este trabalho seja só o começo das alegrias que eu possa lhe dar!

À minha irmã Aline, baladeira, divertida, agitada e explosiva... Vou pegar no seu pé sempre, só pra te ver voar cada vez mais alto!

À minha namorada Camila, a quem devo muito mais do que poderei pagar... Mulher da minha vida, você foi fundamental para segurar meu mundo quando ele caiu... E pra rir comigo dos tombos quando me levantei... Tão forte e tão frágil... meu anjinho da guarda... Amo você!

Aos meus avós Nelson (Vô Careca) e Doraci (Vó Ciza) exemplos de luta, simplicidade, cumplicidade e amor... Que com seus jeitos simples, entre uma comidinha e uma caipirinha, uma estória e uma moda de viola, me ouviram contar as dificuldades deste trabalho...

Aos meus avós Aparecida (Vó Cida) e Genésio (Vô Genésio - *in memoriam*), exemplos de força e perseverança inabaláveis! Pela preocupação constante, e por me ensinarem que a vida deve ser bem vivida...

À minha segunda família, Paula, tia Rose e Vó Nadyr, por me acolherem tão bem, por tanto tempo, muitas e muitas vezes "destruído e mal-humorado", o carinho que tenho por vocês é o mesmo que tenho pela minha família...

À Prof^a Elenice Deffune, exemplo de coragem e atitude... Por me acolher em seu laboratório tendo como referência apenas meu primeiro nome... Pelos ensinamentos, genialidade, pensamento rápido e ousadia... Também por me dar toda a autonomia para a realização deste e de outros trabalhos... Pela paciência com meu jeito "diferente" de querer as coisas...

À Prof^a Rosana Rossi Ferreira, exemplo de excelência em pesquisa, profissionalismo, garra e determinação... pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório, pelos puxões-de-orelha, pelas palavras acolhedoras em plena tempestade e por manter a cabeça no lugar quando todos gostariam de arrancar a de alguém... Rô... sem você, não chegaríamos até onde chegamos... Obrigado!

À amiga Dra Marjorie de Assis Golim

À amiga Fátima Regina Guimarães (Tatíssima), a "fada da cultura"... Até hoje, basta o som da voz dela para as "meninas" pularem nos pocinhos... por nos mostrar que mesmo nos momentos mais difíceis podemos rir... Por seus ensinamentos... Com você aprendi que cultura não é uma ciência exata... Tata, não tenho palavras pra dizer o quanto devo a você... Obrigado!

À amiga Valéria Alves da Silva (Léia), por sempre me fazer rir, pelas caronas, e pelas caipirinhas entornadas na chácara...

À amiga e colega de profissão Priscila Murador, por acreditar em mim, por ouvir "trocentas" vezes as minhas histórias e por me ensinar que ser bom não é uma atitude, é um estilo de vida...

À amiga Josy e o amigo João Guilherme, Josy... exemplo de doçura e serenidade... pelos inúmeros desabafos no fluxo, pelas risadas e por todo o auxílio para as clonagens e cultura... pelo auxílio material no projeto... suas mãos foram as minhas em muitas horas... Ao amigo João Guilherme, por compreender que cultura nem sempre tem dia e hora e por agüentar a gente falando de trabalho, mesmo tomando cerveja...

À amiga Vitória (Chuchu), por me mostrar que às vezes é preciso fazer mais e pensar menos... Por ser tão valente e ousada... pelas risadas... pelas consultas telefônicas e pela maior demonstração de trabalho em equipe que já presenciei...

À amiga Gabrielle, pelas dicas no laboratório, na graduação e na pós... pelas caronas paulistanas e pelas risadas...

À amiga Marina, por me auxiliar nos primeiros passos no laboratório, por me acolher em sua casa em Bauru e por nunca se esquecer de nós...

Às amigas Thaiane, Mariele e Juliane, pela disponibilidade em mudar seus horários para me auxiliar nas clonagens, pelos momentos de insensatez no final da corrida... estamos no mesmo barco... mas elas começaram a remar antes...

Aos amigos Ângelo e Woner, companheiros de idéias doidas, dois "figuras" do mundo dos números... pelas muitas conversas sem pé-nem-cabeça, pela oxigenada no cérebro, pelo auxílio na Info Ching Ling, pelas risadas...

Aos colegas de bancada: Henrique, Paula, Regina e Juliana, por me compreenderem quando disse coisas boas, de maneiras não tão boas... pelos momentos de descontração e pelos milhões de "favorzinhos" que pedi...

À amiga Michelle, que conquista todo mundo com seu jeitinho atrapalhado, mas que não erra a mão na hora de por a mão-na-massa...

Ao amigo Valdir... não é a toa que te chamam de "grande" ou "mestre"... exemplo de humildade e seriedade, agradeço pelos ensinamentos e pelo mais sincero interesse... pela disposição em fazer força comigo e sempre "dar uma força"...

À amiga Janice pelos muitos "galhos" e "pepinos" resolvidos...

Aos colegas de Mestrado: Tina, Jefferson, Karina, Telma, Vanessa, Alexandre, Renato, Marcos e Gustavo, por me deixarem acordado e pelos momentos mais loucos que vivi em Jaú City...

Às amigas Adáise (Dadá) e Denise (Dê), por sua disposição em ajudar a qualquer momento... pelas dúvidas tiradas com frequência da porta do laboratório mesmo... pelas risadas e bom humor...

Ao Dr. Paulo E. A. Machado, exemplo de sabedoria e patriotismo... Por suas palavras serenas em momentos turbulentos e por suas contribuições para meus conhecimentos científicos e de História do nosso país...

À Prof^a Maria Inês de M. C. Pardini, por sempre me ajudar a responder as questões mais complexas, de biologia molecular ou não, com um grande sorriso no rosto...

A todos os professores do Programa de PG, por seu tempo, dedicação e disposição para tornar-me um bom profissional...

À Equipe da Agência UNESP de Inovação, Prof^o Dr. José Arana Varela, Prof^a Dra Vanderlan da S. Bolzani, Fabíola, Leopoldo, Paulo Velloso, Renan e Caroline, pela compreensão de minhas ausências necessárias para finalizar este trabalho... pelas boas risadas em dias "cinza" e por me darem outra visão da minha Universidade...

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Ju Capannacci e Chiara, pela ajuda com o NanoDrop e pelas risadas nas baladas...

À amiga Cléo, que com seu bom humor faz nossos dias mais engraçados... pelas "cartinhas" e energias positivas...

À equipe do Laboratório de Hemostasia: Dra. Izolete, Valter e Iracema, pela disposição...

À equipe do Laboratório de Sorologia: Dra. Rita Saccomano, Ângela e Amauri, pela atenção e disponibilidade em ajudar...sempre...

À equipe do Laboratório de Hematologia: Teresa e Priscila, pelas brincadeiras e pelas contagens de células...

Ao colega Esmite, pelos incontáveis "pedidos extras" e pela compreensão em dias não tão bons...

Ao colega e DJ Parré, pelos melhores momentos de luz e som que presenciei... pelas músicas atualizadas e pelo papo agradável em diversos momentos...

Ao colega Alessandro, pela força em diversos momentos...

Ao biólogo e bioterista Carlinhos, por manter e fornecer, sem aviso, os camundongos deste projeto...e pelos bons churrascos preparados...

Aos camundongos que silenciosamente deram suas vidas para este projeto... não foram em vão...

A todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos...



INTRODUÇÃO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....16

ARTIGO ORIGINAL

Ampliando a eficiência de clonagem: utilização da micromanipulação na produção de anticorpos monoclonais.23

REFERÊNCIAS.....50

ANEXOS53

RESUMO

Anticorpos monoclonais (*mAbs*) são ferramentas-chave na investigação de fenômenos biológicos e uma promissora alternativa para o tratamento de muitas doenças, em especial os tumores. A cadeia produtiva de *mAbs* apresenta pontos cruciais para o desenvolvimento de um produto de qualidade que justifique os altos custos de produção. O procedimento de clonagem celular é a etapa de produção que garante a monoclonalidade das células produtoras, assegurando a especificidade do *mAb*. Desde os anos 80 existem tentativas de otimização e automação deste procedimento visando a garantia da monoclonalidade e aumento na eficiência de clonagem. A captura celular sob observação direta ao microscópio pode ser considerada a única metodologia de clonagem celular que garante 100% de crescimento monoclonal. Neste trabalho avaliamos indicadores de eficiência de clonagem, tempo de execução e custos de uma metodologia de clonagem celular por micromanipulação em comparação com a metodologia de diluição limitante. Hibridomas murinos secretores de *mAbs* de diversas especificidades foram clonados em paralelo por ambas as técnicas. Não houve diferença no tempo de execução das metodologias embora a observação dos clones da micromanipulação seja de 4 a 6 vezes mais rápida. A produção de clones por micromanipulação é 4 vezes superior à diluição limitante com redução de 60% no consumo de meio de cultura, o que justifica os custos da metodologia. Concluímos que a clonagem celular por micromanipulação é uma técnica precisa e que garante 100% de crescimento monoclonal podendo vir a substituir a diluição limitante. Esta garantia elimina testes de comprovação da monoclonalidade e reduz o tempo de cultura necessário para obtenção de *mAbs*.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Clonagem celular; Diluição limitante; Hibridomas; Micromanipulação.

ABSTRACT

Monoclonal antibodies (*mAbs*) are outstanding tools for investigating biological phenomena and a promising alternative to treat several diseases, specially tumors. Production of *mAbs* has settled critical milestones at the production chain which justifies high development costs. Cell cloning procedure is the milestone that guarantees monoclonality and assures antibody specificity. Since the 80's there have been attempts to optimize and automate this procedure aiming to guarantee monoclonality and enhance cloning efficiency. Cellular capture under direct microscope observation is the only method considered to guarantee 100% monoclonal growth. On this work we evaluated cloning efficiency, working time and costs of a micromanipulating cloning technique compared with gold-standard limiting dilution. Murine secretor hybridomas of various specificity were cloned by both techniques in parallel. No differences were observed at both working times although observation of micromanipulated clones was 4 to 6 times faster. Cloning efficiency of micromanipulation cloning was 4 times higher than limiting dilution with 60% reduction on media consume what justifies methodology costs. Cell cloning by micromanipulation is a precise procedure that guarantees 100% monoclonal growth and could substitute limiting dilution. This guarantee eliminates additional tests to assure monoclonality and reduces culture working time on *mAbs* production.

Keywords: monoclonal antibodies; cell cloning; limiting dilution, hybridoma; micromanipulation.

INTRODUÇÃO

A produção de anticorpos monoclonais tornou-se, desde sua descrição ^(1,2), importante ferramenta da biotecnologia médica e da produção de biofármacos,

A primeira geração de anticorpos monoclonais – *mAbs*, é constituída por proteínas 100% murinas e proporcionou grandes avanços nas pesquisas biomédicas, tais como caracterização de proteínas, isolamento de vírus e bactérias ⁽³⁾.

Esta geração propiciou o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de diagnóstico e investigação biomédica como imunofenotipagem, imunohistoquímica, imunofluorescência, Enzyme-linked Immunosorbent Assay – ELISA e imuno-eletrtransferência, consagrada como *western blotting*, iniciando o interesse na utilização em imunomodulação, especialmente pós-transplante ^(4,5).

Devido à sua origem, *mAbs* murinos apresentam imunogenicidade típica e pouca habilidade em ativar a resposta imune efetora limitando assim sua aplicação clínica ⁽⁶⁾.

Como alternativas para os problemas encontrados na imunoterapia baseada em anticorpos monoclonais murinos, foram descritos em 1984 ⁽⁷⁾ e 1986 ⁽⁸⁾, respectivamente, anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados.

Os *mAbs* quiméricos são formados pela fusão da região variável – Fv, da imunoglobulina murina com a região constante – Fc, da imunoglobulina humana. Na produção de *mAbs* humanizados, as regiões hipervariáveis determinantes de complementariedade – CDRs, da imunoglobulina murina são inseridas na imunoglobulina humana ^(3,9,10). A figura 1 apresenta as principais gerações de *mAbs*.

Nos últimos 30 anos, a tecnologia de anticorpos monoclonais passou por grande desenvolvimento. Apesar dos métodos alternativos de produção de *mAbs* como as tecnologias de DNA-recombinante ⁽¹¹⁾, *Phage Display* ⁽¹²⁾, quimerização e humanização utilizando camundongos transgênicos ⁽¹³⁾, a demanda pela descoberta e produção em larga-escala de *mAbs* murinos vêm aumentando significativamente ⁽¹⁴⁾.

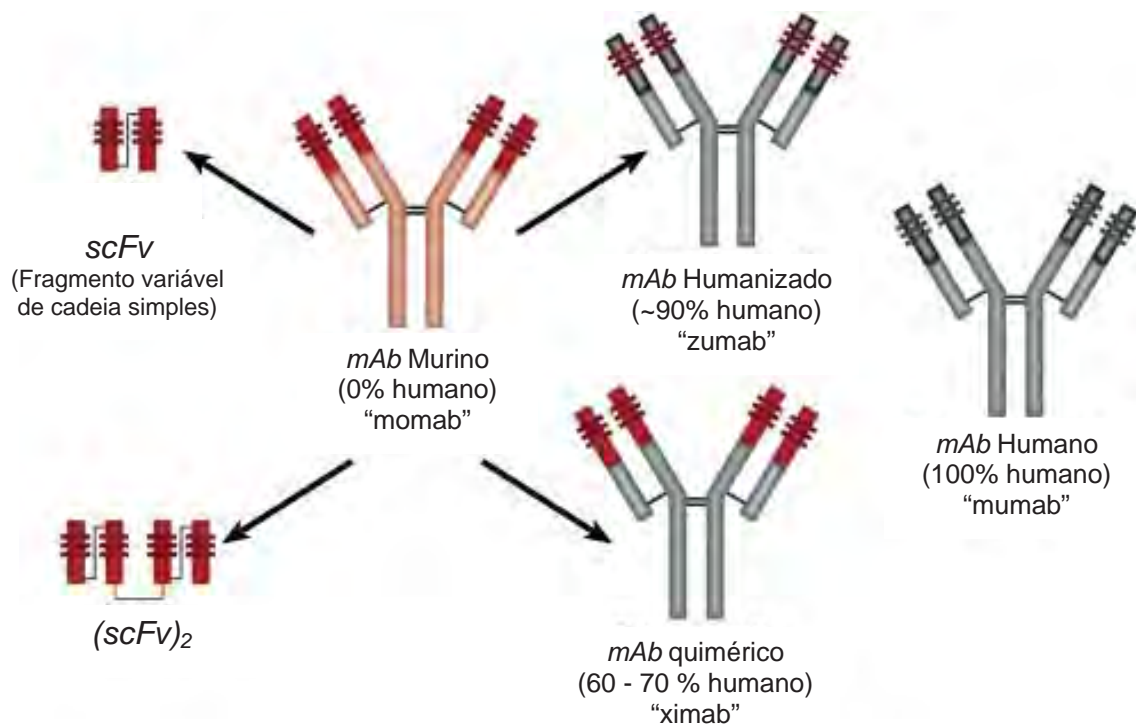


Figura 1 – Gerações de anticorpos terapêuticos, suas denominações e especificações (Adaptado de Ben-Kasus *et al.* ⁽¹⁵⁾).

