

**Luciandro Pereira Sodré**

**Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 obtido *in house* para  
utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica**

Orientadora: Dra. Elenice Deffune

Co-Orientadora: Dra. Márjorie de Assis Golim

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, curso de Mestrado Profissionalizante do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Médica.

Botucatu-SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Sodré, Luciandro Pereira.

Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 obtido *in house* para  
utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica / Luciandro Pereira  
Sodré. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina de Botucatu, 2009.

Orientadora: Elenice Deffune

Co-orientadora: Márjorie de Assis Golim

Assunto CAPES: 40205002

1. Imunologia 2. Antígenos 3. Imuno-histoquímica

CDD 616.316

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal; CD45; Citometria de fluxo; Imuno-  
histoquímica

## Cântico XIII

Renova-te.  
Renasce em ti mesmo.  
Multiplica os teus olhos, para verem mais.  
Multiplica-se os teus braços para semeares tudo.  
Destrói os olhos que tiverem visto.  
Cria outros, para as visões novas.  
Destrói os braços que tiverem semeado,  
Para se esquecerem de colher.  
Sê sempre o mesmo.  
Sempre outro. Mas sempre alto.  
Sempre longe.  
E dentro de tudo.

*Cecília Meireles*

**Dedico esse trabalho,**

**À minha esposa Milene,  
Pela ternura, amor e compreensão, apoio e incentivo,  
que muito colaborou para a concretização e finalização de mais essa etapa.**

**À minha família,  
Em especial aos meus pais Evandro e Vera e, meus irmãos Priscila e Junior,  
por acreditarem nos meus sonhos e por sonharem junto...**

**Meus sinceros agradecimentos,**

**À minha orientadora Profa. Dra. Elenice Deffune por acreditar em mim e proporcionar-me a concretização de um sonho, pela enorme colaboração científica e disponibilidade em auxiliar-me nas mais inconstantes horas.**

**À minha Co-orientadora e amiga Dra. Márjorie de Assis Golim, pela amizade e exemplo de profissional, pela dedicação irrestrita e auxílio sempre oportuno nas horas mais difíceis. Meu muito obrigado, saiba que seu apoio foi fundamental para essa conquista.**

**Aos professores e demais profissionais do Hemocentro de Botucatu, pelo acolhimento, auxílio e amizade.**

**Aos amigos Léia, Tata, Valdir, Cléo, Andrei, Gabrielle, Vitória, Patrícia Martinez, Priscilla e tantos outros que direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho.**

**Ao Departamento de Patologia da FMB-UNESP pelo auxílio na minha formação.**

**À Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues pela grande colaboração nesse trabalho, pela atenção, incentivo e solicitude. Agradeço por compartilhar seu conhecimento e pela forma tão amigável com que interagiu comigo e com esse trabalho.**

**Aos amigos do Laboratório de Citologia do Departamento de Patologia da FMB-UNESP (*corujões*) em especial à Dra. Maria Luiza C. S de Oliveira e ao amigo Bruno Darros pela compreensão e amizade.**

**Ao Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMB-UNESP a quem agradeço na pessoa de Marcos Franchi toda a colaboração e auxílio à execução desse trabalho. Marquinho muito obrigado pela força.**

**Ao Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM em especial ao Prof. Dr. Marcello Franco e ao técnico Joaquim Soares pela possibilidade de execução de parte desse trabalho segundo a metodologia de TMA.**

**Aos pacientes do programa de DST/aids e aos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu, razão primeira dos resultados desse trabalho.**

**Aos familiares e amigos, obrigado por existirem e por tornarem minha jornada melhor de ser seguida...**

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Tecnologia de Híbridoma desenvolvida por Köhler & Milstein.....14
- Figura 2:** Estrutura molecular do CD45 evidenciando suas regiões extracelular e citoplasmática.....15
- Figura 3:** Esquema da confecção do bloco-mãe e das lâminas de TMA.....18
- Figura 4:** Bloco e lâminas histológicas utilizando a técnica de *Tissue Microarray* .....18
- Figura 5:** **A:** Equipamento AKTA-Prime™ (GE®) e **B:** Esquema de eluição das proteínas por gradiente de pH.....24
- Figura 6:** Esquema da conjugação do AcMm ao fluorocromo FITC.....25
- Figura 7:** **A-** Dispositivo de base fixa para confecção de blocos de TMA – Beecher™ Instruments, **B-** Micrômetro utilizado na preparação das lâminas de TMA, **C:** Kit TMA Beecher™ Instruments.....27
- Figura 8:** Planilha de trabalho para confecção de bloco-mãe de TMA.....28
- Figura 9:** **A:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB19 (pré-purificação); **B:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB5. Gel de ágar 1%. Coloração negro de amido; **C:** Distribuição das proteínas plasmáticas.....31
- Figura 10:** **A:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB 19 (pré-purificação); **B:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB 19 (pós-purificação). Gel de ágar 1%. Coloração negro de amido.....32
- Figura 11:** Reconhecimento das populações celulares – **A:** reagente anti-CD45 comercial, **B:** LINB19, **C:** LINB5 e **D:** LINB17.....33

<b>Figura 12:</b> Reconhecimento das populações celulares – A: Anti-CD45 comercial; B: LINB19-FITC.....	<b>34</b>
<b>Figura 13:</b> A: <i>gate</i> na população celular de interesse, B: padrão de reconhecimento celular – reagente comercial, C: padrão de reconhecimento celular – reagente obtido <i>in house</i> (LINB5) – grupo doadores.....	<b>36</b>
<b>Figura 14:</b> A: <i>gate</i> na população celular de interesse, B: padrão de reconhecimento celular – reagente comercial, C: padrão de reconhecimento celular – reagente obtido <i>in house</i> (LINB5) – grupo pacientes.....	<b>37</b>
<b>Figura 15:</b> Positividade de co-expressão do anti-CD45 comercial com o AcMm obtido <i>in house</i> (LINB5).....	<b>40</b>
<b>Figura 16:</b> Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 comercial. A - aumento de 5x, B - aumento de 10x, C - aumento de 40 x evidenciando células escamosas que funcionaram como controle negativo (seta), D- aumento de 40 x. ....	<b>41</b>
<b>Figura 17:</b> Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido <i>in house</i> na diluição 1:100. A - aumento de 10x, evidenciando células escamosas que funcionaram como controle negativo (seta), B - aumento de 40x, C - aumento de 40 x, ..	<b>42</b>
<b>Figura 18:</b> Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido <i>in house</i> . A – Diluição 1:200 - aumento de 10x, B – Diluição 1:200 - aumento de 40x, C – Diluição de 1:400 - aumento de 10 x evidenciando o material com bastante background, D – Diluição de 1:400 - aumento de 40 x.....	<b>43</b>

**Figura 19:** Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:800 - aumento de 10x, **B** – Diluição 1:800 - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:1000 - aumento de 10 x , **D** – Diluição de 1:1000 - aumento de 40 x.....**44**

**Figura 20:** Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:3000 - aumento de 10x, **B** – Diluição 1:3000 - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:5000 - aumento de 10 x, **D** – Diluição de 1:5000 - aumento de 40 x....**45**

**Figura 21:** Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:10000 - aumento de 5x, **B** – Diluição 1:10000 - aumento de 10x, **C** – Diluição de 1:10000 - aumento de 40 x , **D** – Diluição de 1:10000 - aumento de 40 x.....**46**

**Figura 22:** Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45. **A** – Diluição 1:250 anticorpo comercial - aumento de 40x, **B** – Diluição 1:3000 anticorpo obtido *in house* - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:5000 anticorpo obtido *in house* - aumento de 40 x, **D** – Diluição de 1:10000 anticorpo obtido *in house* - aumento de 40x .....**47**

**Figura 23:** Lâmina de Tissue Microarray corada com anticorpo anti-CD45 comercial. **A** – aumento de 5x, **B** - aumento de 10x, **C** – aumento de 40x, **D**: aumento de 40x .....**48**

**Figura 24:** Lâmina de Tissue Microarray corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:5000 **A** – aumento de 5x, **B** - aumento de 10x, **C** – aumento de 40x, **D**: aumento de 40x.....**49**



**Figura 25:** Lâmina de Tissue Microarray corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:10000 .  
A – aumento de 5x, B - aumento de 10x, C – aumento de 40x, D: aumento de 40x.....**50**

**Figura 26:** Lâmina de Tissue Microarray. A – corada com anticorpo anti-CD45 comercial - aumento de 40x, B - corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:10000 - aumento de 40x.....**51**

**Figura 27:** Lâmina de Tissue Microarray processada segundo protocolo de recuperação antigênica em panela de Pascal. A – corada com anticorpo anti-CD45 comercial - aumento de 5x, B - corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:10000 - aumento de 5x...**52**

## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Resultados estatísticos da padronização do volume de AcMm conjugado ao FITC a ser utilizado

**Tabela 2:** Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (porcentagem de células marcadas) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido in house (LINB 19-FITC) – grupo pacientes.

**Tabela 3:** Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (média da intensidade de fluorescência- MIF) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido in house (LINB 19-FITC) – grupo pacientes Gráfico 4: Relação entre volume aspirado e tempo médio para 1a passagem.

**Tabela 4:** Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (porcentagem de células marcadas) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo pacientes.

**Tabela 5:** Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (média da intensidade de fluorescência- MIF) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo pacientes.

**Tabela 6:** Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (porcentagem de células marcadas) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo doadores.

**Tabela 7:** Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (média da intensidade de fluorescência- MIF) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo doadores.

## RESUMO

Anticorpos monoclonais (AcMm) são imunoglobulinas produzidas por engenharia celular através da fusão de células tumorais com linfócitos B provenientes de organismos previamente imunizados contra o antígeno de interesse. As células recém criadas recebem a denominação de hibridomas, crescem indefinidamente em cultura por agregar características de imortalidade das células tumorais. A tecnologia de monoclonais compreende etapas seriadas, incluindo imunização, fusão, *screening*, clonagem, caracterização de especificidade dentre outras. O CD45 é um marcador expresso na superfície de todos os leucócitos humanos: linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos e neutrófilos sendo, o maior componente da membrana de linfócitos, o que aumenta a probabilidade de obtenção de AcMm com este perfil em protocolos de imunização com linfócitos. Este marcador é amplamente utilizado em diagnóstico por citometria de fluxo, no acompanhamento de pacientes HIV+, na classificação de leucemias e linfomas, quantificação de células CD34+ para transplantes de medula óssea e, também em imuno-histoquímica auxiliando na subtipagem das neoplasias, principalmente linfomas (Hodgkin, não Hodgkin e outras categorias) e leucemias de células B e T. Assim, este trabalho teve por objetivo a caracterização de anticorpo monoclonal anti-CD45 desenvolvido *in house* e validação deste em aplicações diagnósticas envolvendo citometria de fluxo e imuno-histoquímica, comparando-o com anticorpos monoclonais comerciais, visando minimização dos custos dessas técnicas. Foram utilizadas 50 amostras de sangue excedente de doadores para o grupo controle e 48 amostras de sangue de pacientes HIV+ para validação do AcMm em citometria de fluxo e analisados 114 fragmentos em lâmina de *Tissue Microarray - TMA* provenientes de 38 amostras de amígdalas para validação do AcMm em imuno-histoquímica. Em citometria de fluxo, os reagentes anti-CD45 comercial e o provável anti-CD45 obtido *in house* (clone LINB5) quando comparados, não apresentaram diferenças significativas em relação ao percentual de reconhecimento celular. Quanto ao parâmetro média de intensidade de fluorescência – MIF, estes apresentaram diferenças extremamente significativas. Em imuno-histoquímica o AcMm obtido *in house* apresentou similaridade na marcação do antígeno quando comparado ao reagente comercial, com a vantagem de apresentar baixo custo e maior rendimento.

**Palavras-Chave:** Anticorpo monoclonal, CD45, Citometria de fluxo, Imuno-histoquímica

## ABSTRACT

### **Validation of anti-CD45 monoclonal antibody *in-house*-obtained for immunohistochemistry and flow cytometry.**

Monoclonal antibodies (mAb) are immunoglobulins produced by cell engineering through fusion of tumor cells and B lymphocytes from organisms previously immunized against the antigen of interest, generating thus hybridomas that indefinitely grow in culture since they aggregate immortality characteristics of tumor cells capable of secreting antibodies. The production of such antibodies consists of sequential steps, including immunization, fusion, screening, cloning, and specificity characterization. CD45 is a marker expressed in the surface of all human leukocytes: lymphocytes, eosinophils, monocytes, basophils, and neutrophils. Besides, CD45 is the major component of lymphocyte membranes, which increases the probability of obtaining mAb presenting such profile in immunization procedures using lymphocytes. This marker has been widely used in diagnosis through flow cytometry, besides monitoring of HIV+ patients, classification of leukemia and lymphomas, quantification of CD34+ cells for bone marrow transplantation, and also in immunohistochemistry, helping in subtyping of neoplasms, mainly lymphomas (Hodgkin's, non-Hodgkin and other categories) and B- and T-cell leukemia. Thus, this work aimed to characterize the *in-house*-developed anti-CD45 monoclonal antibody besides its validation in diagnostic applications involving flow cytometry and immunohistochemistry through comparison with commercial monoclonal antibodies in order to reduce the costs of such techniques. Fifty samples of extra blood from donors were used in the control group, and 48 blood samples from HIV+ patients were used for mAb validation in flow cytometry. For mAb immunohistochemical validation, 114 fragments from 38 amygdala samples were analyzed in a Tissue Microarray - TMA slide. In flow cytometry, the commercial anti-CD45 and the likely *in-house*-obtained anti-CD45 (LINB5 clone) did not significantly differ concerning cell recognition percentage. As regards mean fluorescence intensity (MFI), both reagents presented extremely significant differences. In immunohistochemistry, the *in-house*-obtained mAb had a similar antigen marking relative to those of the commercial reagent; however, the former is cheaper and presents higher yield.

**Key-words:** Monoclonal antibody, CD45, Flow cytometry, immunohistochemistry

## SUMÁRIO

Epígrafe

Dedicatória

Agradecimentos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

<b>Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>21</b>
<b>Material e métodos .....</b>	<b>22</b>
<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>32</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>54</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>54</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>55</b>

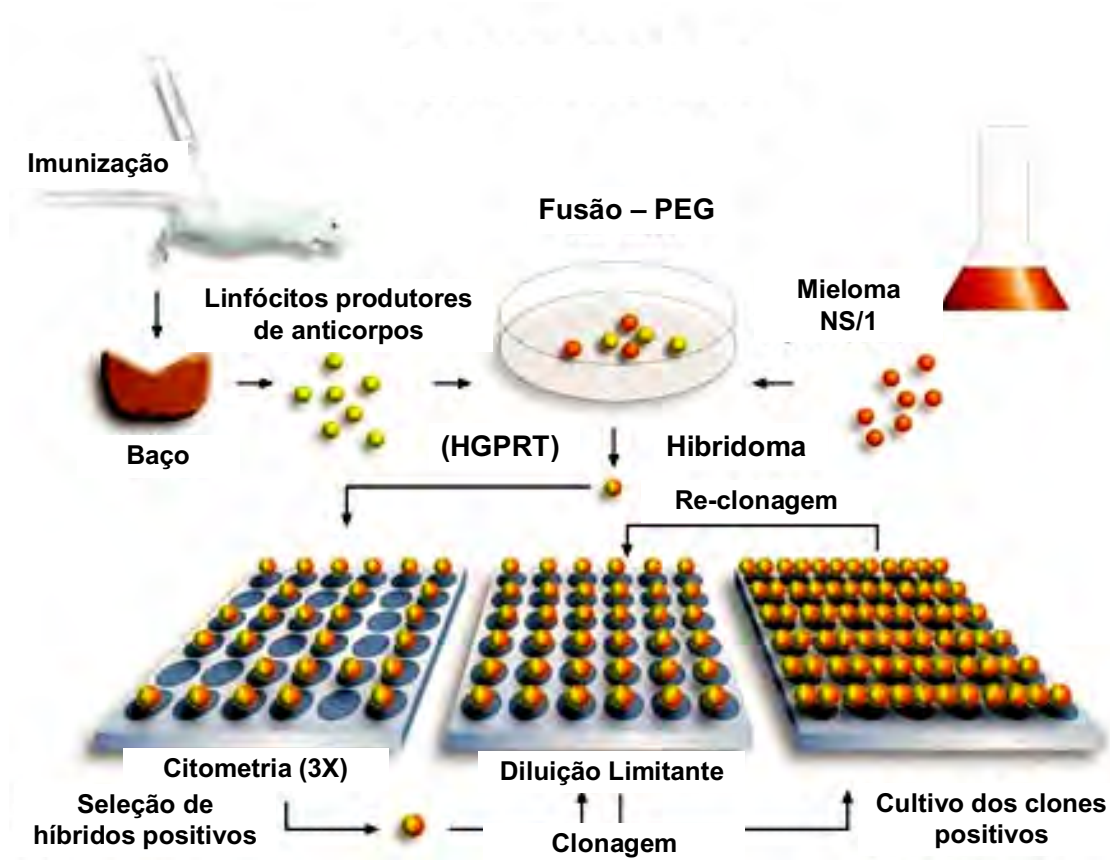
## INTRODUÇÃO

A possibilidade da produção de anticorpos policlonais em animais de laboratório é conhecida desde 1890 após descobertas de Behring e Kitasato que revolucionaram o campo de pesquisas. No entanto, esses anticorpos policlonais, cuja característica consiste em reconhecer múltiplos epítopos de um mesmo antígeno, são obtidos de uma população de células B bastante heterogênea, de um modo geral imunoglobulinas de pouca especificidade. Através da cultura celular *in vitro* é possível a obtenção de células oriundas de um único clone de linfócitos B onde todas são idênticas e, portanto secretam uma imunoglobulina dirigida contra um único epítipo do antígeno, com alta especificidade e afinidade, abrindo então a geração dos Anticorpos Monoclonais Murinos –AcMm. (Rossi-Ferreira, 2001).

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas produzidas por engenharia celular através da fusão de células tumorais com linfócitos B provenientes de organismos previamente imunizados contra o antígeno de interesse, gerando hibridomas que crescem indefinidamente em cultura, por agregarem características de imortalidade das células tumorais capazes de secretar anticorpos. Após a clonagem, sendo todas as células oriundas de uma única, estas produzirão imunoglobulinas homogêneas (Kohler & Milstein, 1975; Hudson & Souriau, 2003; Strome et al., 2007).

A produção destes anticorpos constitui-se de etapas seriadas, incluindo imunização, fusão, *screening*, clonagem, caracterização de especificidade e imunoquímica, reatividade do anticorpo, determinação do isotipo e potencial epítipo alvo (Golim, 2008).

A partir do desenvolvimento da metodologia por Köhler & Milstein em 1975, da tecnologia de hibridoma (Figura 1), que inclui a fusão entre células tumorais e linfócitos sensibilizados com o antígeno de interesse, o campo de estudos e aplicabilidade envolvendo anticorpos monoclonais tem atingido as mais variadas aplicações, a saber: no preparo de reagentes diagnósticos, na terapêutica e na pesquisa aonde vem auxiliando na elucidação dos fatores desencadeantes da resposta imune, purificação de proteínas, entre outras aplicabilidades (Rossi-Ferreira, 2001).