Entre 2001 e 2002, o mercado mundial de anticorpos terapêuticos cresceu 37,5%, movimentando US\$ 5,4 bilhões, dos quais 70% foram gerados por *mAbs* quiméricos ⁽³⁾. Somente a área de Oncologia, que responde por 44% dos investimentos em pesquisa movimentou, em 2008, um mercado de US\$ 6,82 bi ⁽¹⁶⁾.

Todavia, a produção de *mAbs* requer identificação, isolamento e proliferação de um único hibridoma secretor em meio a um conjunto heterogêneo de células, que podem ser secretoras de anticorpos de diferentes especificidades ou não secretoras ^(17,18).

Dentro deste complexo procedimento, a etapa de clonagem celular é talvez, a mais crítica, considerando que a especificidade do anticorpo produzido depende diretamente da verdadeira natureza monoclonal do hibridoma secretor ⁽¹⁹⁾.

O termo “clonagem” é utilizado em áreas distintas das ciências biomédicas. Em biologia molecular, o termo “clonagem” é utilizado para designar o procedimento de

obtenção em grande quantidade de uma seqüência específica de um determinado gene (20).

Para a biologia reprodutiva, o termo “clonagem” determina a produção de um novo ser vivo utilizando células reprodutivas de um organismo e células somáticas de outro, na técnica denominada de transferência nuclear de célula somática (21).

Para a biotecnologia, em especial na produção de anticorpos e outras proteínas, o termo “clonagem” determina o procedimento de isolamento de uma única célula dentre uma população heterogênea de células sendo denominado de clonagem celular (22,23).

Os métodos clássicos de clonagem celular incluem a Diluição Limitante - DL, Cilindros de Clonagem, Clonagem em suspensão semi-sólida de Ágar e, mais recentemente, a separação celular ativada por imunofluorescência - FACS. Entretanto, nenhum destes métodos pode garantir que os clones resultantes sejam derivados de uma única célula (18, 22, 24, 25).

Na figura 2 podemos acompanhar a evolução das metodologias de clonagem celular utilizadas na produção de *mAbs*.

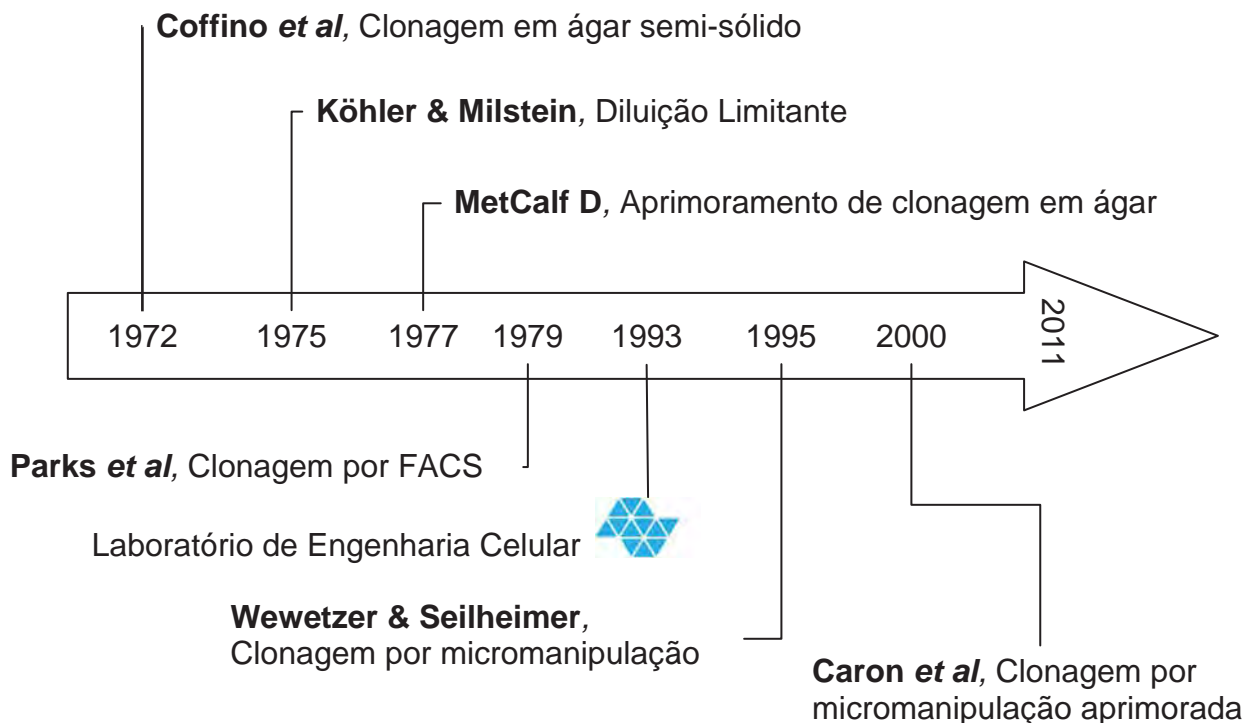


Figura 2 – Linha do tempo dos procedimentos de clonagem celular na produção de *mAbs*.

O método de DL, simples e amplamente utilizado, consiste na realização de diluições seriadas em meio de cultura até uma determinada concentração ou densidade celular em volume suficiente para distribuição em placas de cultura de 96 poços. Esta concentração pode ser ajustada para distribuir 1 célula / poço, 1 célula / 2 poços ou 1 célula / 3 poços ^(24,25,26). A figura 3 ilustra os principais procedimentos da técnica de DL.

O intenso trabalho laboratorial, as observações rigorosas e minuciosas da cultura, assim como a necessidade de sucessivas subclonagens, aumentam significativamente o tempo de estabelecimento de linhagens monoclonais e reduzem drasticamente a simplicidade inicial do processo ⁽¹⁹⁾.

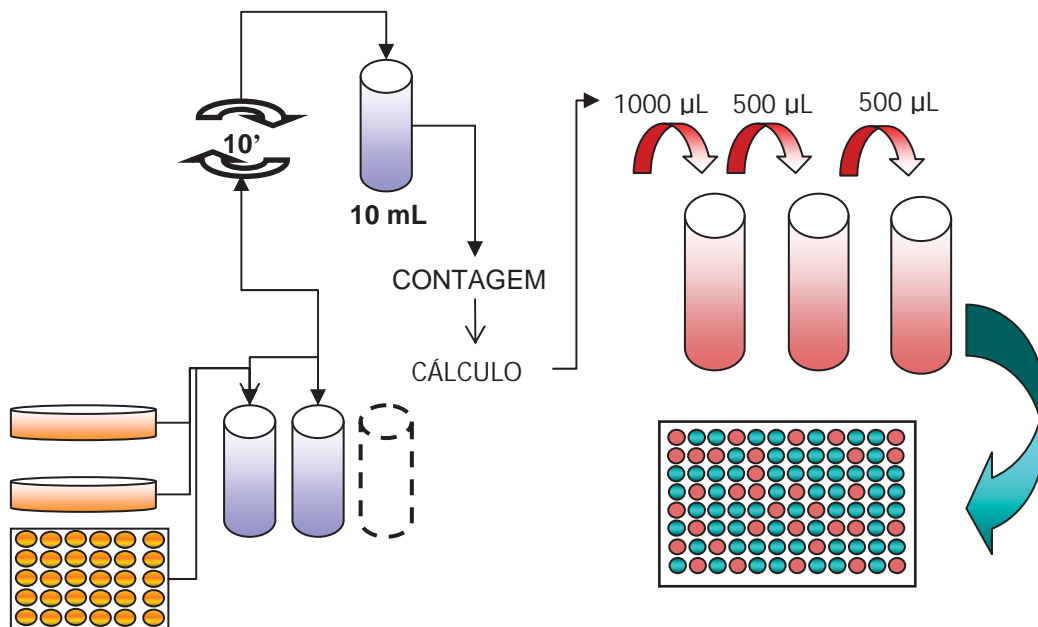


Figura 3 – Etapas da técnica de diluição limitante.

É importante ressaltar que a DL não é um processo de seleção controlado, o que não permite a seleção das células com base em suas características específicas como viabilidade, secreção de anticorpos ou características morfológicas, selecionando as células ao acaso ⁽¹⁸⁾.

A ausência de controle sobre etapa tão relevante da produção gerou, no início dos anos 80, uma busca por novas tecnologias e processos visando otimizar, automatizar

e aprimorar a clonagem celular para garantir a monoclonalidade e recuperar híbridos secretores raros ou de baixa frequência.

A eficiência de clonagem - EC, definida como a porcentagem do número de células que formam colônias após o procedimento de clonagem, é o principal indicador utilizado para a comparação entre as diversas metodologias descritas ⁽¹⁹⁾.

Alterações no padrão de crescimento celular em células isoladas e colônias de baixa densidade, como perda das interações célula-célula e diluição dos fatores de crescimento autócrinos, são uma das principais causas de queda na EC. Nestas situações, mesmo sob condições ideais, poucas células sobrevivem até que as condições sejam restabelecidas ⁽²⁵⁾.

Recentemente, as metodologias de separação celular por FACS têm sido utilizadas concomitantemente às tecnologias de DNA-recombinante, permitindo a separação de células altamente secretoras, especialmente as linhagens de células ovarianas de Hamster chinês (CHO), que expressam marcadores específicos ^(27, 28).

Sleiman *et al*, ⁽²⁹⁾ descrevem eficiência de clonagem de aproximadamente 58% utilizando FACS, enquanto que o método de DL apresentou eficiência de 22,5%.

Não se pode dizer que exista correlação direta e garantida entre as células que marcam positivamente e as que realmente secretam. A própria marcação das células pode tornar-se um inconveniente dependendo da linhagem utilizada ^(18, 29).

A captura celular sob observação direta ao microscópio pode ser considerada a única metodologia de clonagem de hibridomas que garante 100% de crescimento monoclonal. Tal captura, pode ser possível utilizando-se equipamentos de micromanipulação ⁽¹⁹⁾.

Os micromanipuladores tiveram maior divulgação no meio científico em função das técnicas de reprodução assistida como a fertilização *in vitro*, injeção espermática intracitoplasmática – ICSI, e, mais recentemente, a clonagem reprodutiva por transferência nuclear – TN ^(30, 31, 32). A figura 4 destaca as principais utilizações da micromanipulação.

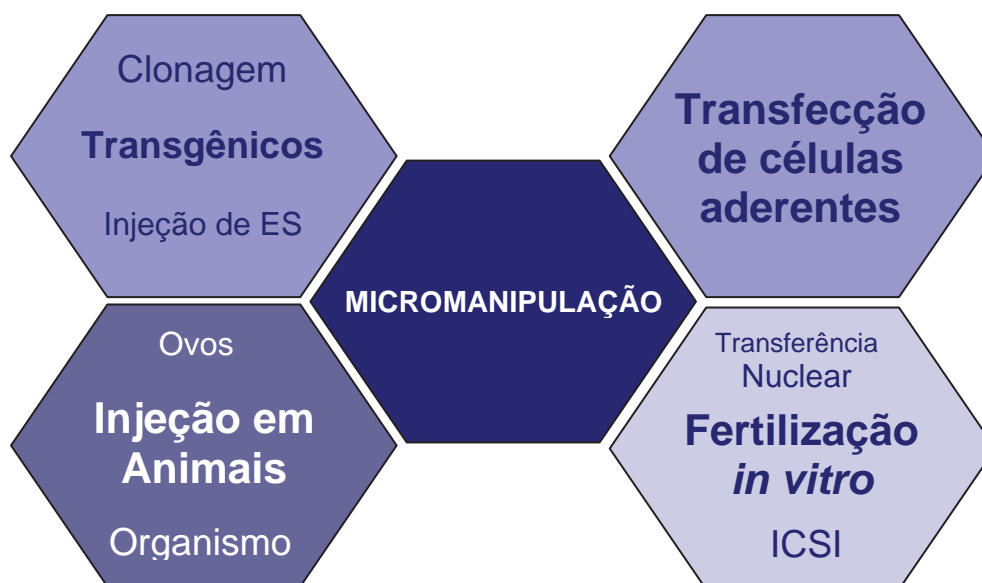


Figura 4 – Principais aplicações da micromanipulação.

Nas metodologias de ICSI e TN, as mais comumente utilizadas, são colocadas gotas de meio de cultura, em uma placa de Petri correspondentes ao número de embriões que se pretende construir. As gotas variam entre 4 e 20 μ L e, logo após serem dispostas na placa, são rápida e cuidadosamente cobertas por óleo mineral à 37°C. O óleo mineral impede o ressecamento das gotas durante a micromanipulação e auxilia na manutenção da assepsia ⁽³⁰⁻³²⁾.

Estas condições de manipulação exigem infra-estrutura laboratorial e condições ambientais assépticas. Manter a assepsia ainda é o maior desafio em cultura de tecidos, especialmente para o manipulador inexperiente. Entretanto, em certas situações, até mesmo os manipuladores mais experientes irão sofrer com contaminações. Se as condições ambientais deterioram, como consequência de trocas de equipamentos ou alterações sazonais de temperatura e umidade, a probabilidade de contaminação aumenta ⁽²⁵⁾.