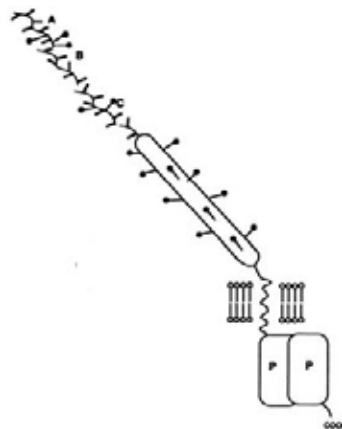
**Figura 1-** Tecnologia de Hibridoma desenvolvida por Köhler & Milstein.

Anticorpos monoclonais representam um importante avanço no tratamento e diagnóstico de diversas doenças hematológicas malignas e tumores sólidos, agindo em um alvo específico.

Atualmente, o Ministério da Saúde adquire grande quantidade de AcMm para uso diagnóstico. Entre as aquisições de maior impacto econômico para a nação, encontram-se os marcadores de monitoramento estabelecidos pelo Programa Nacional de DST/Aids. Mais recentemente o Programa oficial tem preconizado a quantificação de células CD45+ nas análises de monitoramento imunológico de adultos e crianças HIV+, juntamente com os marcadores CD3/CD4/CD8, definidores de subpopulações de linfócitos T. Essa análise possibilita fornecer resultados em valores absolutos e percentuais auxiliando assim a conduta médica (Golim,2008).

## O CD45

O CD45, antígeno leucocitário humano comum, é uma glicoproteína de superfície celular com um domínio citoplasmático tirosina-fosfatase (Figura 2) cujo papel, acredita-se, seja favorecer a ativação das células T (Dalchau et al., 1980; Streuli et al., 1988; Abbas & Lichtman, 2005). Enquanto o domínio extracelular do CD45 é pouco conservado entre as espécies, seu domínio citoplasmático é altamente conservado (Thomas, 1989; Trowbridge & Thomas, 1994). Os anticorpos monoclonais dirigidos contra epítomos do CD45 podem reconhecer esses epítomos conservados em proteínas encontradas em diferentes espécies, aumentando assim sua versatilidade como reagente molecular (Nelson et al., 2005).



**Figura 2** – Estrutura molecular do CD45 evidenciando suas regiões extracelular e citoplasmática

Trata-se de um marcador expresso na superfície de todos os leucócitos humanos: linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos e neutrófilos sendo, o maior componente da membrana de linfócitos, o que aumenta a probabilidade de obtenção de AcMm com este perfil em protocolos de imunização com linfócitos (Sutherland et al., 1996). Este marcador é amplamente utilizado em diagnóstico por citometria de fluxo, na classificação de leucemias e linfomas (Borowitz et al., 1993; Lacombe et al., 1997) e, também em imunohistoquímica auxiliando na subtipagem das neoplasias, principalmente linfomas (Hodgkin,



não Hodgkin e outras categorias) e leucemias de células B e T (Meis et al., 1986; Hall et al., 1988).

O uso de anticorpos anti-CD45 (Mittler et al., 1987) em linhagens celulares e linfócitos primários expressando CD45 funcional identificam a fosfatase como uma proteína essencial no desenvolvimento normal de células T e B e na sinalização de receptores antigênicos (Koretzky et al., 1990; Pingel et al., 1989; Kishihara et al., 1993), outros trabalhos evidenciam que os anticorpos monoclonais contra o antígeno leucocitário comum humano (anti-CD45) têm demonstrado relação com diversas funções imunológicas, incluindo a indução de atividade supressora (Morimoto et al., 1985; Rudd et al., 1987), atividade citotóxica (Newman et al., 1984), e indução da expressão de IL-2R (Ledbetter et al., 1985).

### **Anti-CD45 em técnicas laboratoriais**

Tendo em vista a importância deste marcador, o impacto econômico que pode gerar para o Ministério da Saúde e a amplitude de uso: técnicas de citometria de fluxo, imuno-histoquímica, ELISA e Western blotting, o Laboratório de Anticorpos Monoclonais da Seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu, investiu em protocolos de obtenção de marcadores leucocitários. Entre os clones desenvolvidos, secretores de anticorpos dirigidos contra antígenos de alta frequência nos leucócitos humanos, encontra-se o provável anti-CD45. A confirmação da especificidade e estudo de sua aplicabilidade, aliados aos interesses públicos vem ao encontro de um dos propósitos deste trabalho que visa a comparação de reagentes comerciais e produzidos *in house* utilizados na rotina de monitoramento de pacientes portadores de aids e, também no diagnóstico diferencial de pacientes com suspeita de linfoma, estabelecendo a relação entre a eficácia e o custo. O anti-CD45 tem alta sensibilidade para linfomas de baixo grau de malignidade, e sensibilidade reduzida naqueles de alto grau. Este marcador é expresso em cerca de 78% dos linfomas de células T e 4% dos linfomas de células B.

Em imuno-histoquímica têm sido uma importante ferramenta no diagnóstico histogenético das neoplasias indiferenciadas, na determinação da origem dos carcinomas metastáticos, na sub-classificação das neoplasias, como por exemplo em linfomas,

diferenciando-as em benignas ou malignas e desse modo auxiliando na caracterização do prognóstico da doença e na indicação do tratamento adequado ao paciente.

### **Citometria de Fluxo**

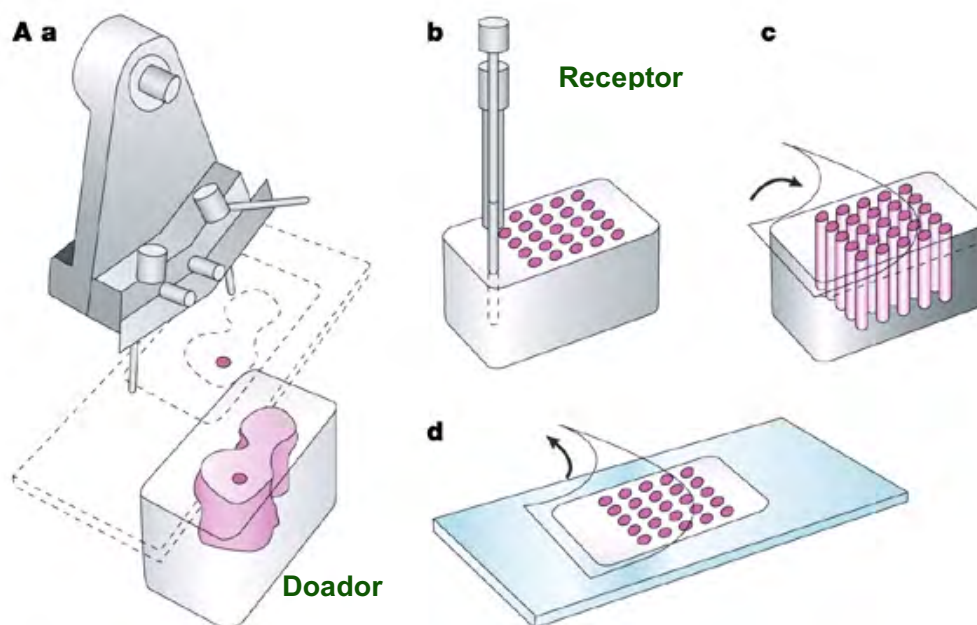
Citometria de fluxo é um método tecnológico que permite verificar características físico-químicas em células ou partículas individualmente e, caracterizar suas variações (Bruin et al., 1983; Johnson, 1989). Permite a identificação de antígenos fixados na superfície de células ou partículas, suspensas em meio líquido, quando incubadas com anticorpos monoclonais ligados a um fluorocromo (Bacal et al., 2003; Coon et al., 1991; Javois, 1999). Os fluorocromos são moléculas propícias para marcar um alvo específico e produzir resposta observável através da emissão de fluorescência após estímulo (Johnson, 1998).

### ***Tissue Microarray (TMA) e Imuno-histoquímica***

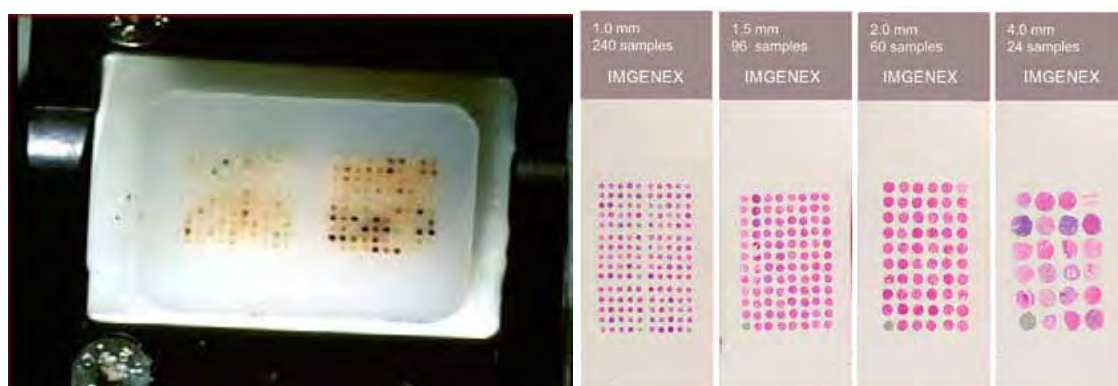
Em agosto de 1986, Batiffora propôs um método novo de microarranjo de tecido (*Multitumor Tissue Block - MTTB*) ou técnica de “salsicha”. O autor desemblocava os fragmentos incluídos em parafina e cortava-os em cilindros com 1mm<sup>2</sup> de área e 2,0 a 3,0cm de comprimento, e os reinclua paralelamente, formando blocos multi-teciduals nos quais diferentes tecidos eram amostrados em pequenos quadrados justapostos. Isso permitia testar até 100 amostras diferentes, com apenas uma pequena alíquota de anticorpo primário, resultando em economia de reagentes e tempo de leitura, além de homogeneizar as reações. O autor também relatou a montagem de MTTB com arranjos temáticos, que poderiam ser usados para controle de qualidade em imuno-histoquímica. Uma limitação deste método era a não identificação de cada amostra com o paciente correspondente.