Wewetzer *et al* ⁽¹⁹⁾ e Caron *et al* ⁽¹⁷⁾ descrevem uma metodologia de seleção individual de células utilizando um aparelho de micromanipulação com controle

monoaxial. No primeiro estudo, o autor não encontrou diferenças significativas entre o método de DL e o método proposto obtendo eficiência de clonagem de 45% em ambos.

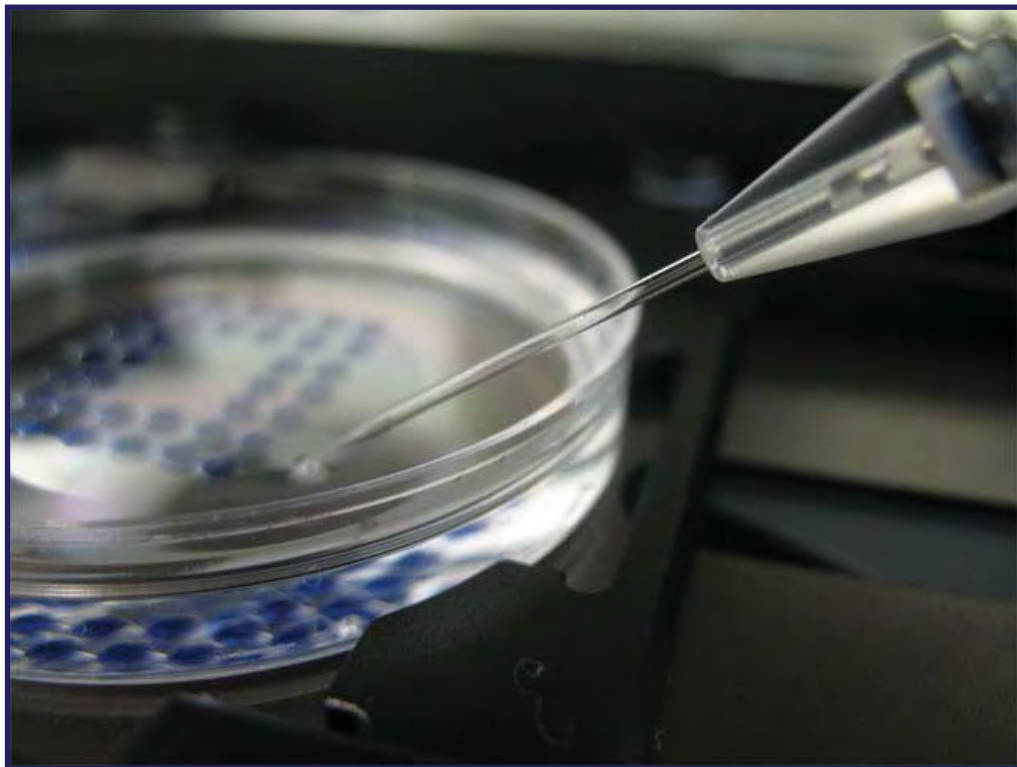
Já Caron *et al* ⁽¹⁷⁾ utilizaram o mesmo equipamento e a mesma metodologia para o isolamento de linhagens não aderentes e aderentes, obtendo uma média na eficiência de clonagem de 40%, sem utilizar hibridomas.

Em ambos os estudos, os autores relatam dificuldades na adaptação do equipamento de micromanipulação ao microscópio invertido e também, no extenso tempo de exposição da cultura à atmosfera e temperatura ambientes, o que limitou a transferência a 50% da placa de cultura.

Outras metodologias, envolvendo sistemas automatizados de clonagem em meio semi-sólido ⁽³³⁾, utilização de técnicas litográficas ⁽¹⁸⁾ e purificação celular mediada por Laser ⁽³⁴⁾, foram descritas com resultados relevantes.

Com a maturidade do desenvolvimento técnico do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, criado em 1993, projetou-se para a primeira década do novo milênio o desafio de se iniciar a produção de *mAbs* com finalidade terapêutica. Tendo em vista a responsabilidade de tal meta, optou-se pela aquisição de micromanipulador que atendesse às necessidades tanto da linha de pesquisa com células-tronco, como da linha de produção de *mAbs*. O desafio desta dissertação foi o de padronizar a utilização de um equipamento para uma área até então não descrita.

Conforme previsto no regulamento do curso de Mestrado Profissionalizante do programa de pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, após esta introdução, o conjunto de dados relativos ao trabalho de Mestrado será apresentado sob a forma de artigo científico.



ARTIGO ORIGINAL

Ampliando a eficiência da clonagem: utilização da micromanipulação na produção de anticorpos monoclonais.

Ampliando a eficiência de clonagem: utilização da micromanipulação na produção de anticorpos monoclonais.

Jesuino DB¹, Deffune E^{1,2}.

¹ Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, *campus* de Botucatu, Divisão de Hemocentro, Laboratório de Engenharia Celular.

² Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP – Univ Estadual Paulista, *campus* de Botucatu, Departamento de Urologia.

Correspondência:

Daniel Bassetto Jesuino
Faculdade de Medicina de Botucatu
Divisão de Hemocentro
Seção de Biotecnologia
Distrito de Rubião Júnior s/n
Botucatu – SP
CEP: 18618-970
55 – 14 – 3811.6041 R.242/229
55 – 14 – 3811.6041 5(Fax)
e-mail: djbassetto@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A produção de anticorpos monoclonais tornou-se, desde sua descrição ^(1,2), importante ferramenta da biotecnologia médica e da produção de biofármacos.

Nos últimos 30 anos, a tecnologia de anticorpos monoclonais passou por grande desenvolvimento. Apesar dos métodos alternativos de produção de *mAbs* como as tecnologias de DNA-recombinante ⁽¹¹⁾, *Phage Display* ⁽¹²⁾, quimerização e humanização utilizando camundongos transgênicos ⁽¹³⁾, a demanda pela descoberta e produção em larga-escala de *mAbs* murinos vêm aumentando significativamente ⁽¹⁴⁾.

Entretanto, produzir um anticorpo monoclonal requer o isolamento de um único hibridoma secretor em meio a um conjunto de células secretoras de anticorpos de diferentes especificidades ou não secretoras ⁽¹⁸⁾.

Dentro deste complexo procedimento, a etapa de clonagem celular é a mais crítica visto que a especificidade do anticorpo produzido depende diretamente da verdadeira natureza monoclonal do hibridoma secretor ⁽¹⁹⁾.

Esta importância desencadeou, no início da década de 80, uma busca por meios de automatizar, otimizar e aprimorar o procedimento de clonagem celular para garantir a monoclonalidade e reduzir o tempo de produção dos anticorpos ^(18,19,27).

Os métodos clássicos de clonagem celular incluem a diluição limitante - DL, clonagem em suspensão semi-sólida de ágar e, mais recentemente, a separação celular ativada por imunofluorescência - FACS. Todavia, nenhum destes métodos pode garantir que os clones resultantes sejam derivados de uma única célula ^(18, 22, 24, 25).

A captura celular sob observação direta ao microscópio pode ser considerada a única metodologia de clonagem de hibridomas que garante 100% de crescimento monoclonal. Tal captura, pode ser realizada utilizando-se equipamentos de micromanipulação ⁽¹⁹⁾.

Os micromanipuladores tiveram maior divulgação no meio científico em função das técnicas de reprodução assistida como a fertilização *in vitro*, injeção espermática intracitoplasmática – ICSI, e, mais recentemente, a clonagem reprodutiva por transferência nuclear – TN ⁽³⁰⁻³²⁾.

No final da década de 90 e início dos anos 2000 foram descritos procedimentos de clonagem celular por micromanipulação, porém os autores relataram dificuldades na adaptação dos equipamentos ao microscópio, longo tempo de exposição da cultura à atmosfera e variações na temperatura e umidade, obtendo eficiências de clonagem de 40 a 45%^(17,19).

Neste trabalho descrevemos uma nova metodologia de clonagem celular por micromanipulação e avaliamos indicadores de eficiência de clonagem, tempo de execução e custos em comparação com a metodologia padrão-ouro de diluição limitante, visando otimizar a produção de *mAbs*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos hibridomas murinos

Os hibridomas utilizados neste trabalho foram oriundos de protocolos de produção de anticorpos monoclonais murinos já desenvolvidos ou em desenvolvimento no Laboratório de Engenharia Celular da Divisão de Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

A obtenção destes hibridomas seguiu a metodologia descrita por Köhler e Milstein⁽¹⁾, modificada por Deffune⁽²⁶⁾ e padronizada nos Procedimentos Operacionais Padrão, do Laboratório de Engenharia Celular⁽³⁵⁾.

Determinação dos critérios pré-clonagem celular

Para que o procedimento de clonagem celular possa ser realizado, os hibridomas devem apresentar morfologia celular esférica, superfície celular homogênea, citoplasma não-vacuolizado e viabilidade celular superior a 70%.

A determinação da viabilidade celular e contagem foram realizadas por técnica de exclusão por coloração de Azul de Trípano a 0,4% (GIBCO[®]) e contagem de alíquota em Câmara de Neubauer⁽³⁶⁾.

Preparo de *feeder cells*

Foram utilizados como *feeder cells*, timócitos murinos preparados 24 horas antes do procedimento de clonagem, na concentração de 2×10^5 células por poço, cultivados em

meio de cultura completo – MC20, contendo meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO[®]), suplementos e 20% de Soro Fetal Bovino - SFB (GIBCO[®] - USA). As placas foram cultivadas em incubadora úmida à temperatura de 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ (25).

Clonagem celular por Diluição Limitante

Imediatamente antes do procedimento, os hibridomas foram observados ao microscópio para a determinação dos critérios pré-clonagens.

Alíquotas das culturas foram retiradas para a determinação da densidade celular inicial e viabilidade. Os hibridomas selecionados para o procedimento foram clonados utilizando a técnica de Diluição Limitante segundo Deffune (26, 35), e cultivados paralelamente aos clones submetidos à técnica de micromanipulação.

Como testemunho da técnica de DL, uma alíquota de 5 mL do meio de cultura do último tubo de diluição foi mantida em placa de Petri, sob as mesmas condições da cultura, por 15 dias.

Clonagem celular por Micromanipulação

A técnica de micromanipulação - μ Man, foi realizada em aparelho com controles triaxiais semi-automáticos *Transferman NK2*[®] e sistema de injeção misto ar-óleo e *CellTram Vario*[®] (Eppendorf[®]), acoplado a um microscópio óptico invertido Axiovert 200 (Zeiss[®]). Foram utilizados microcapilares de vidro, estéreis, de 15 μ m de diâmetro interno, com ponta angulada e termomodelada, especiais para biópsia embrionária.

A técnica é constituída de três etapas: 1) Montagem da placa de Petri para isolamento dos hibridomas; 2) Isolamento dos hibridomas por micromanipulação e 3) Plaqueamento dos clones.

Na etapa 1, uma placa de Petri de cultura celular foi colocada sobre uma termoplaca de adaptação ao *charriot* do microscópio e levada ao fluxo laminar.

Com auxílio de uma micropipeta, gotejou-se MC20, na placa de Petri, de forma simétrica, adicionando uma gota contendo os hibridomas a serem clonados, retirada do mesmo poço de cultura utilizado para a DL. As gotas foram cobertas com óleo mineral estéril para a manutenção da assepsia, temperatura e umidade.

Na etapa 2, utilizou-se o micromanipulador para aspirar e transferir os hibridomas para as gotas de MC20, selecionados segundo critérios morfológicos de viabilidade como alta refringência, membrana íntegra, citoplasma uniforme e alto grau de turgidez.

Os clones foram plaqueados aspirando-se cuidadosamente as gotas de MC e dispensando-as cada qual a um poço na placa de cultura de 96 poços, previamente incubada com *feeder cells*.

As três etapas foram repetidas até que o plaqueamento complete os 96 poços de uma placa de cultura. A placa de cultura foi cultivada em incubadora úmida à 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Entre as etapas, o microcapilar foi imerso em placa de Petri contendo 150 µL de MC20 e coberta com óleo mineral estéril. Esta placa é utilizada para a limpeza e manutenção da assepsia do microcapilar em repouso.

Após o término do procedimento, a placa de Petri usada como repouso foi incubada por 15 dias como testemunho da técnica, sendo verificada para a presença de contaminação a cada 24h.

Determinação do tempo de execução dos procedimentos

Os procedimentos de clonagem celular e observação microscópica dos clones foram cronometrados para a composição do tempo de execução. Foram observados separadamente os tempos de manipulação dos híbridos e observação dos clones. O tempo de manipulação foi cronometrado somente para as atividades particulares de cada técnica, não incluindo obtenção de *feeder cells*, viabilidade celular e manutenção dos híbridos.

Observação microscópica e classificação dos clones

As placas de cultura foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase 1 (Ph1) Axiovert 100[®] (Zeiss[®]), 48h, 96h e 10 dias após o procedimento de clonagem.

As observações foram padronizadas quanto à área de observação do poço de cultura e sentido de leitura da placa e foram realizadas pelo mesmo manipulador, para ambas as técnicas em cada um dos intervalos.

A classificação dos clones foi executada durante a primeira observação das clonagens de DL seguindo os seguintes critérios:

- Clones únicos:

- Grupo de células coeso ou muito próximo;
- Crescimento concêntrico;
- Ausência de outros agrupamentos celulares.

- Clones múltiplos:

- Grupo de células disperso;
- Crescimento aleatório;
- Mais de um agrupamento celular no mesmo poço.

Na terceira observação os clones foram numerados sequencialmente, iniciando na placa referente à DL e concluindo no último poço da placa referente à μ Man.

Nova proposta para as observações da técnica de micromanipulação

Foi realizada uma modificação no protocolo de observação dos clones para a técnica de micromanipulação, devido ao fato de não serem necessárias a realização das duas primeiras observações. Na nova proposta, somente o tempo da observação realizada 10 dias após o procedimento de clonagem foi utilizado para o cálculo do tempo de observação total e do tempo de execução total da técnica de micromanipulação.

Registro fotográfico das observações

A documentação da evolução do crescimento dos clones bem como aspectos morfológicos relevante ao trabalho foram documentados utilizando câmera monocromática de alta definição, especial para microscopia, AxioCam MRm (Zeiss®) e câmera digital adaptada para microscopia Powershot A120 (Canon®), acopladas ao microscópio óptico invertido Axiovert 200 (Zeiss®).

Determinação da eficiência de clonagem e eficiência de clonagem relativa

A eficiência de clonagem - EC, pode ser definida como a porcentagem de poços com crescimento celular após o procedimento de clonagem ^(24 - 26) e foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$EC\% = \frac{NC3}{NP} \times 100, \text{ onde:}$$

NC3 = número de clones obtidos na 3ª observação

NP = número de poços distribuídos

A eficiência de clonagem relativa - ECR_{el}, corresponde à porcentagem de clones únicos observados após o procedimento de clonagem em relação ao total de poços distribuídos em uma placa de cultura de 96 poços.

Índice de Contaminação Celular

O Índice de Contaminação Celular – ICC, foi determinado por observação direta de contaminantes ao microscópio e avaliação macroscópica de turvação e/ou alteração brusca de coloração do meio de cultura, segundo parâmetros definidos por Freshney ⁽²⁵⁾, iniciando-se 24h após o procedimento e estendendo-se durante todo o cultivo.

Os casos confirmados de contaminação foram quantificados para o cálculo do ICC segundo a fórmula:

$$\text{ICC\%} = \frac{\text{NCont3}}{\text{NP}} \times 100, \text{ onde:}$$

NCont3 = número de contaminações encontradas até a 3ª observação;

NP = número de poços distribuídos.

Os poços contaminados foram aspirados e sanitizados com solução de hipoclorito de sódio a 2% seguido de lavagem com água para injeção e aspiração.

Determinação da vulnerabilidade mecânica da técnica de diluição limitante.

Foram avaliados quatro momentos de vulnerabilidade mecânica identificados na técnica de DL, avaliados pela variação na viabilidade celular em cada um dos pontos críticos conforme descrito abaixo:

- Pré-clonagem (controle);
- Pós-centrifugação (P1);
- 1º tubo de diluição (P2);
- 2º tubo de diluição (P3);
- 3º tubo de diluição (P4);
- Pré-plaqueamento (P5).

A avaliação foi realizada utilizando-se cinco hibridomas em cultivo e simulando a técnica de DL. Uma alíquota de 100 μ L foi retirada para cada determinação de viabilidade. Para reduzir o consumo de MC20, as diluições seriadas foram realizadas em solução fisiológica aquecida à 37°C.

Análise de custos

Foi realizado levantamento dos custos unitários de insumos descartáveis, reagentes e material permanente utilizados exclusivamente para a execução dos procedimentos de clonagem celular. Também foi incluso nos custos o valor de hora-trabalho para o cargo de Biólogo com base nos valores utilizados pela Seção de Recursos Humanos da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. Estes valores serviram de base para análise dos custos de implantação e execução das técnicas.

RESULTADOS

Foram realizados 20 procedimentos de clonagem celular pelos métodos de DL e μ Man. Estas clonagens envolveram seis diferentes protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais. O tempo médio de manipulação para a técnica de DL foi de $30 \pm 6,6$ min, enquanto que para a μ Man foi de $199 \pm 40,2$. Após a distribuição dos clones no ambiente das microplacas, três observações por microscopia invertida foram realizadas sendo duas com intervalo de tempo de 48 horas e uma após 10 dias. Para ambos os protocolos à medida que a cultura evoluía, houve progressivamente a diminuição no tempo de observação (Figura 5).

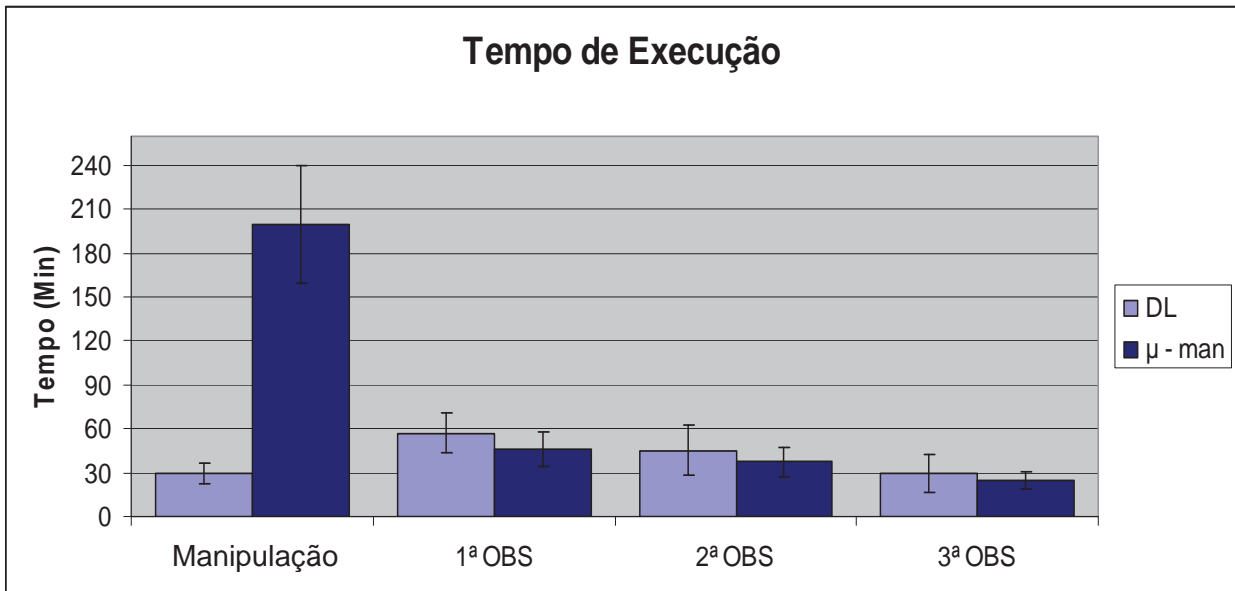


Figura 5 – Tempo de execução das técnicas de clonagem celular.

Avaliando-se o tempo de execução relativo da técnica de μ Man, observa-se que a montagem da placa de isolamento é responsável por 5,05% do tempo, sendo que o procedimento de micromanipulação por si envolveu 15,36% do tempo, e o plaqueamento 10,63% do tempo. Outras etapas como a transferência de placas da estufa de CO₂ para o microscópio, do microscópio para ambiente de fluxo laminar e a higienização e anti-sepsia necessárias para procedimento estéril foram responsáveis por 62,52% do tempo (Figura 6).

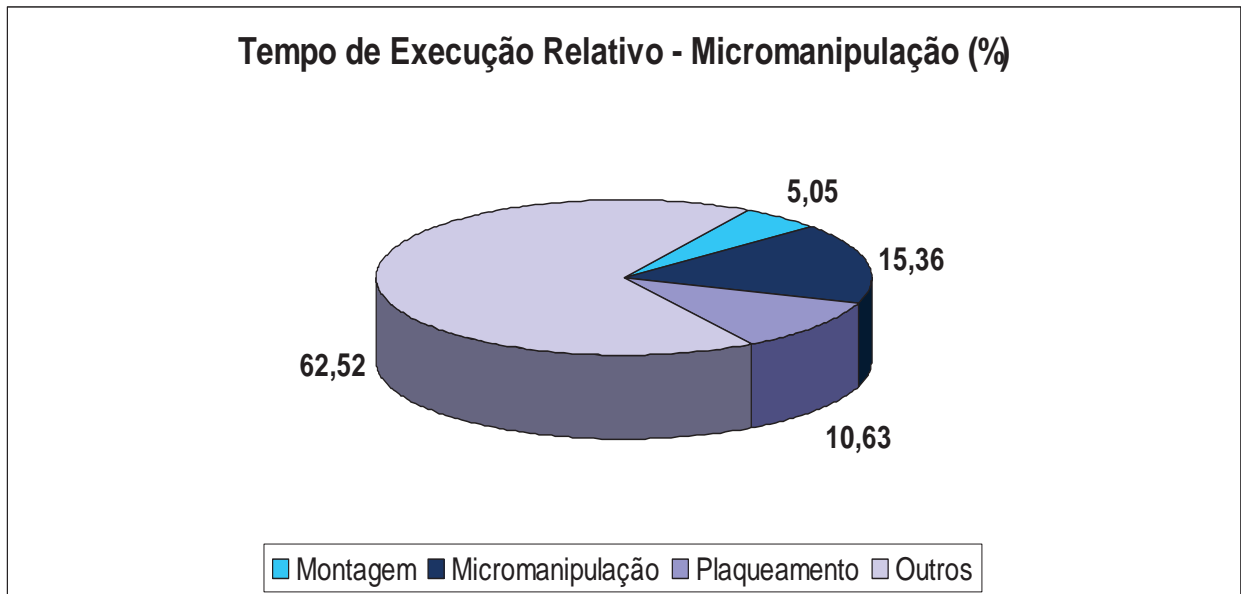


Figura 6 – Tempo de execução relativo a cada procedimento da técnica de clonagem celular por micromanipulação.

Comparando o tempo de execução de observação e o total, para cada um dos diferentes protocolos, identifica-se que nos 11 primeiros protocolos, o tempo médio total de execução para a técnica de diluição limitante foi de 169 min. e nas últimas nove clonagens de 151,5 min., enquanto que para o mesmo grupo de clonagens, na técnica de μ Man inicial o tempo foi de 316 min. para os 11 primeiros protocolos e de 298 min. para os últimos nove. Já na técnica de μ Man proposta, sem as duas primeiras observações microscópicas, o tempo foi de 233 min. nos 11 primeiros protocolos e 214 min. nos últimos nove. Quando se considera a redução percentual no tempo, a maior redução foi de 37,17% e a menor de 14,42% correspondendo este, ao primeiro protocolo de clonagem realizado por μ Man, em destaque na Tabela 1.

A comparação entre os tempos de observação e execução das técnicas de DL, μ Man e a nova proposta para observação da μ Man são demonstradas nas figuras 7 e 8.

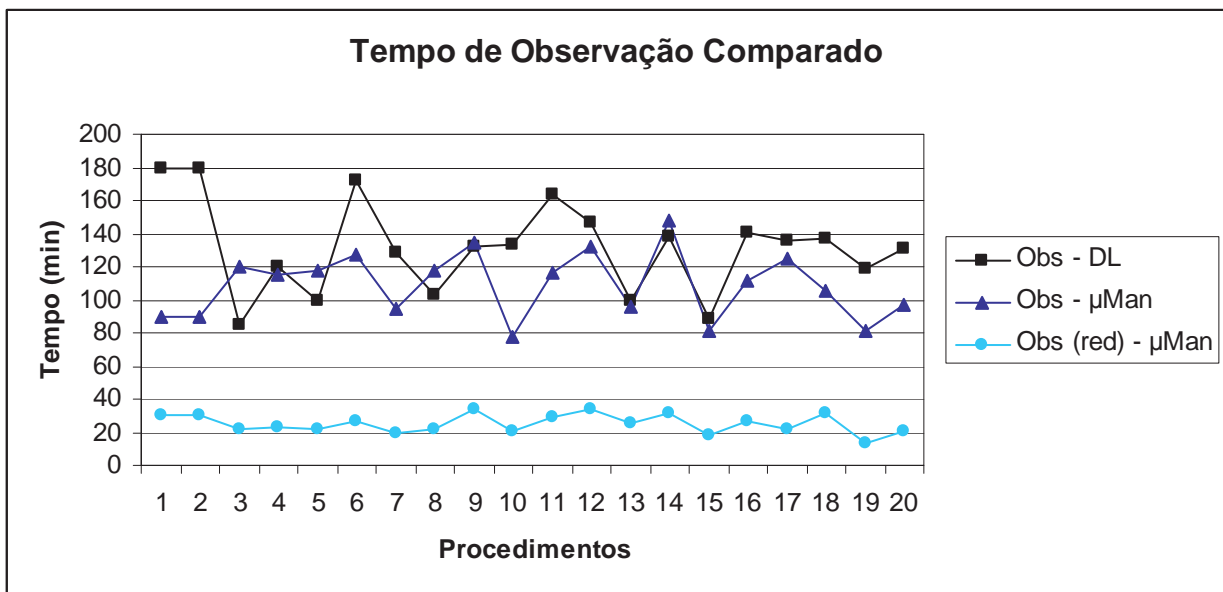


Figura 7 – Tempo de observação comparado entre as técnicas de DL, μ Man e nova proposta para μ Man. *Obs - μ Man (red)* – Tempo de observação da nova proposta para μ Man.

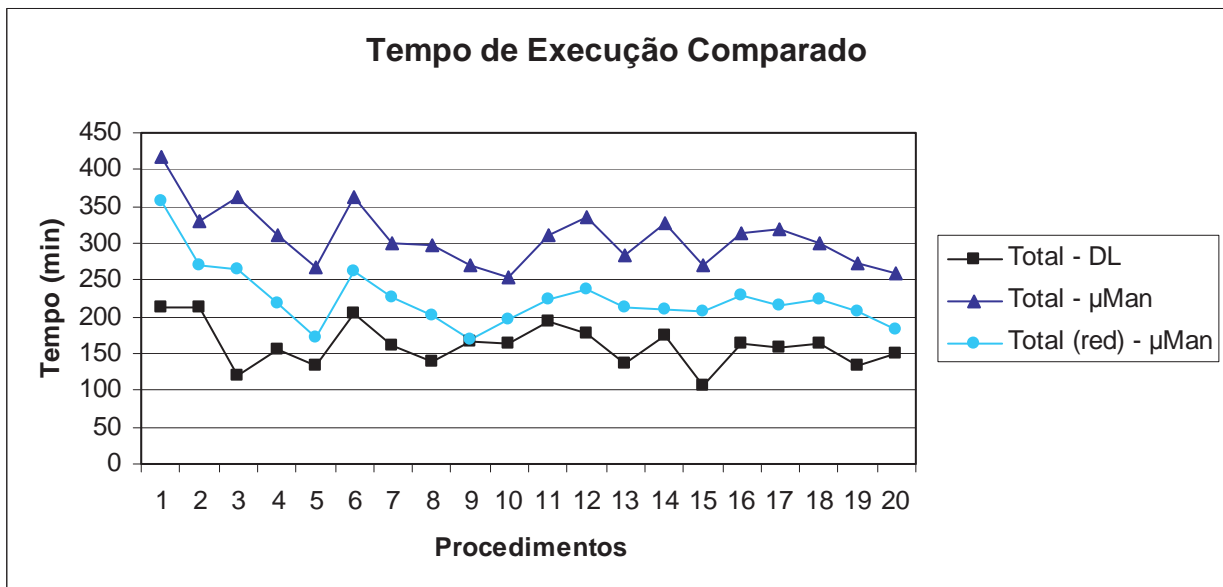


Figura 8 – Tempo de execução comparado entre as técnicas de DL, μ Man e nova proposta para μ Man. *Total - μ Man (red)* – Tempo de observação da nova proposta para μ Man.