Outros autores aprimoraram a técnica (Batiffora & Mehta, 1990; Wan et al. 1987) e somente, em 1998, Kononen e colaboradores desenvolveram a base da técnica utilizada atualmente com uso de dispositivo mecânico de base fixa. Consiste de dispositivo cilíndrico semelhante a “*punch*” de biópsia cutânea, em base fixa, com dispositivo para retirada do cilindro e montagem em bloco pré-moldado e vazado, com o *loci* para receber

os cilindros. Este dispositivo facilitou a montagem técnica dos blocos de microarranjos teciduais dispostos em ordem predeterminada no bloco receptor (Figura 3), (em inglês TMA, *Tissue Microarray*), permitindo a coloração de até 600 amostras no mesmo bloco e na mesma lâmina (Figura 4) (Andrade, 2007). Após o desenvolvimento, aprimorou-se a técnica e hoje se utiliza fita adesiva para a retirada dos cortes do micrótomo e transferência dos mesmos para as lâminas, evitando perda de amostras. Posteriormente, outros autores sugeriram mudanças na confecção (Rimm, 2001) e na análise das lâminas (Liu et al., 2005).



**Figura 3** – Esquema da confecção do bloco-mãe e das lâminas de TMA.



**Figura 4** - Bloco e lâminas histológicas utilizando a técnica de *Tissue Microarray*.

O TMA permite analisar, de uma só vez, centenas de amostra de tecidos, tanto em sua expressão molecular como protéica e, é mais comumente utilizado na pesquisa de novos marcadores prognósticos. Nos últimos cinco anos, tem aumentado significativamente o número de artigos científicos que relatam a utilização desta técnica.

Segundo a literatura, esta técnica tem muitas vantagens, como: grande economia de tempo, reagentes, tecidos histológicos e anticorpos; uniformização das reações e facilidade na interpretação comparativa dos casos de uma pesquisa; possibilidade de repetição das reações, inclusive em múltiplos níveis de um mesmo bloco e simplificação na execução de estudos pela utilização do bloco em mais de um experimento (Andrade, 2007; Wan et al., 1987).

## **OBJETIVO**

Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 *in house* para utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento deste trabalho, as etapas subseqüentes foram seguidas:

- ✓ Identificação do melhor clone a ser validado;
- ✓ Expansão clonal e produção de líquido ascítico;
- ✓ Controle da monoclonalidade;
- ✓ Determinação de classe e subclasse de imunoglobulina
- ✓ Purificação por cromatografia de afinidade
- ✓ Técnicas de conjugação com isotiocianato de fluoresceína-FITC
- ✓ Validação do anti-CD45 produzido *in house versus* reagente monoclonal comercializado em citometria de fluxo
- ✓ Validação do anti-CD45 produzido *in house versus* reagente monoclonal comercializado em imuno-histoquímica.

### **Identificação do melhor clone a ser validado**

Utilizaram-se clones desenvolvidos em protocolos prévios do Laboratório de Anticorpos Monoclonais de Botucatu - LAMB e Laboratório de Citometria de Fluxo, ambos da Seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu.

Foram identificados os clones com perfil pan-leucocitário, ou seja, aqueles que apresentavam reação frente às diferentes populações leucocitárias humanas, a saber: clones LINB5, LINB17, LINB19.

### **Expansão clonal e produção de líquido ascítico**

Os clones selecionados foram submetidos à expansão por meio da técnica de ascite. A produção de anticorpos monoclonais por indução de ascite fornece altas concentrações de imunoglobulinas, preserva propriedades moleculares, afinidade e especificidade do anticorpo. As desvantagens estão na necessidade de purificar o material devido à presença de várias proteínas murinas e outros contaminantes, presentes no líquido ascítico, além da necessidade de utilização de animais experimentais.

Foram utilizadas fêmeas de camundongos BALB/c de 2-3 meses de idade. Injetou-se 1mL de óleo mineral puro - Cristália® via intra peritoneal, para causar irritação no peritônio animal. Após 8 a 10 dias, injetou-se via intra peritoneal, 1mL de suspensão celular, obtido do clone de interesse, contendo  $5 \times 10^5$  a  $5 \times 10^6$  células. Após 1 a 2 semanas o líquido ascítico acumulado foi retirado por punção estéril e, procedeu-se com a clarificação deste líquido, através de centrifugação a 12000g, a 4°C por 30 minutos. Foi eliminada a camada de gordura presente na superfície e o sobrenadante foi alíquotado e congelado a -80°C.

### **Controle da monoclonalidade**

O controle da monoclonalidade ocorreu através da técnica de eletroforese em gel de agarose utilizando o corante negro de amido. A determinação da concentração de proteínas totais do AcMm foi realizada pelo método de química seca utilizando o sistema químico *Vitros* – Johnsons & Johnsons® para o AcMm purificado (LINB19) e por análise densitométrica para ambos (LINB5 e LINB19).

### **Determinação de classe e subclasse do AcMm**

A determinação de classe e subclasse das imunoglobulinas secretadas pelos clones foram realizadas através de citometria de fluxo no equipamento FACSCalibur™, com uso do kit *CBA*™ (*Cytometric Bead Array Analysis*) e *Isotype Murine Immunoglobulins* da marca BD® Biosciences, em trabalho prévio desenvolvido por Golim e colaboradores (2008). Amostras de líquido ascítico foram incubadas junto às *beads* (micropartículas de polimetilmetilato) e posteriormente, reveladas com anticorpo secundário marcado com fluorocromo diferente. Os dados foram adquiridos pelo *BD CellQuest Software*™ e analisados automaticamente em *BD CBA Software*™.

## **Purificação de proteínas por imunoafinidade à Proteína-A Sepharose**

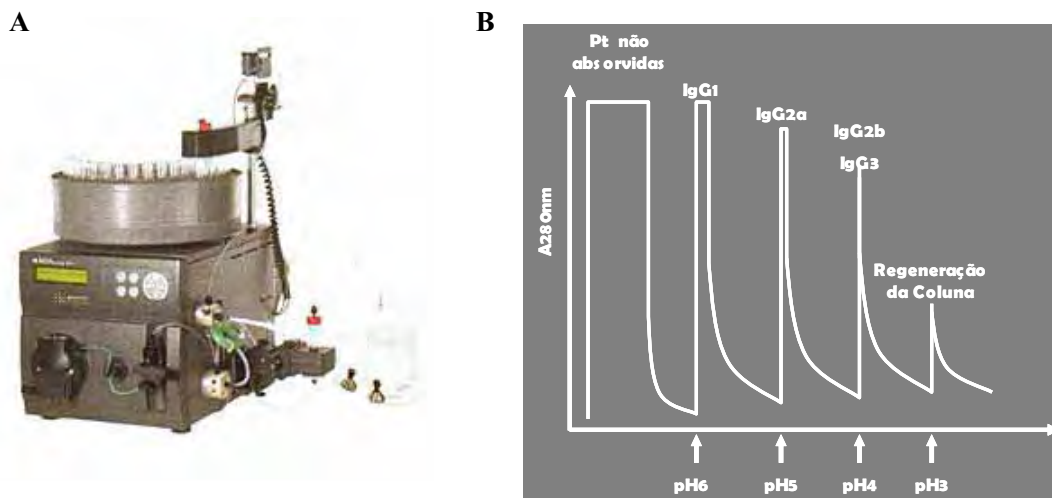
A proteína A é um polipeptídeo de 42000 daltons originalmente isolado de *Staphylococcus aureus*, que tem a propriedade de ligação à fração Fc de IgG com alta afinidade e especificidade (Goding, 1978, Langone, 1982). A sepharose é uma matriz capaz de adsorver proteínas. A proteína A se liga à superfície da sepharose e as imunoglobulinas ligam-se à proteína A.

Utilizou-se 1,5 g de proteína-A Sepharose CL-4B (Pharmacia<sup>®</sup>), segundo Lenz, 1997. Todo volume de líquido ascítico coletado intraperitonealmente dos camundongos BALB/c inoculados com o clone LINB19 foi submetido à purificação em coluna contendo Proteína-A Sepharose. Desta forma, as proteínas não adsorvidas como albumina e outros componentes presentes no líquido ascítico, foram primeiramente eluídas no processo de purificação.

A fração Fc das imunoglobulinas murinas liga-se covalentemente a proteína-A. Esta ligação pode ser revertida através do sistema de gradiente de pH, obtendo-se um produto purificado pela eluição específica da subclasse presente (Roque, 2005).

Essa técnica foi realizada utilizando-se o equipamento AKTA-Prime<sup>™</sup> (GE<sup>®</sup>) (Figura 5 -A), em coluna rHi-Trap Protein-A (GE<sup>®</sup>), sendo o programa caracterizado por gradiente de pH (Figura 5-B). Esse equipamento permite maior rendimento e pureza das imunoglobulinas monoclonais após processo de purificação e minimiza o tempo de procedimento.