Tabela 1 – Comparação entre o tempo de execução total e o de observação segundo o protocolo desenvolvido.

Clone	Tempo de Execução Comparado (min)		3ª Observação	TOTAL (red.)	Redução (%)	Razão a/b
	Diluição Limitante Observação (a)	Micromanipulação Observação (b)				
DIVS 2-12	180	212	90	416	356	14,42
DIVS2-65	180	212	90	329	269	18,24
MSC 1-160	85	120	120	362	264	27,07
DIVSP 3-65	120	155	115	311	219	29,58
DIVSP 1-321	100	135	117	266	171	35,71
LEU 10-49	172	204	127	363	263	27,55
LEU 2-34	128	160	95	301	226	24,92
TAEB 1- 40	103	138	117	297	202	31,99
ED 1-134	132	167	134	269	169	37,17
CTMh 3-98	133	163	78	254	197	22,44
CTMh 3-172	164	194	116	312	225	27,88
CTMh 4-304	147	177	132	335	237	29,25
CTMh 3-75	99	136	96	283	212	25,09
CTMh 3-187	138	174	148	327	211	35,47
CTMh 3-100	89	107	81	271	208	23,25
CTMh 3-173	141	163	111	313	229	26,84
CTMh 3-170	136	157	125	319	216	32,29
CTMh 3-98A33	137	165	106	299	224	25,08
CTMh 3-98A63	119	135	81	274	206	24,82
CTMh 3-98A17	131	150	97	258	182	29,46
MÉDIA ± DP	133 ± 28	162 ± 29	113 ± 20	306 ± 41	218 ± 41	28 ± 6
			24 ± 6			5 ± 1

* Tempo de execução + tempo de observação; *TOTAL (red.)* – Tempo de manipulação + Tempo da 3ª observação.

Na figura 9 se identificam os aspectos de observação por microscopia invertida. Em A, a observação realizada com 48 h evidenciando um clone único da técnica de DL. Em B, o mesmo clone após 96 h e em C após 10 dias, com elevada celularidade. Em D, E e F aspectos em maior aumento do clone identificado.

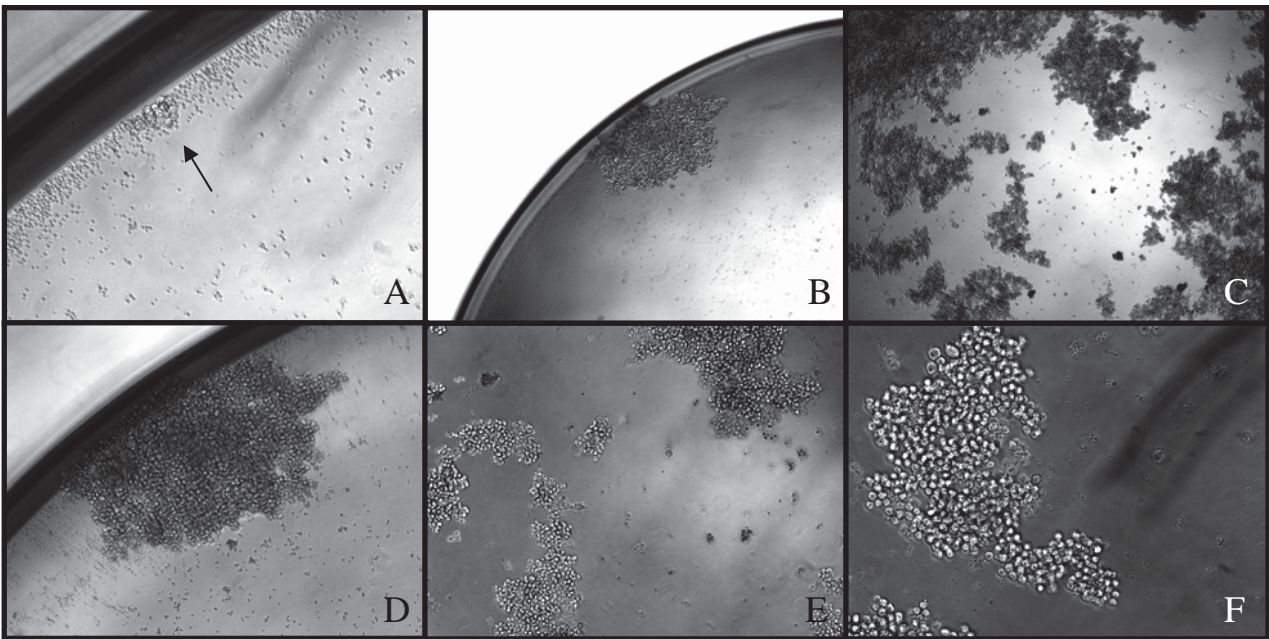


Figura 9 – Fotomicrografia de clone múltiplo em cultura 48h, 96h e 10 dias após DL.

A - C: Evolução do crescimento do clone nas três observações (aumento de 200, 50 e 50X, respectivamente). D – F: Detalhes da morfologia do clone em cultura (aumento de 100, 100 e 200X, respectivamente). Seta: localização do clone na placa de cultura.

A análise por microscopia invertida dos clones múltiplos da técnica de DL é evidente como mostra a figura 10. As setas mostram, com 48 horas, três pequenos agrupamentos celulares em A, sendo que com 96 horas estes agrupamentos se uniram formando uma aparente e única massa celular. Nas observações subseqüentes, registros do crescimento celular em múltiplas camadas.

A relevância das observações microscópicas com intervalos de 48 horas é nítida. Na figura 11, a primeira observação após a DL determinou a marcação do poço da placa de cultura como sendo único enquanto que em B, observa-se que com 96h as formações eram múltiplas.

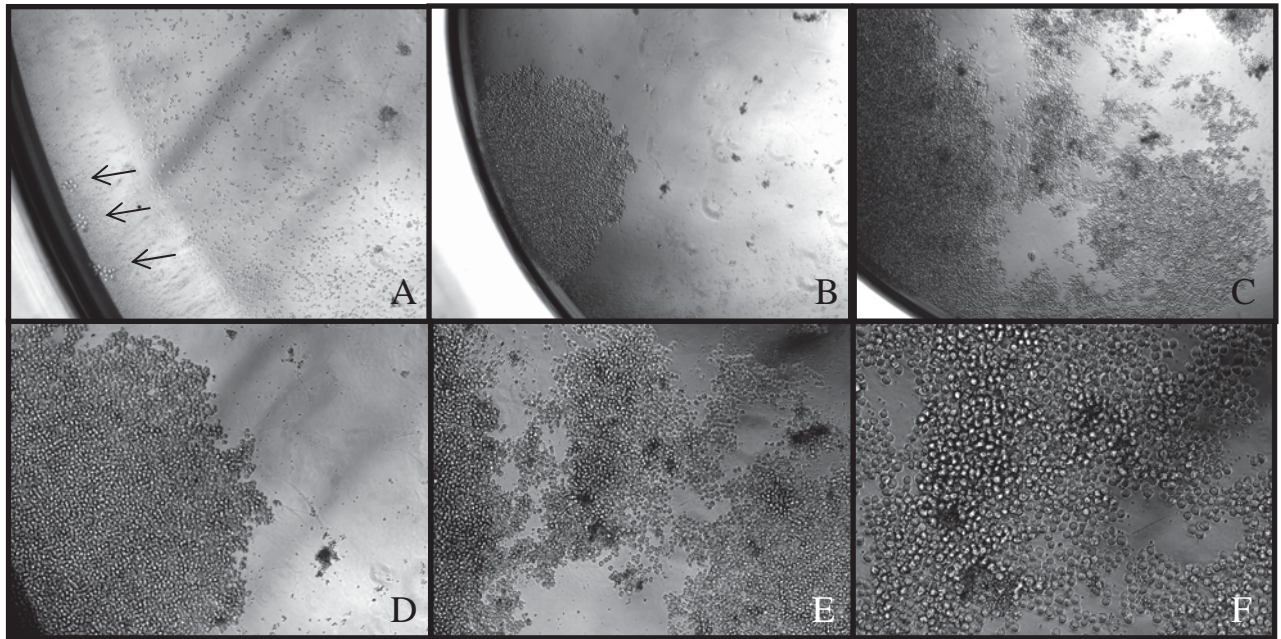


Figura 10 – Fotomicrografia de clone múltiplo em cultura 48h, 96h e 10 dias após DL. A - C: Evolução do crescimento do clone nas três observações (aumento de 200, 50 e 50X, respectivamente). D - F: Detalhes da morfologia do clone em cultura (aumento de 100, 100 e 200X, respectivamente). Seta: localização do clone na placa de cultura.

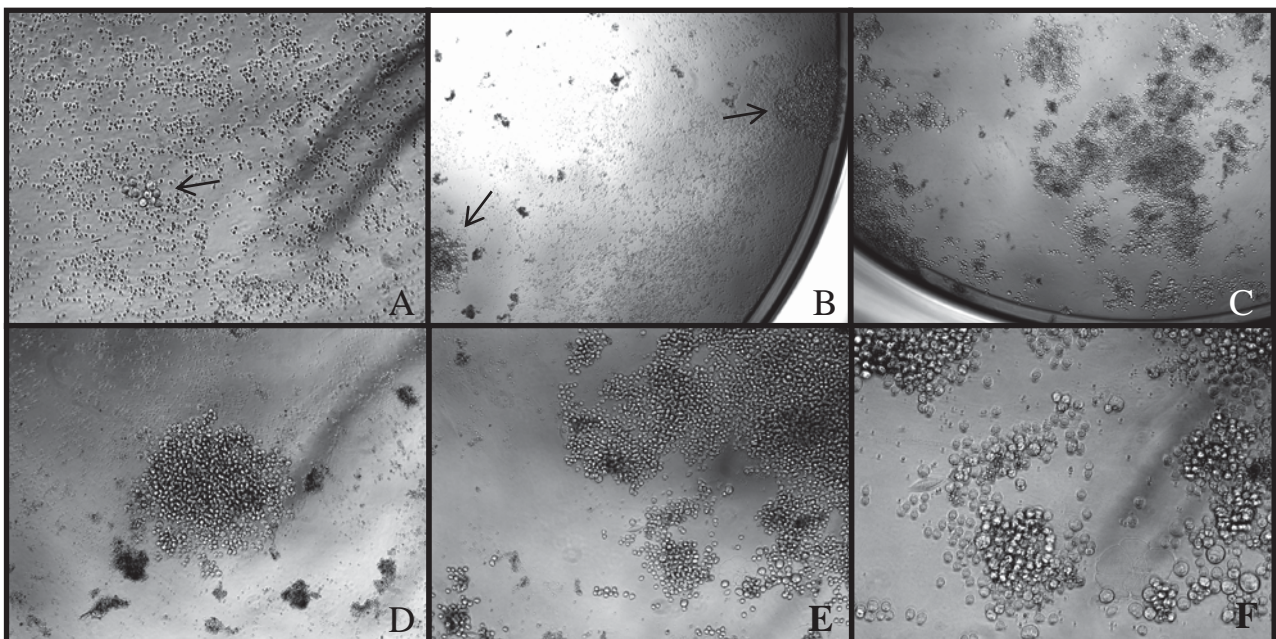


Figura 11 – Fotomicrografia de clone múltiplo identificado como clone único 48h após DL e re-classificado após 96h e 10 dias de cultivo. A - C: Evolução do crescimento do clone nas três observações (aumento de 200, 50 e 50X, respectivamente). D - F: Detalhes da morfologia do clone em cultura (aumento de 100, 100 e 200X, respectivamente). Seta: localização do clone na placa de cultura.

Não foram observadas alterações nos aspectos morfológicos das clonagens realizadas por μ Man, durante as três observações, em nenhum dos 20 procedimentos. A figura 12 apresenta detalhes do clone isolado por μ Man acima da camada de *feeders cells*, observadas ao fundo com tamanho nitidamente diferente do clone.

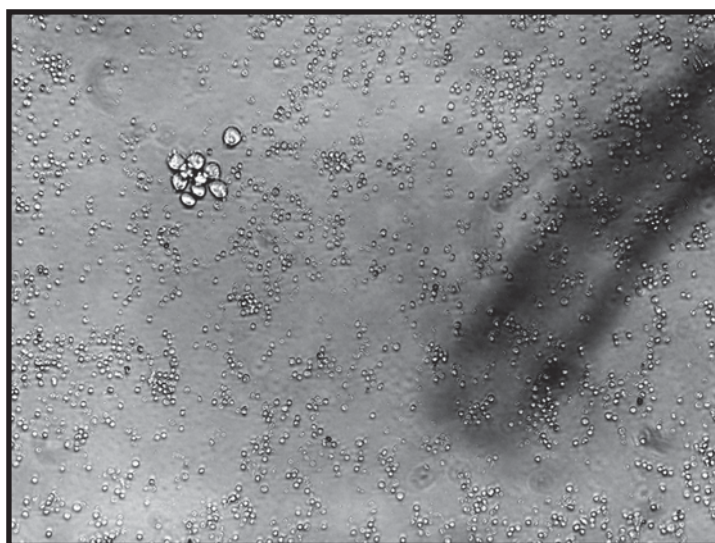


Figura 12 – Fotomicrografia de um clone 48h após a micromanipulação (Aumento de 200X, Ph1).

Após 10 dias de cultura, os clones obtidos por μ Man apresentaram crescimento homogêneo, distribuídos pelo fundo do poço de cultura ou em cachos, como pode ser observado nas figuras 13 e 14.

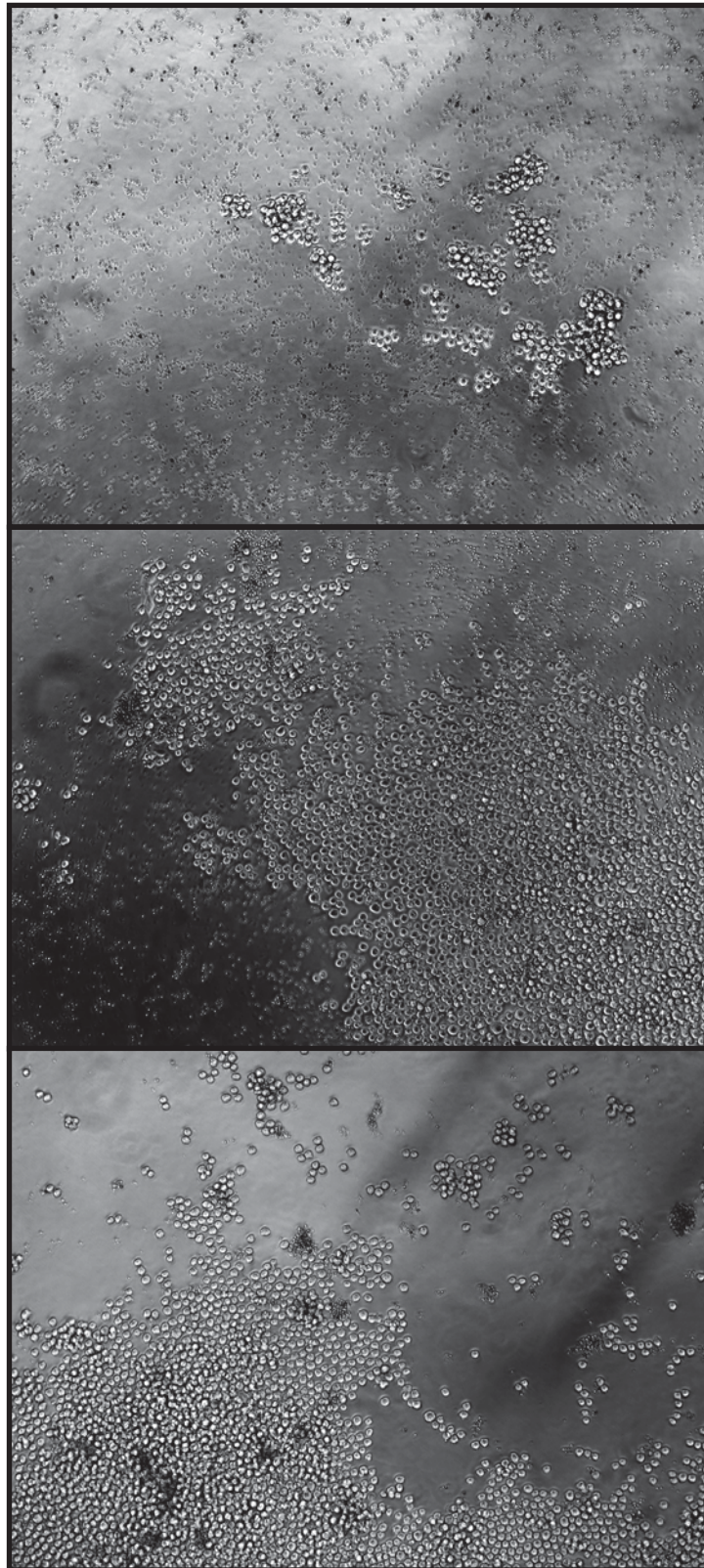


Figura 13 – Fotomicrografias dos clones 10 dias após a micromanipulação (Aumento de 100X, Ph1).

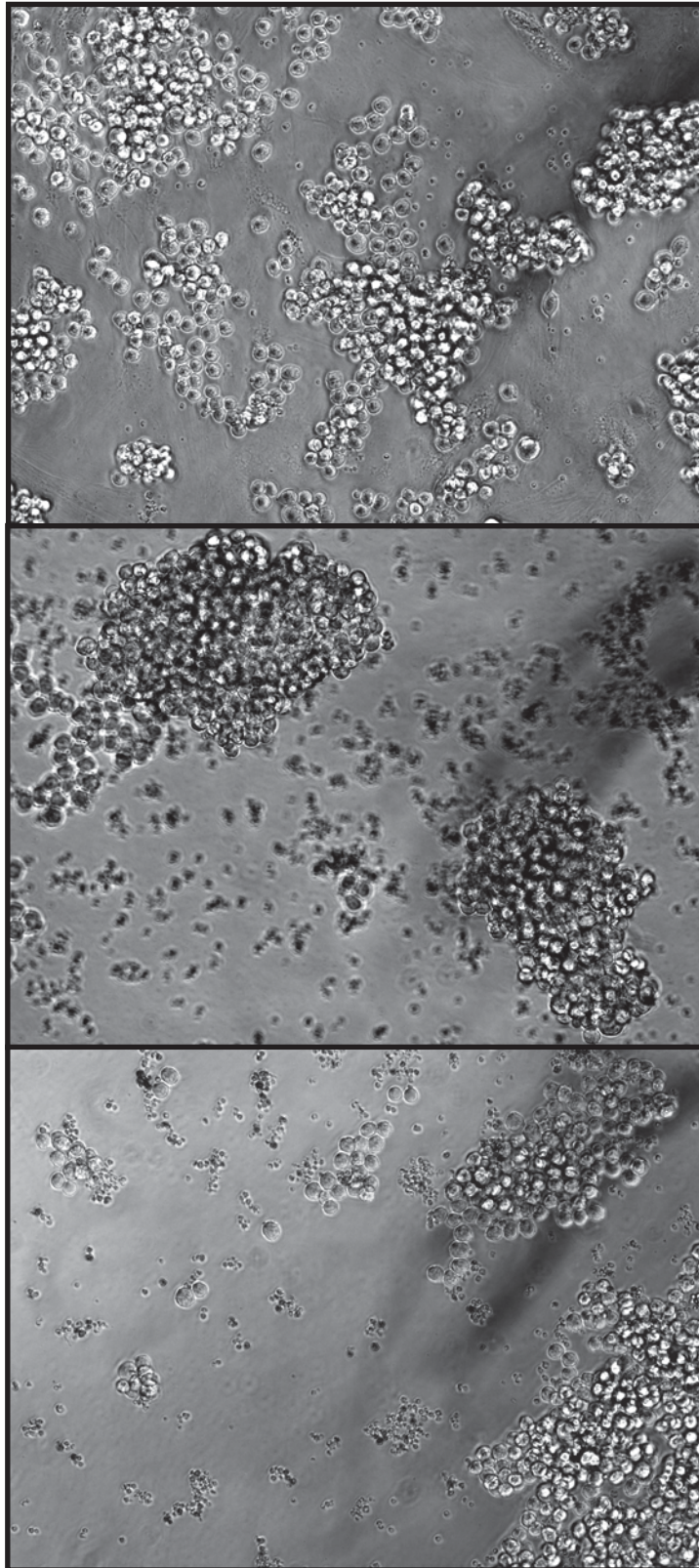


Figura 14 – Fotomicrografias dos clones 10 dias após a micromanipulação (Aumento de 200X, Ph1).

Analisando a eficiência da clonagem nos diferentes protocolos realizados, a média para DL foi de $30,52 \pm 24,22\%$ e para μ Man $33,00 \pm 20,24\%$. A eficiência média relativa foi de $10,99 \pm 8,62\%$ para DL e de $33,00 \pm 20,24\%$ para μ Man (Tabela 2).

Tabela 2 - Eficiências dos protocolos de clonagem realizados

Eficiência de Clonagem					
PROC.	CLONE	<i>Diluição Limitante</i>		<i>Micromanipulação</i>	
		EC (%)	ECRel (%)	EC (%)	ECRel (%)
1	<i>DIVS 2-12</i>	64,58	23,96	53,13	53,13
2	<i>DIVS2-65</i>	13,54	0,00	15,96	15,96
3	<i>MSC 1-160</i>	20,83	8,33	70,83	70,83
4	<i>DIVSP 3-65</i>	3,12	2,08	14,58	14,58
5	<i>DIVSP 1-321</i>	0,00	0,00	35,42	35,42
6	<i>LEU 10-49</i>	15,62	4,17	32,29	32,29
7	<i>LEU 2-34</i>	7,29	5,21	32,29	32,29
8	<i>TAEB 1- 40</i>	40,62	17,71	14,58	14,58
9	<i>ED 1-134</i>	7,29	4,17	9,38	9,38
10	<i>CTMh 3-98</i>	19,79	5,21	53,13	53,13
11	<i>CTMh 3-172</i>	16,66	9,38	16,67	16,67
12	<i>CTMh 4-304</i>	9,37	5,21	7,29	7,29
13	<i>CTMh 3-75</i>	61,45	10,42	34,38	34,38
14	<i>CTMh 3-187</i>	7,29	3,13	7,29	7,29
15	<i>CTMh 3-100</i>	62,50	18,75	56,25	56,25
16	<i>CTMh 3-173</i>	25,00	11,46	21,88	21,88
17	<i>CTMh 3-170</i>	61,45	22,92	53,13	53,13
18	<i>CTMh 3-98A33</i>	57,29	21,88	43,75	43,75
19	<i>CTMh 3-98A63</i>	59,37	20,83	47,92	47,92
20	<i>CTMh 3-98A17</i>	57,29	25,00	38,54	38,54
MÉDIA ± DP		$30,52 \pm 24,22$	$10,99 \pm 8,62^*$	$33,00 \pm 20,24$	$33,00 \pm 20,24^*$

EC – Eficiência de Clonagem; ECRel – Eficiência de Clonagem Relativa

* Médias estatisticamente diferentes segundo Teste t (Student) com $\alpha = 0,05$

A figura 15 abaixo apresenta os dados da viabilidade celular em cada um dos 20 procedimentos realizados além das curvas de eficiência de fusão para ambos os métodos de clonagem celular.

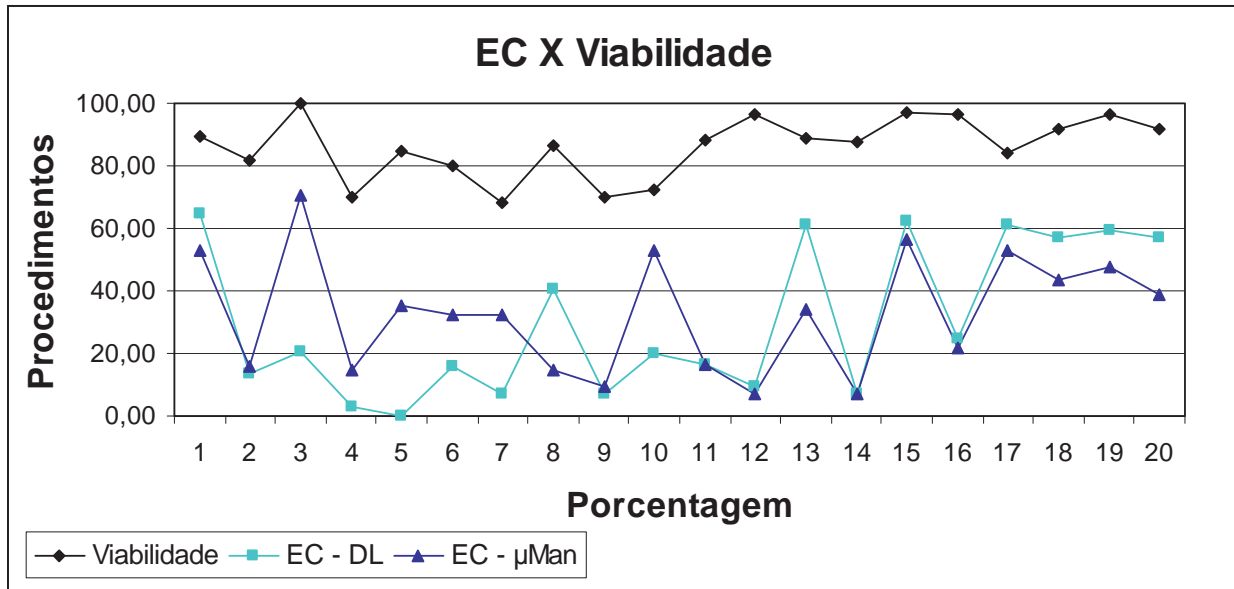


Figura 15 – Gráfico comparativo da viabilidade celular dos híbridos pré-clonagem com a Eficiência de Clonagem (EC) em ambos os procedimentos de clonagem celular.

Projetando-se os valores de tempo em minutos para os procedimentos futuros observa-se a tendência à redução (Figura 16).