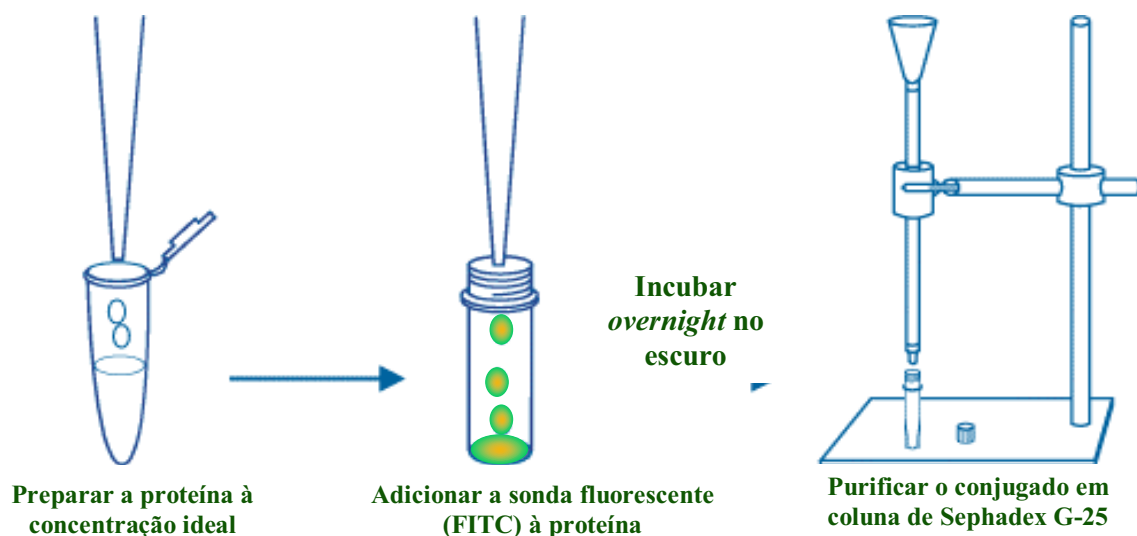


**Figura 5** – A: Equipamento AKTA-Prime™ (GE®) e B: Esquema de eluição das proteínas por gradiente de pH.

### Técnica de conjugação com fluorocromo

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) – Isômero I com celite (Sigma-Aldrich®) foi o fluorocromo de escolha a ser conjugado à proteína (Figura 6), já purificada. O FITC é o marcador fluorescente mais comumente usado para conjugar proteínas via grupo amina. O isômero I é facilmente isolado na forma pura e, quando adsorvido em celite, observa-se um aumento da eficiência de dispersão do FITC em solução de proteína. O preparo seguiu as instruções do fabricante. O FITC liofilizado foi diluído em DMSO (1mg/mL). Foi utilizada a concentração de proteína próxima à concentração mínima para conjugação (2,0mg proteína/mL). A solução de FITC/DMSO foi adicionada à proteína, sendo incubada a 4°C, no escuro por 8 horas.

Após o período da reação de conjugação, foi feita a separação do FITC-celite livre, por decantação. Seguiu-se à eluição do conjugado (AcMm-FITC) em coluna de Sephadex G-25 utilizando tampão PBS pH 7,4. Os tubos eluídos foram preservados para análise à 4°C.



**Figura 6** - Esquema da conjugação do AcMm ao fluorocromo FITC.

#### **Determinação da média molar de fluoresceína/proteína (F/P)**

A taxa molar F/P é definida como a taxa de molécula de FITC por molécula de proteína (conjugado). Realizou-se a determinação da absorbância de todos os tubos (n=6) eluídos da coluna de Sephadex G-25 em 280 e 495nm. Para conjugados Ig – FITC deve-se utilizar a seguinte equação:

$$\text{Molar F/P} = \frac{2,77 \times A_{495}}{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}$$

O ideal é que as taxas médias calculadas estejam entre 0,3 e 1,0, pois taxas muito baixas produzem baixos sinais e taxas muito elevadas produzem alto *background*.

## **Validação do anti-CD45 produzido *in house* versus reagente monoclonal comercializado em citometria de fluxo**

Uma vez que o anti-CD45 produzido *in house* foi adequadamente marcado (LINB19-FITC), a etapa subsequente constituiu-se da validação propriamente dita. Para tal, obtivemos amostras de pacientes e indivíduos saudáveis para estudo comparativo.

Paralelamente, foi avaliado o perfil do clone LINB5. Neste caso, o anticorpo monoclonal produzido foi utilizado sob forma de ascite e revelado com anticorpo secundário (*Goat anti-mouse IgG-FITC* - Molecular Probes<sup>®</sup>)

### **▪ Obtenção das amostras de sangue humano – Casuística**

Foram utilizadas 50 amostras de sangue excedente de doadores para o grupo controle e 48 amostras de sangue de pacientes HIV+, autorizadas através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes.

### **▪ Anticorpo monoclonal murino anti-CD45 humano produzido *in house***

Utilizou-se os AcMm prováveis anti-CD45 (LINB 19 e LINB 5) que são imunoglobulinas dirigidas contra antígenos expressos por leucócitos humanos (pan-leucocitário) produzidos no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

### **▪ Anticorpos monoclonais murinos anti-CD45 humano comerciais**

Para análises em citometria de fluxo, foi utilizado anti-CD45 BD<sup>®</sup> por se tratar de um reagente comercial padronizado na rede DST/aids pelo Ministério da Saúde, conhecidamente estável e específico. Este compreendeu o reagente controle considerado padrão ouro em citometria de fluxo.

Nos testes de imuno-histoquímica, o reagente comercial controle utilizado para estudo comparativo foi o *Monoclonal Mouse Anti-Leukocyte Common Antigen, CD45, (LCA), Clones PD7/26 e 2B11- DakoCorporation™*.

### **Tissue Microarray (TMA) e Imuno-histoquímica**

O uso de dispositivos de base fixa, Beecher™ Instruments, (Figura 7-A) tornou-se o padrão-ouro para a confecção de blocos de TMA nos diversos serviços de pesquisa e diagnóstico ao redor do mundo, portanto essa foi a técnica de escolha.

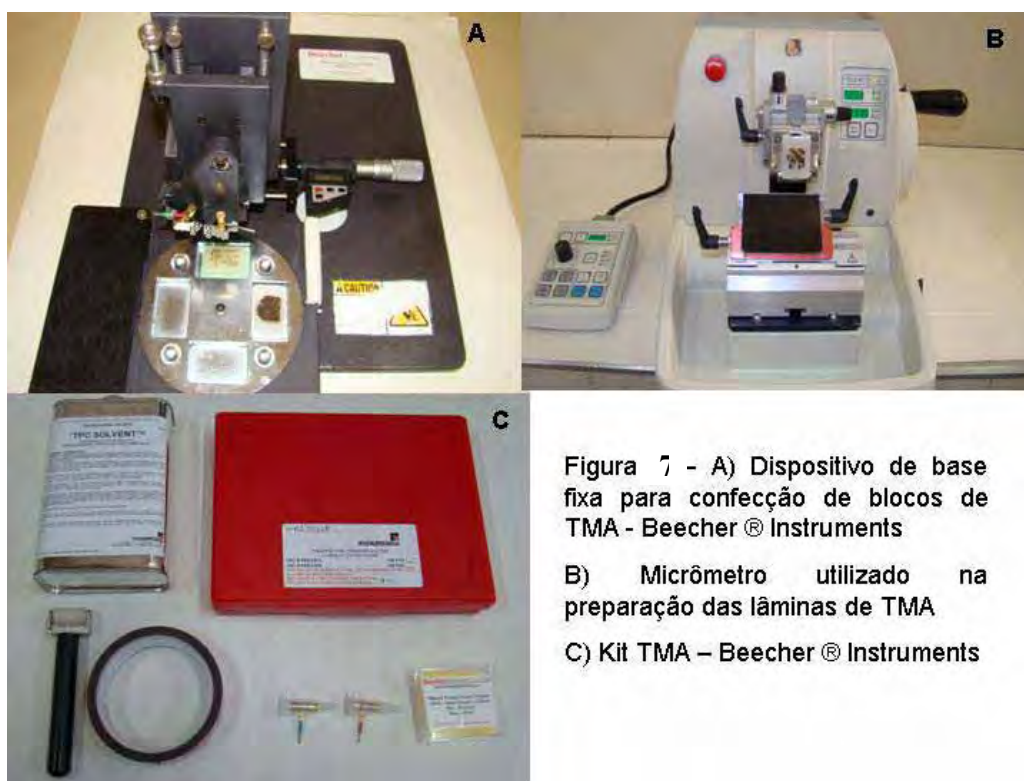


Figura 7 - A) Dispositivo de base fixa para confecção de blocos de TMA - Beecher® Instruments

B) Micrômetro utilizado na preparação das lâminas de TMA

C) Kit TMA – Beecher® Instruments

▪ **Confecção do bloco-mãe de *Tissue Microarray* – TMA**

Iniciou-se essa etapa com a construção da planilha de trabalho onde constam a identificação das amostras nos “core” (Figural 8). As letras em maiúsculo indicam a amostra e os números a quantidade de “core” de cada amostra.

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
0	0	Liver Core	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	F1	F2	F3	
1	1.2	G1	G2	G3	H1	H2	H3	I1	I2	I3	J1	J2	J3	L1	L2	L3	M1	M2	M3	N1	
2	2.4	N2	N3	O1	O2	O3	P1	P2	P3	Q1	Q2	Q3	R1	R2	R3	S1	S2	S3	T1	T2	
3	3.6	T3	U1	U2	U3	V1	V2	V3	W1	W2	W3	Y1	Y2	Y3	Z1	Z2	Z3	Z01	Z02	Z03	
4	4.8	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02
5	6.0	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02	Z03	Z01	Z02
6	7.2	Z01																			
7	8.4																				
8	9.6																				
9	10.8																				
10	12.0																				
11	13.2																				
12	14.4																				
13	15.6																				
14	16.8																				
15	18.0																				
16	19.2																				
17	20.4																				
18	21.6																				
mm	22.8																				
mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
0	0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12.0	13.2	14.4	15.6	16.8	18.0	19.2	20.4	21.6		

Casos Tratados

**Figura 8-** Planilha de trabalho para confecção de bloco-mãe de TMA

Foram analisados 114 fragmentos provenientes de 38 amostras de amígdalas estocadas no Departamento de Patologia – UNESP-Botucatu e, processadas segundo a técnica de *Tissue Microarray* (TMA) no Departamento de Patologia da UNIFESP-EPM.

O material foi incubado com os reagentes anti-CD45 comercial e fabricado *in house* para comparação de desempenho no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia - UNESP-Botucatu.

## **Validação do AcMm**

### **▪ Citometria de Fluxo**

Os testes imunofluorocitométricos com Ig/FITC *house* em amostras de leucócitos humanos foram realizados em paralelo com o uso de AcMm comerciais, na tentativa de constatar a eficiência do mesmo.

#### *Testes com o AcMm conjugado ao FITC (LINB19)*

Foram utilizados 100uL de sangue total. Adicionou-se 40uL do Ig/FITC *house* incubando por trinta minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 450uL de solução de lise (FACSLysing® - BD™) para que as hemácias fossem lisadas. As preparações celulares foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD™) e analisadas no programa CellQuest® (BD™). Paralelamente reações com o anticorpo comercial também foram realizadas conforme instruções do fabricante.

#### *Testes com o AcMm (LINB5) revelado com anticorpo secundário*

Foram utilizados 100uL de sangue total. Adicionou-se 100uL do AcMm (LINB5) previamente diluído na proporção de 1:100 em isoton e incubou-se por uma hora à temperatura ambiente no agitador de células. Procedemos então às etapas de lavagem com isoton e centrifugação a 1300 rpm por dez minutos. Após retirar o sobrenadante, adicionou-se 100uL do *goat anti-mouse* anteriormente diluído na proporção de 1:200. Ao final da incubação de uma hora, no escuro e à temperatura ambiente, acrescentou-se 500uL de solução de lise e centrifugou-se por mais dez minutos à 1300 rpm. Retirou-se novamente o sobrenadante e ressuspendeu-se a amostra em solução de lise finalizando com as análises em citômetro de fluxo.

## ▪ **Imuno-histoquímica**

Para validação do AcMm em imuno-histoquímica procedeu-se o passo de incubação com o AcMm (LINB5) (ascite) obtido *in house* em paralelo com o anticorpo comercial *Monoclonal Mouse Anti-Leukocyte Common Antigen, CD45, (LCA), Clones PD7/26 e 2B11- DakoCorporation™*. Para a etapa de padronização da técnica utilizando diferentes diluições do reagente obtido *in house*, os tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo e preparados em lâminas histológicas de vidro previamente tratadas com poly-d-lysine (aderente). As lâminas foram riscadas com diamante, cercando os cortes histológicos para contenção dos reagentes sobre o tecido e, deixadas em estufa a 56°C *overnight*. Em seguida, as mesmas foram desparafinadas em xilol, passaram por quatro cubas de álcool etílico absoluto e foram lavadas em água corrente. A partir de então, procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena, a recuperação de epítomos pelo calor (microondas), incubação com o anticorpo monoclonal primário anti-CD45 (*in house* e comercial paralelamente) *overnight*. Após essa etapa, incubou-se o material com o anticorpo secundário biotilado e logo após com streptavidina. A revelação foi feita com o cromógeno DAB (diaminobenzidina), a contra-coloração com hematoxilina e a leitura precedida em microscópio óptico. Após a definição da melhor diluição do reagente e adaptações do protocolo, as lâminas de TMA foram então processadas e analisadas.

## **Análise estatística**

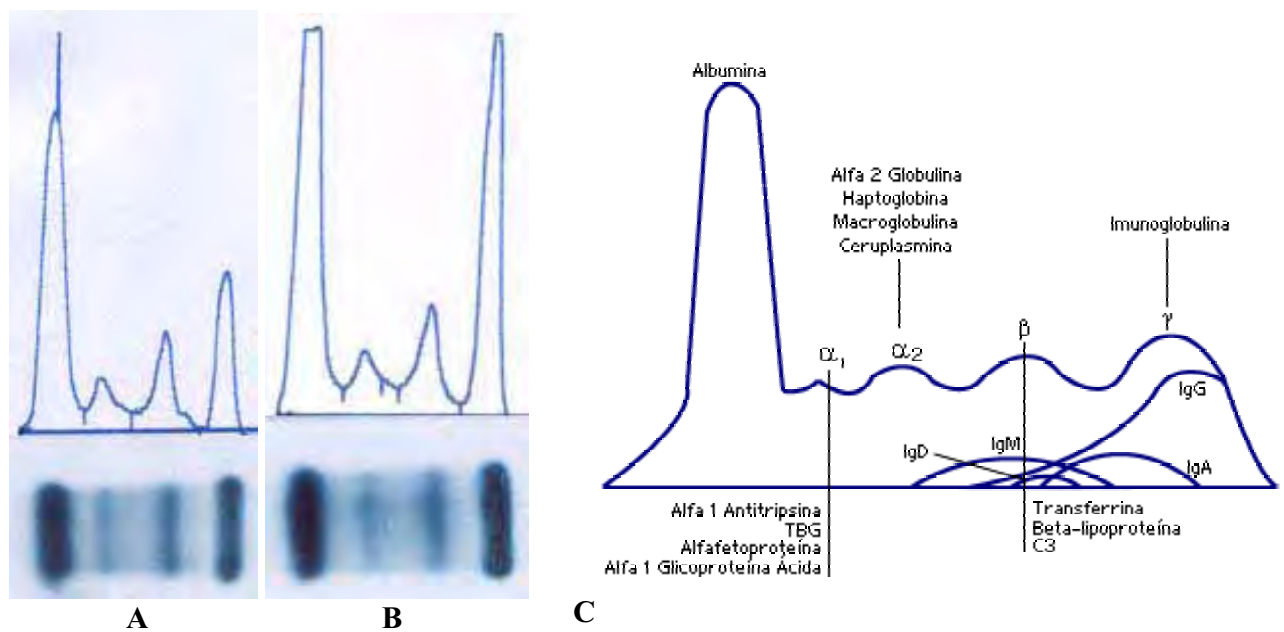
As análises estatísticas (Estatística Descritiva) foram realizadas utilizando o programa *GraphPad InStat* versão 3.01.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do método de produção de líquido ascítico obteve-se em média 5mL de ascite a ser processada por animal. Este material foi analisado em primeira instância para a comprovação da monoclonalidade.

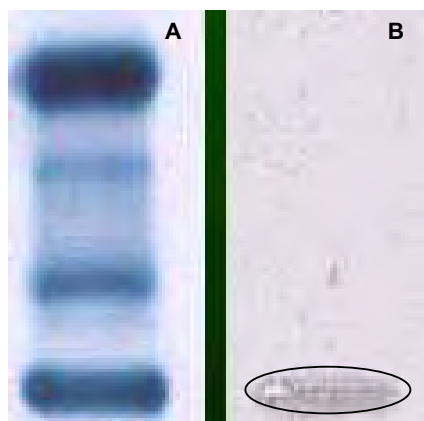
### *Controle da monoclonalidade*

Através da análise de eletroforese em gel de ágar foi possível determinar a presença de banda correspondente à proteína de interesse (Figura 9). Na figura 10 vê-se em A o perfil da corrida com a banda monoclonal e em B a banda monoclonal purificada.



**Figura 9** – **A:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB19 (pré-purificação); **B:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB5. Gel de ágar 1%. Coloração negro de amido; **C:** Distribuição das proteínas plasmáticas.





**Figura 10** – **A:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB 19 (*pré-purificação*); **B:** Eletroforese de líquido ascítico de camundongo Balb/C inoculado com o clone LINB 19 (*pós-purificação*). Gel de ágar 1%. Coloração negro de amido.

A determinação da concentração de proteínas totais do AcMm purificado foi realizada pelo método de química seca utilizando o sistema químico *Vitros* – Johnsons & Johnsons® e totalizou 204mg/dL ou 2,04 mg/mL. Já a análise densitométrica revelou, na etapa pré-purificação, 3,8 g/dL de proteínas totais para o LINB19 e 3,3 g/dL para o LINB5.