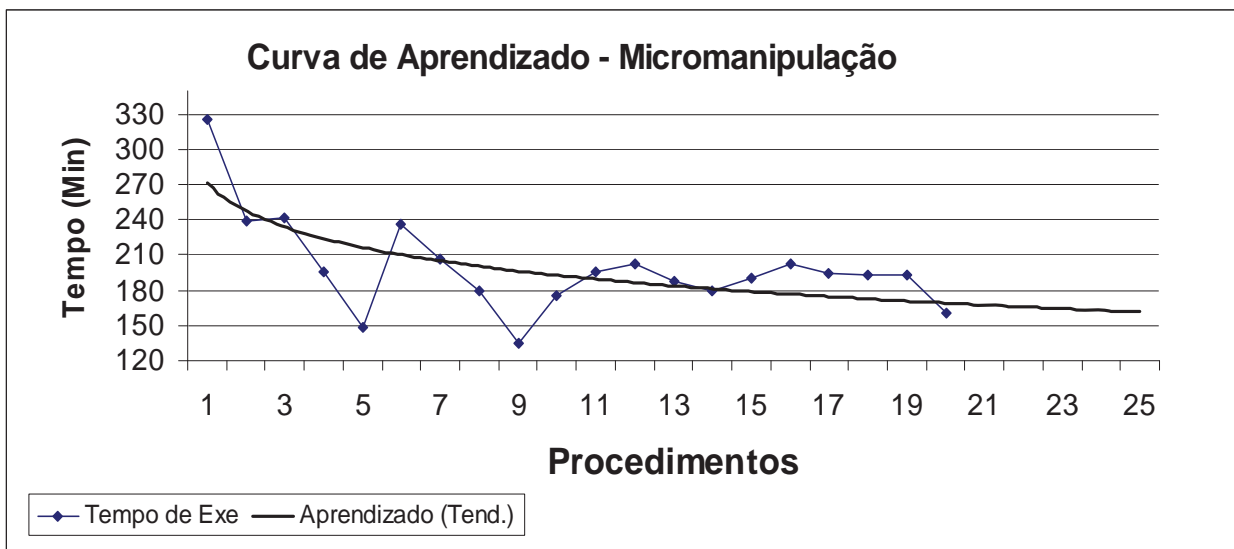


Figura 16 - Curva de aprendizado do procedimento de clonagem celular por micromanipulação (prospectiva para 25 procedimentos)

Na Tabela 3 encontram-se os registros do índice de contaminação celular cuja média para o procedimento de DL foi de $1,39 \pm 0,53$ e para μ Man $2 \pm 1,61$.

Tabela 3 – Índice de Contaminação Celular observado até 10 dias pós-procedimento

Índice de Contaminação Celular - ICC			
<i>MÉTODO</i>	<i>CLONE</i>	<i>CONTAMINAÇÕES</i>	<i>ICC(%)</i>
DL	ED 1-134	1	1,04
	CTMh 3-75	1	1,04
	CTMh 3-187	2	2,08
	CTMh 3-100	2	2,08
	CTMh3-98A33	1	1,04
	CTMh 3-98A17	1	1,04
	MÉDIA \pm DP	1 \pm 0,51	1,39 \pm 0,53
	TOTAL	8	0,42
μ Man	CTMh 3-172	5	5,21
	CTMh 3-75	2	2,08
	CTMh 3-187	1	1,04
	CTMh 3-100	1	1,04
	CTMh 3-98A63	1	1,04
	CTMh 3-98A17	2	2,08
	MÉDIA \pm DP	2 \pm 1,54	2 \pm 1,61
	TOTAL	12	0,63

DL – Diluição Limitante; *μ Man* – Micromanipulação.

A figura 17 apresenta os valores de viabilidade observados na determinação da vulnerabilidade mecânica do procedimento de DL.

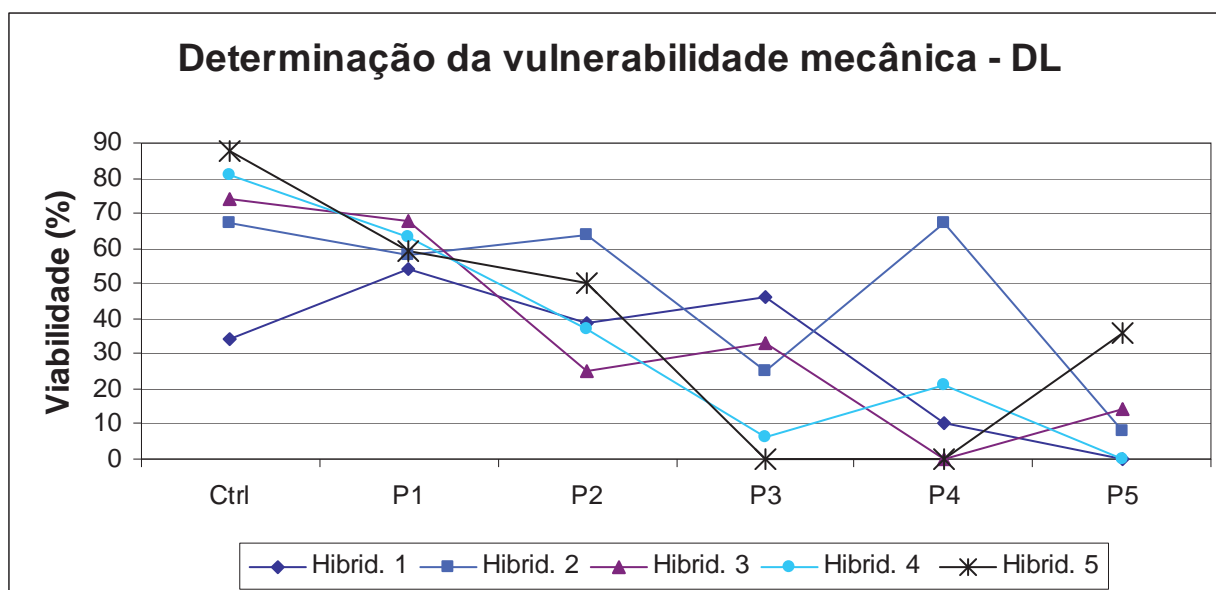


Figura 17– Variação da viabilidade celular nos diferentes pontos-crítico de lesão mecânica da DL. *Hibrid.* - hibridoma

A figura 18 lista os principais custos de implantação da técnica de micromanipulação.

Custos de implantação - μMAN	
Equipamento	Valor (R\$)
<i>Axiovert 200</i> ®	60.686,53
<i>Transferman NK2</i> ®	64.459,50
<i>CellTram Vario</i> ®	9.361,15
<i>Microcapilares</i>	2.208,95
TOTAL	136.716,13

Figura 18 – Custos de implantação da técnica de micromanipulação.

A comparação entre o consumo de MC20 nas duas técnicas apresentou uma redução de 61,54% como demonstrado na figura 19.

VOLUME DE MEIO DE CULTURA (mL)	
<i>Diluição Limitante</i>	26 \pm 1,7
<i>Micromanipulação</i>	10 \pm 0,14
Redução Percentual	61,54 %

Figura 19 – Consumo médio de MC20 nas técnicas.

Os insumos utilizados, a quantidade utilizada em cada método de clonagem, preço unitário e o custo por método estão representados na figura 20.

Insumo	Quantidade por Clonagem		Marca	Preço unitário (R\$)	Custo por Clonagem (R\$)	
	DL	μ Man			DL	μ Man
<i>Óleo Mineral</i>	0 mL	28 mL	Rioquímica ®	0,01	0,00	0,35
<i>MC20</i>	26 mL	10 mL	<i>In house</i>	0,54	16,14	6,21
<i>Placa de Petri</i>	0 un.	4 un.	TPP ®	0,81	0,00	3,23
<i>Placa de 96 poços</i>	1 un.	1 un.	TPP ®	5,15	5,15	5,15
<i>Ponteira de 1000 μL</i>	1 un.	3 un.	Axygen ®	0,04	0,04	0,13
<i>Ponteira de 200 μL</i>	8 un.	12 un.	Axygen ®	0,04	0,32	0,48
<i>Ponteira de 10 μL</i>	0 un.	99 un.	Axygen ®	0,04	0,00	3,91
<i>Tubo cônico de 15 mL</i>	4 un.	0 un.	BD ®	0,70	2,81	0,00
<i>Pipeta soro. 10 mL</i>	1 un.	4 un.	Greiner ®	1,10	1,10	4,40
<i>Microcapilar</i>	0 un.	0,5 un.	Eppendorf ®	88,36	0,00	44,18
<i>Suporte em "V"</i>	1 un.	1 un.	Eppendorf ®	11,95	11,95	11,95
<i>Hora-trabalho</i>	2,7 h	3,7h	----	72,85	196,70	269,55
SOMA					234,21	349,52

Figura 20 – Custos dos insumos descartáveis utilizados nos procedimentos. *MC20* – Meio de Cultura Completo suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino

DISCUSSÃO

Em relação ao tempo de execução dos procedimentos de clonagem celular, a figura 5 demonstra uma significativa diferença entre a manipulação da DL e da μ Man. Tal diferença não pode ser observada no tempo relativo às três observações microscópicas que sucedem cada procedimento. Ao comparar o tempo de observação das duas técnicas, considerando uma diferença de 10 minutos, foi possível determinar que o tempo de observação da DL foi menor em 5% dos procedimentos, foi superior ao da μ Man em 30% e não houve diferença entre os tempos de observação em 65% dos procedimentos (Tabela 1). Da forma como o protocolo de μ Man foi delineado para este estudo, o tempo de execução desta técnica é, em média, 47% maior do que o tempo de execução da DL. Entretanto, considerando apenas o tempo de manipulação, acrescido do tempo da observação realizada 10 dias após o procedimento, ocorreu uma redução de 28%, em

média, no tempo de execução, fazendo com que a diferença de tempo entre as duas técnicas seja em média de 26%. Os dados apresentados nas figuras 7 e 8 destacam ainda mais a redução nos tempos de observação e execução dos procedimentos de clonagem bem como uma menor variação entre o tempo de observação na nova proposta para a μ Man. Ao comparar as médias do tempo de observação de ambas as técnicas, considerando apenas o tempo relativo à terceira observação, o tempo necessário após a μ Man é de 4 a 6 vezes menor que o necessário à DL..

A figura 6 apresenta dados relativos à proporcionalidade do tempo em relação às atividades desenvolvidas durante a execução do procedimento. Pode-se destacar que mais de 60% do tempo de execução não é dedicado à seleção e isolamento das células de interesse. Este tempo, registrado no gráfico como “outros” é utilizado para o transporte entre o micromanipulador e o fluxo laminar, obrigatoriamente distantes para evitar vibrações, manutenção da assepsia e ajustes no sistema de injeção. A fadiga do manipulador não exerce influência significativa devido aos curtos intervalos de tempo realizados entre a montagem, micromanipulação, e plaqueamento e ao curto tempo despendido nestas atividades.

A primeira observação dos clones, realizada 48h após a clonagem, exige grande atenção e habilidade visual do manipulador na busca de colônias de 2 a 8 células (figuras 9, 10 e 13) em uma área de $33,6 \text{ mm}^2$ *. Considerando que o diâmetro médio de um hibridoma é de $15\mu\text{m}$, é necessário buscar uma área 12.000 vezes maior que a área ocupada pelas células.

O crescimento acelerado dos hibridomas pode causar a junção de agrupamentos celulares oriundos de diferentes células 48h após o procedimento, impossibilitando uma classificação precisa dos clones. A figura 10 (A e B) documenta este tipo de acontecimento. As imagens apresentadas na figura 11, ressaltam que a observação realizada 48h após o procedimento de DL é crucial para a classificação dos clones mas deve ser confirmada pela observação realizada 96h após a DL, em especial quando realizada por observador inexperiente. Estes dados confirmam o que fora observado por diversos outros autores ^(23,24, 26).

A figura 12 demonstra o grande número de células de morfologias variadas, entre elas, tímócitos, fibroblastos, células epiteliais e estromais do timo do camundongo, que são

* Área do poço da placa de cultura de 96 poços, calculada com base nos dados fornecidos pelo fabricante (TPP® AG – Suíça).

provenientes da suspensão de *feeder cells*. Não é raro o observador equivocarse na classificação dos clones na primeira observação devido à semelhança destas células com os hibridomas, quando em suspensão. A μ Man oferece a possibilidade de eliminação destas observações devido ao fato da checagem visual da monoclonalidade ocorrer antes do plaqueamento dos clones, ainda em observação microscópica direta no micromanipulador. Não é necessária a classificação dos clones, o que pode reduzir a observação microscópica para apenas uma observação que poderá ser realizada após sete dias, mas preferencialmente após 10 dias do procedimento. A taxa de desdobraimento populacional de hibridomas é estimada em 18h^(24,25) e sendo assim, após 10 dias de cultivo, estima-se que o clone possua mais de 8.000 células (2^{13} células), o que torna sua visualização microscópica quase instantânea, e reduz em cerca de 45% o tempo de observação. Não foram observadas diferenças na cinética de crescimento dos clones obtidos por micromanipulação conforme evidenciado pelas figuras 13, 14 e 15.

Os procedimentos de μ Man apresentaram EC acima da média descrita na Literatura^(17,19) em 40% dos procedimentos (Tabela 2). Com base nos dados de EC relativa, 50% dos procedimentos de μ Man apresentaram ECRel acima da média, sendo que em oito procedimentos a diferença foi 20% superior. Pode ser destacado também que, dos 20 procedimentos de μ Man realizados, 17 (85%) apresentaram ECRel acima da média da DL, sendo que em 10 procedimentos esta diferença foi 22% superior à média. Foi possível verificar que os procedimentos de μ Man produziram, em média, quatro vezes mais clones “únicos” que os procedimentos de DL, sendo que em alguns casos, esta razão chegou a 10 vezes. Diversos autores^(24,25) recomendam ao menos três ciclos de subclonagens para a obtenção de culturas monoclonais, sendo que mesmo assim, é necessária a confirmação da monoclonalidade do anticorpo produzido por eletroforese, imunoprecipitação ou Citometria de Fluxo. Os clones produzidos por μ Man não necessitam de técnicas adicionais para a comprovação da monoclonalidade, visto que tal controle é executado pelo manipulador, por observação direta ao microscópio, no momento da clonagem, conforme observado por Wewetzer & Seilheimer⁽¹⁹⁾.

A figura 15 apresenta dados sobre a influência da viabilidade celular do híbrido sobre a EC de cada uma das técnicas. É possível observar que a EC do procedimento de DL é mais afetada pela viabilidade do híbrido com picos e vales coincidentes no gráfico. Entretanto, mesmo em procedimentos de DL cuja viabilidade foi relativamente alta (acima

de 80%), a EC manteve-se abaixo de 20% como pode ser observado nos procedimentos 2, 5, 12 e 14. Na técnica de μ Man, a viabilidade do híbrido não influencia a EC já que as células são selecionadas pelo manipulador com base em suas características morfológicas de vitalidade e, portanto, somente são clonadas células viáveis. Tal característica é evidenciada nos procedimentos 8, 11, 12 e 14, cuja viabilidade do híbrido é superior à 85% e EC é inferior a 20%. Esta baixa EC pode ser devida à incapacidade de recuperar as células das gotículas de MC20 utilizadas durante a micromanipulação. Diversos fatores podem afetar este processo como, por exemplo, ressecamento da gotícula, aderência da célula à placa de Petri, posicionamento da ponteira e homogeneização insuficiente.