#### ***Determinação de classe e subclasse***

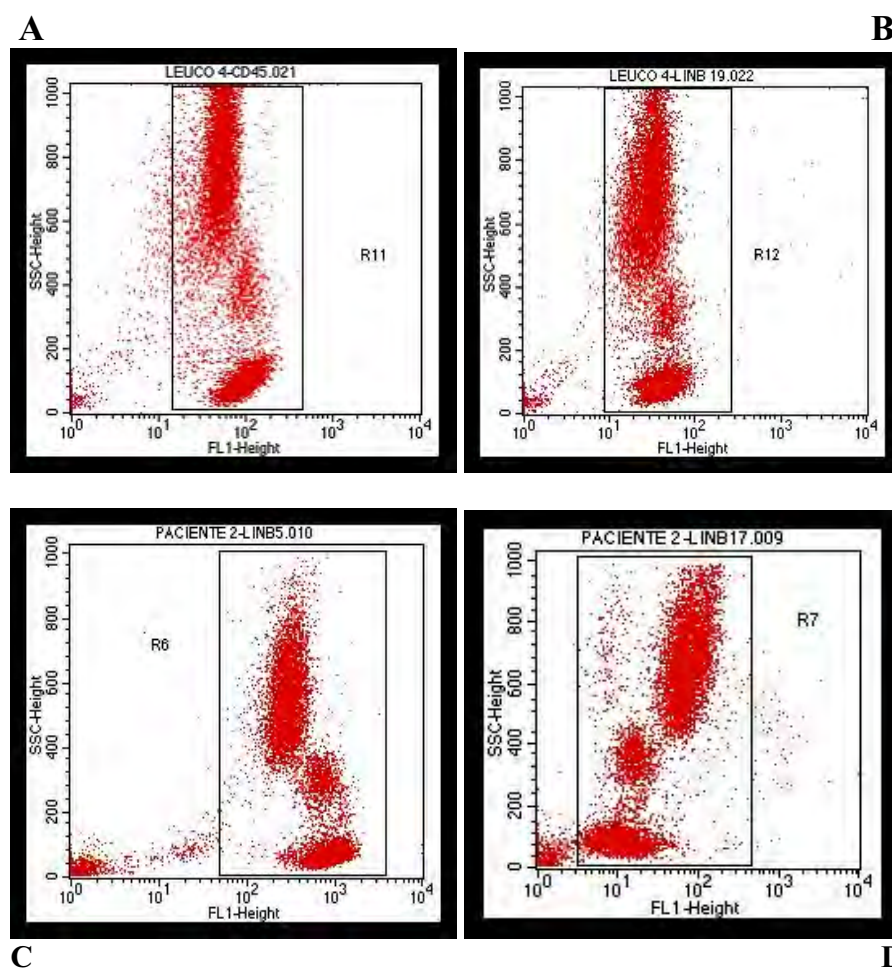
A determinação de classe e subclasse das imunoglobulinas murinas provenientes dos clones LINB19 e LINB5 com o uso do kit CBA® (Cytometric Bead Array Analysis) Isotype Murine Immunoglobulin BD® evidenciou que ambas pertencem a subclasse IgG<sub>1</sub>.

#### ***Determinação da média molar de fluoresceína/proteína (F/P)***

Após a conjugação de FITC ao AcMm (LIMB19) e purificação do conjugado (IgG1/FITC *house*) em coluna de Sephadex G-25 determinou-se a absorvância dos eluatos em espectrofotômetro (leituras em 280nm e 495nm). Dois tubos apresentaram taxas F/P aceitáveis: **tubo 1:** 1,95 (acima do ideal) e **tubo 2:** 0,34 (dentro do esperado).

*Validação do anti-CD45 produzido in house versus reagente monoclonal comercializado em citometria de fluxo*

Foram testados três clones que apresentaram perfil pan-leucocitário em estudos prévios: LINB5, LINB17 e LINB19 (Figura 11).



**Figura 11** – Reconhecimento das populações celulares – A: reagente anti-CD45 comercial, B: LINB19, C: LINB5 e D: LINB17

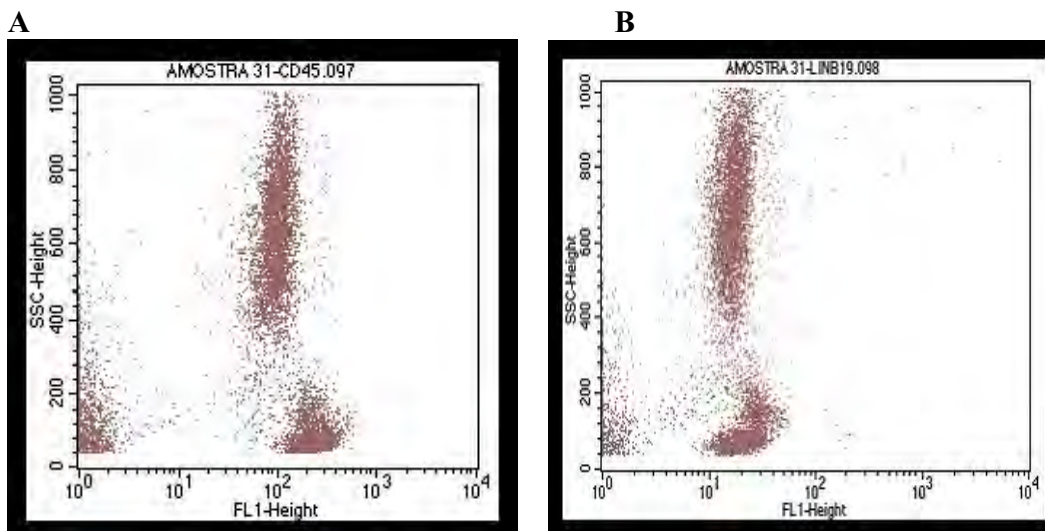
Os clones LINB5 e LINB19 apresentaram similaridade ao CD45 comercial no reconhecimento das populações celulares. Nessa etapa, descartou-se o LINB17 por não apresentar resultados superponíveis ao anti-CD45 comercial.

Após essa etapa partimos para a padronização do volume de conjugado (LINB19-FITC) a ser utilizado e, frente aos dados estatísticos obtidos (Tabela 1) utilizamos nos testes subsequentes o conjugado eluído no tubo 2 em processo de purificação, no volume de 40ul.

**Tabela 1 – Resultados estatísticos da padronização do volume de AcMm-FITC ideal**

	Porcentagem de células marcadas				
	Ac 1 -30uL	Ac 1 – 40uL	Ac 2 – 30uL	Ac 2- 40uL	Controle
<b>Nº amostras</b>	5	5	5	5	5
<b>Média</b>	80,63	70,15	47,88	78,01	86,46
<b>Desvio-padrão</b>	9,06	23,33	33,04	13,75	10,17
<b>Valor mínimo</b>	70,94	42,65	8,14	60,57	70,52
<b>Valor máximo</b>	91,79	88,76	85,56	91,25	95,38
<b>Mediana</b>	78,91	84,77	37,11	83,58	90,06

Ao finalizarmos os testes do AcMm (LINB19-FITC) no grupo de pacientes e doadores observamos que o mesmo reconhecia de fato as populações celulares padrão (Figura 12) porém, as análises estatísticas evidenciaram que haviam incongruências nos valores de porcentagem de células marcadas (Tabela 2) e média de intensidade de fluorescência dos reagentes comparados (Tabela 3).



**Figura 12-** Reconhecimento das populações celulares – **A:** Anti-CD45 comercial; **B:** LINB19-FITC

**Tabela 2** – Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (porcentagem de células marcadas) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB 19-FITC) – grupo pacientes.

Porcentagem de células marcadas		
	<b>CD45</b>	<b>LINB19</b>
<b>Nº amostras</b>	48	48
<b>Média</b>	85,82	70,44
<b>Desvio-padrão</b>	13,59	14,78
<b>Valor mínimo</b>	36,15	15,17
<b>Valor máximo</b>	99,60	93,11
<b>Mediana</b>	92,60	73,32

**Tabela 3** – Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (média da intensidade de fluorescência- MIF) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB 19-FITC) – grupo pacientes

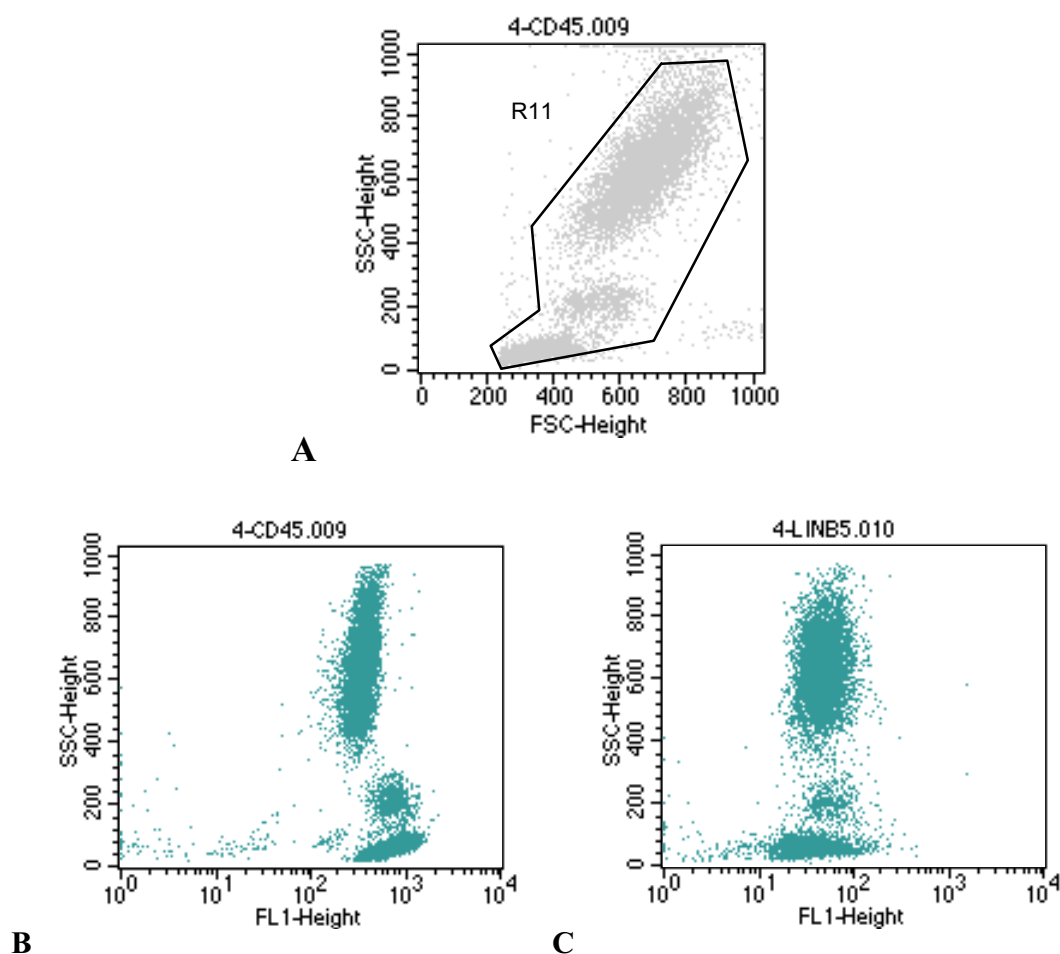
Média da Intensidade de fluorescência - MIF		
	<b>CD45</b>	<b>LINB19</b>
<b>Nº amostras</b>	48	48
<b>Média</b>	206,77	26,14
<b>Desvio-padrão</b>	66,99	8,30
<b>Valor mínimo</b>	95,30	14,87
<b>Valor máximo</b>	323,66	40,14
<b>Mediana</b>	200,27	23,14

Os dados estatísticos demonstram que os reagentes comparados apresentaram diferenças extremamente significativas sendo que o anti-CD45 BD® apresentou-se superior ao provável anti-CD45 obtido *in house* (clone LINB19 - marcado com FITC).