A figura 16, apresenta a curva de aprendizado do manipulador para a técnica de μ Man determinada como a variação do tempo de execução da técnica em função do número de procedimentos executados. Há uma tendência de redução do tempo de execução mais acentuada no início dos procedimentos devido à adaptação aos equipamentos e sequência de atividades em cada etapa do procedimento. Esta variação tende à estabilidade conforme o número de procedimentos aumenta e como pode ser observado no gráfico, após 25 procedimentos o tempo de execução deve variar entre 150 e 180 minutos.

A μ Man apresentou um ICC total de 0,63% contra 0,42% da DL, o que indica que as técnicas apresentam alto nível de manutenção da assepsia. Foram observados 20 poços contaminados sendo 8 de DL e 12 de μ Man, um índice 50% maior.

Conforme relatado por Freshney⁽²⁵⁾, alterações no ambiente do laboratório de cultura, tais como temperatura, umidade e manutenção de equipamentos podem elevar os índices de contaminação. Durante o período de execução dos 12 últimos procedimentos foi necessária a realização da manutenção do sistema de ventilação do laboratório prejudicando o mecanismo de pressão positiva e alterando a temperatura ambiente para 30° C, em média. Também houve alteração na umidade do ambiente devido ao regime sazonal de chuvas estar com volumes acima do previsto para a época. Entretanto, nenhuma das placas de testemunho apresentou sinais de contaminação, o que indica que a origem das contaminações encontradas poderia ser decorrente da manipulação durante as observações. Também não foram observadas contaminações em culturas de outros protocolos no laboratório. A ausência de contaminantes nas placas testemunho da μ Man

demonstra que a metodologia utilizada garantiu a manutenção da assepsia durante o procedimento de μ Man.

Os dados apresentados na figura 17 demonstram que as diversas etapas da técnica de DL ocasionam lesões mecânicas nas células, reduzindo, em média, 85% a viabilidade da suspensão final. Esta diferença alcançou 100% nos híbridos 1 e 4. Foi observado que estas lesões são decorrentes dos procedimentos de centrifugação anterior à diluição e homogeneização entre as diluições seriadas.

O custo de implantação da técnica de μ Man (Figura 18) inclui a aquisição de 25 microcapilares, o suficiente para a realização de 50 procedimentos. Considerando que a média de procedimentos realizados em nosso laboratório é de 11 procedimentos ao ano, esta quantidade inicial seria suficiente para quatro anos e seis meses de trabalho. Aliado ao fato do fabricante não vender o insumo em quantidades inferiores a 25, este custo foi contabilizado juntamente com a aquisição do equipamento. O consumo de MC20 foi reduzido em 61,54% com a técnica de μ Man correspondendo a uma economia de R\$ 485,17 por litro de MC20 utilizado. Após 4,5 anos de utilização da técnica, período de finalização da primeira compra de microcapilares, esta redução representa uma economia de R\$ 2183,29 por litro de MC20.

Foi observado que o custo de execução da técnica de μ Man foi 49% superior à técnica de DL (Figura 20). Dentre estes custos, a hora-trabalho corresponde a 77% do custo e os microcapilares por 12%. Na técnica de DL, os custos de hora-trabalho correspondem a 83%. A alta eficiência de clonagem nos procedimentos de DL causa um aumento no custo de produção de *mAbs*, visto que os clones classificados como múltiplos deverão ser testados e os clones reagentes necessitam, obrigatoriamente, de subclonagens para atingir a monoclonalidade. Estes valores não foram quantificados neste trabalho devido à heterogeneidade de métodos de teste que podem ser utilizados para a determinação da reatividade dos clones, todavia, a utilização da metodologia de Citometria de Fluxo, como delineado para os híbridos MSC e CTMh, eleva os custos. Para estes testes é necessário analisar custos de reagentes como anticorpos específicos, controles isotípicos e a utilização do equipamento.

CONCLUSÕES

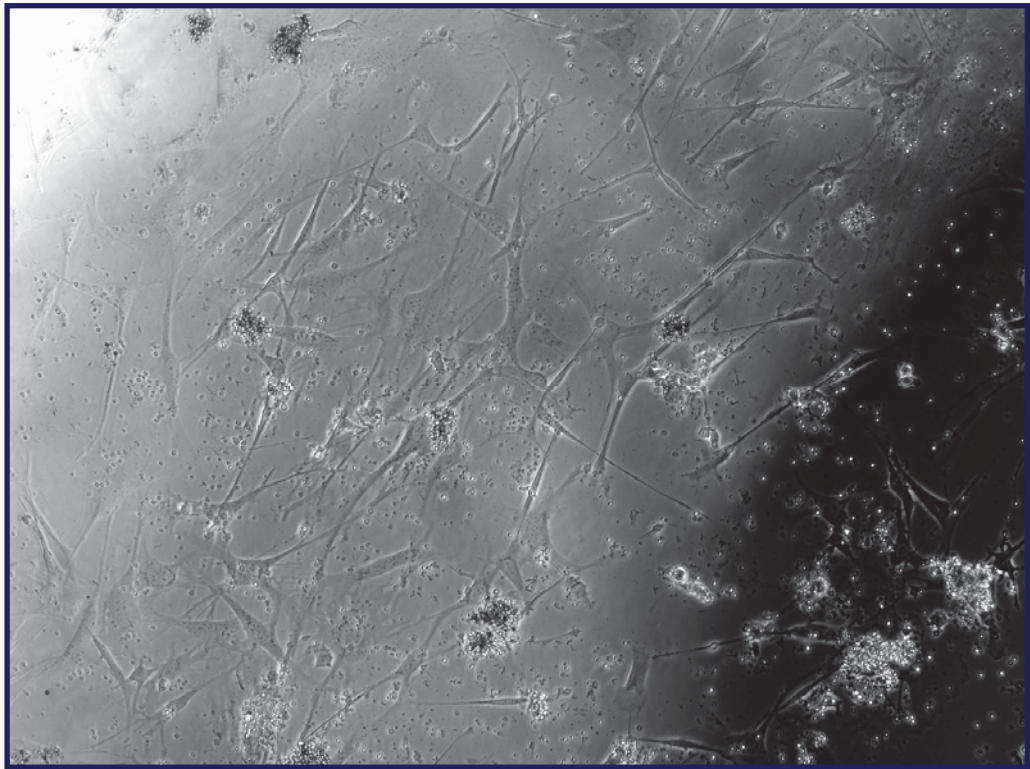
- A clonagem celular por micromanipulação é um procedimento preciso e de alta eficiência, podendo substituir a clonagem celular por diluição limitante.
- A condição de monoclonalidade é garantida na clonagem celular por micromanipulação visto que 100% dos clones obtidos são considerados únicos.
- Apesar da clonagem celular por diluição limitante ser um procedimento de fácil execução e baixo custo, conclui-se que sua eficiência é limitada e não garante a condição de monoclonalidade do anticorpo produzido.
- Embora sofisticada, a clonagem celular por micromanipulação não exige habilidades distintas das necessárias para os demais procedimentos realizados no laboratório de cultura celular.
- Os custos de implantação e execução da clonagem celular por micromanipulação podem ser reduzidos pelo aumento na produtividade, redução do tempo de manutenção das culturas e eliminação das técnicas de comprovação da monoclonalidade pós-clonagem.

REFERÊNCIAS:

- ¹ Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256: 495-7.
- ² Köhler G, Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol*. 1976; 6: 511-9.
- ³ Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market for 2008. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005; 59:384-96.
- ⁴ Ottensmeir C. The classification of lymphomas and leukemias. *Chem Biol Interact*. 2001; 135-136: 653-64.
- ⁵ Rodig SJ, Shahsafaei A, Li B, Dorfman DM. The CD45 isoform B220 identifies select subsets of human B cells and B-cell lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol*. 2005; 36:51-7.
- ⁶ Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. 2010; 10: 317-27.
- ⁷ Morrisson SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci*. 1984; 81:6851-5.
- ⁸ Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*. 1986; 321:522-5.
- ⁹ Maranhão AQ, Brígido MM. Anticorpos humanizados: humanização de anticorpos de interesse clínico. *Biotechnol Cienc Desenvol*. 2001; 23:38-44.
- ¹⁰ Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- ¹¹ Siegel DL. Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol*. 2002; 9:15-22.
- ¹² Rader C, Barbas CF. Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol*. 1997; 8:503-8.
- ¹³ Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Tronstine M, Higgins KM, Schramm SR et al. Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature*. 1994; 368:856-9.

-
- ¹⁴ Chiarella P, Fazio VM. Mouse monoclonal antibodies in research: strategies for high-throughput production. *Biotechnol Lett.* 2008; 30:1303–1310.
- ¹⁵ Ben-Kasus T, Schechter B, Sela M, Yarden Y. Cancer therapeutic antibodies come of age: targeting minimal residual disease. *Mol Oncol.* 2007;1:42-54.
- ¹⁶ IMS Health. The pharma report 2008. Plymouth Meeting, 2008. 7p
- ¹⁷ Caron AW et al. Use of a micromanipulator for high-efficiency cloning of cells co-expressing fluorescent proteins. *Methods Cell Sci.* 2000; 22:137–45.
- ¹⁸ Love JC et al. A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. *Nat Biotechnol.* 2006; 26:703-7.
- ¹⁹ Wewetzer K, Seilheimer B. Establishment of a single-step hybridoma cloning protocol using an automated cell transfer system: comparison with limiting dilution. *J Immunol Methods.* 1995; 179:71-6.
- ²⁰ Karp G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos.* Barueri: Manole; 2005.
- ²¹ Wilmut I, Beaujean N, de Souza PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA et al. Somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 2002; 419:583-6.
- ²² Underwood PA, Bean PA. Hazards of the limiting-dilution method of cloning hybridomas. *J Immunol Methods.* 1988; 107:119–28.
- ²³ Goding JW. *Monoclonal antibodies: principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology.* 2th ed. London: Academic Press; 1986.
- ²⁴ Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
- ²⁵ Freshney IR. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques.* New York: Wiley-Liss; 2000.
- ²⁶ Deffune E. *Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Intérêt en immunohématologie [tese].* Paris: Université Pierre et Marie Curie; 1992.
- ²⁷ Carrol S, Al-Rubbeai M. The selection of high producing cell lines using flow cytometry and cell sorting. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4:1821-9.
- ²⁸ DeMaria CT et al. Accelerated clone selection for recombinant CHO cells using a FACS-based high-throughput screen. *Biotechnol Prog.* 2007; 23:465–72.

-
- ²⁹ Sleiman RJ et al. Accelerated cell line development using two-color fluorescence activated cell sorting to select highly expressing antibody-producing clones. *Biotechnol Bioeng.* 2008; 99:578–87.
- ³⁰ Martins CF. Avaliação do potencial de produção de embriões bovinos pela técnica de injeção intracitoplasmática de células espermáticas [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2001.
- ³¹ Devito LG. Fatores que influenciam na injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) em eqüinos e bovinos [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2008.
- ³² Fernandes CB. Contribuição para a clonagem em eqüinos por meio da transferência nuclear [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2008.
- ³³ Genetix Limited. ClonePix FL: screen and select secretory cell lines [2011 Jan 27]. Disponível em: http://www.genetix.com/en/systems/clonepix_fl/introduction/index.html# . Acesso em: 27/01/2011.
- ³⁴ Hanania EG, Fieck A, Stevens J, Bodzin LJ, Palsson BØ, Koller MR. Automated in situ measurement of cell-specific antibody secretion and Laser-mediated purification for rapid cloning of highly-secreting producers. *Biotechnol Bioeng.* 2005; 91:872-6.
- ³⁵ Deffune E, Rossi-Ferreira R, Alvarado RC, Machado PEA. Manual GMP/BPL Seção de Biotecnologia/ Laboratório de Engenharia Celular. Botucatu: UNESP; 2007.
- ³⁶ Zago MA, Falcão RP, Pasquine R, editores. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo: Atheneu; 2005.



ANEXOS



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.

CEP: 18.618-970

Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143

e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br

Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99




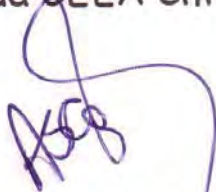
Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 742 sobre o projeto de pesquisa "Análise do desempenho da técnica de clonagem celular por micromanipulação versus diluição limitante", a ser conduzido por Daniel Bassetto Jesuíno, orientada pela Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune, com apoio técnico de Carlos Roberto Gonçalves de Lima e Fatima Regina Guimarães, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/05/2009.


Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

**Resultados das Análises Microbiológicas do Ar e Ambiente**Local: **HEMOCENTRO**

Botucatu, 20 de dezembro de 2010.

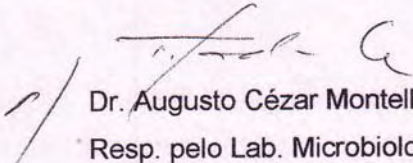
Data da coleta: 10/12/2010

1. Engenharia celular (sala comum e estufa)**1.1. Ar:**

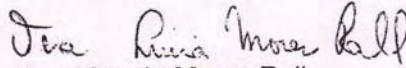
- Ausência de enterobactérias e de bastonetes Gram negativos não fermentadores/100 L de ar.
- Ausência de *Staphylococcus* coagulase positiva/100 L de ar.
- Ausência de bolores e leveduras/100 L de ar.

1.2. Superfícies:

- Ausência de enterobactérias e de bastonetes Gram negativos não fermentadores
- Ausência de *Staphylococcus* coagulase positiva.



Dr. Augusto César Montelli
Resp. pelo Lab. Microbiologia Clínica
Depto de Microbiologia e Imunologia



Dra. Vera L. Mores Rall
Depto de Microbiologia e
Imunologia

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