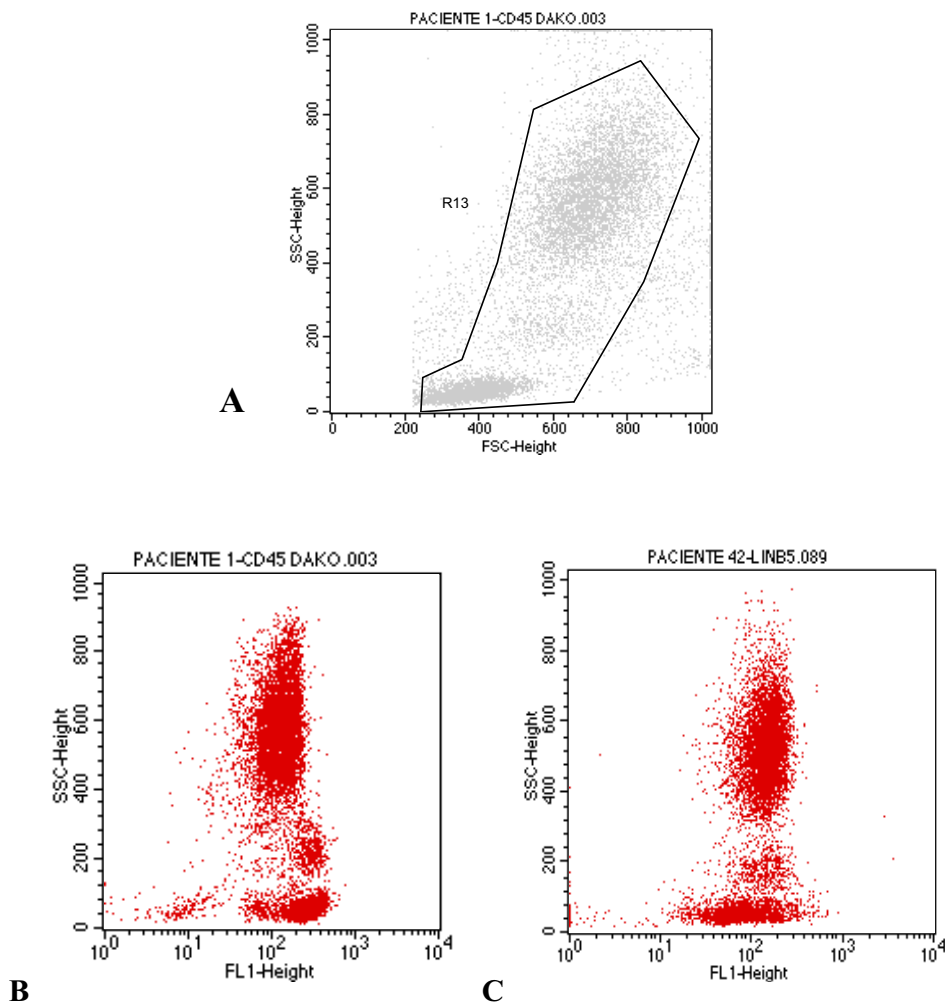
Acredita-se que a concentração da proteína purificada (2,0mg/mL) alcançada após diálise, que encontrava-se na concentração mínima exigida pelo fabricante para conjugação ao FITC, pode ter interferido no desempenho do reagente obtido *in house*. Esta hipótese é fortalecida por resultados obtidos por Golim e colaboradores (2007), que em processos de

conjugação de imunoglobulinas a fluorocromos observaram melhores conjugados oriundos de maiores concentrações de proteínas, sendo ideal a concentração de 5,5mg/dL.

Frente aos resultados com o LINB19-FITC, decidiu-se fazer novos testes utilizando o LINB5, pelo método de marcação indireta, com *goat anti-mouse IgG- FITC conjugate* - Invitrogen™ como anticorpo secundário (Figuras 13 e 14).



**Figura 13** – **A:** *gate* na população celular de interesse, **B:** padrão de reconhecimento celular – reagente comercial, **C:** padrão de reconhecimento celular – reagente obtido *in house* (LINB5) – grupo doadores.



**Figura 14** – **A:** *gate* na população celular de interesse, **B:** padrão de reconhecimento celular – reagente comercial, **C:** padrão de reconhecimento celular – reagente obtido *in house* (LINB5) – grupo pacientes.

Observa-se nas figuras 13 e 14 que os reagentes testados apresentaram padrão similar no reconhecimento das populações celulares tanto no grupo de doadores quanto no grupo de pacientes. No entanto, há um deslocamento celular à direita (FL1) no *dot blot* referente ao reagente comercial (Figura 13- B) em comparação com o obtido *in house*, indicando maior intensidade de fluorescência deste.

**Tabela 4** – Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (porcentagem de células marcadas) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo pacientes.

Porcentagem de células marcadas		
	<b>CD45</b>	<b>LINB5</b>
<b>Nº amostras</b>	46	46
<b>Média</b>	95,87	93,54
<b>Desvio-padrão</b>	2,56	8,01
<b>Valor mínimo</b>	88,99	55,98
<b>Valor máximo</b>	99,22	99,32
<b>Mediana</b>	96,14	95,82

**Tabela 5** – Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (média da intensidade de fluorescência- MIF) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo pacientes

Média da Intensidade de fluorescência - MIF		
	<b>CD45</b>	<b>LINB5</b>
<b>Nº amostras</b>	46	46
<b>Média</b>	136,55	65,56
<b>Desvio-padrão</b>	23,67	26,98
<b>Valor mínimo</b>	94,03	31,75
<b>Valor máximo</b>	190,30	58,94
<b>Mediana</b>	130,50	58,94

Nas tabelas 4 e 6, destacam-se os valores próximos de média e mediana da porcentagem de células marcadas entre os dois reagentes para os grupos de pacientes e doadores respectivamente. No entanto, as tabelas 5 e 7 demonstram a não similaridade quanto à intensidade de fluorescência para os mesmos grupos.

**Tabela 6** – Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (porcentagem de células marcadas) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo doadores.

Porcentagem de células marcadas – grupo doadores		
	<b>CD45</b>	<b>LINB5</b>
<b>Nº amostras</b>	50	50
<b>Média</b>	97,47	97,40
<b>Desvio-padrão</b>	3,44	2,57
<b>Valor mínimo</b>	82,45	86,04
<b>Valor máximo</b>	99,87	99,71
<b>Mediana</b>	98,48	98,06

**Tabela 7** – Medidas descritivas dos testes imunofluorocitométricos (média da intensidade de fluorescência- MIF) utilizando anti-CD45 BD® e provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) – grupo doadores.

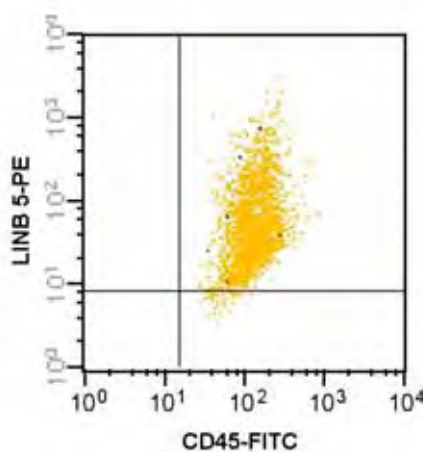
Média da Intensidade de fluorescência – MIF – grupo doadores		
	<b>CD45</b>	<b>LINB5</b>
<b>Nº amostras</b>	50	50
<b>Média</b>	701,26	135,09
<b>Desvio-padrão</b>	181,15	79,33
<b>Valor mínimo</b>	145,21	10,07
<b>Valor máximo</b>	1010,10	319,61
<b>Mediana</b>	760,06	115,56



Os reagentes comparados não apresentaram diferenças significativas em relação à porcentagem de células marcadas. Portanto nesse parâmetro, os reagentes anti-CD45 BD® e o provável anti-CD45 obtido *in house* (LINB5) mostraram-se superponíveis.

Segundo o parâmetro média de intensidade de fluorescência – MIF, os reagentes apresentaram diferenças extremamente significativas. As possíveis causas para esse fato podem estar relacionados ao diferente reconhecimento de epítomos e/ou à diferença de concentração entre os reagentes testados, o que não foi possível comparar pois, o fabricante do reagente comercial não informa o valor da concentração final.

Realizou-se a avaliação da co-expressão dos marcadores utilizados (comercial e *in house*) e os resultados obtidos corroboram a idéia de reconhecimento de epítomos diferentes por parte dos reagentes testados, pois nestes testes não houve competição de sítios antigênicos (Figura 15).

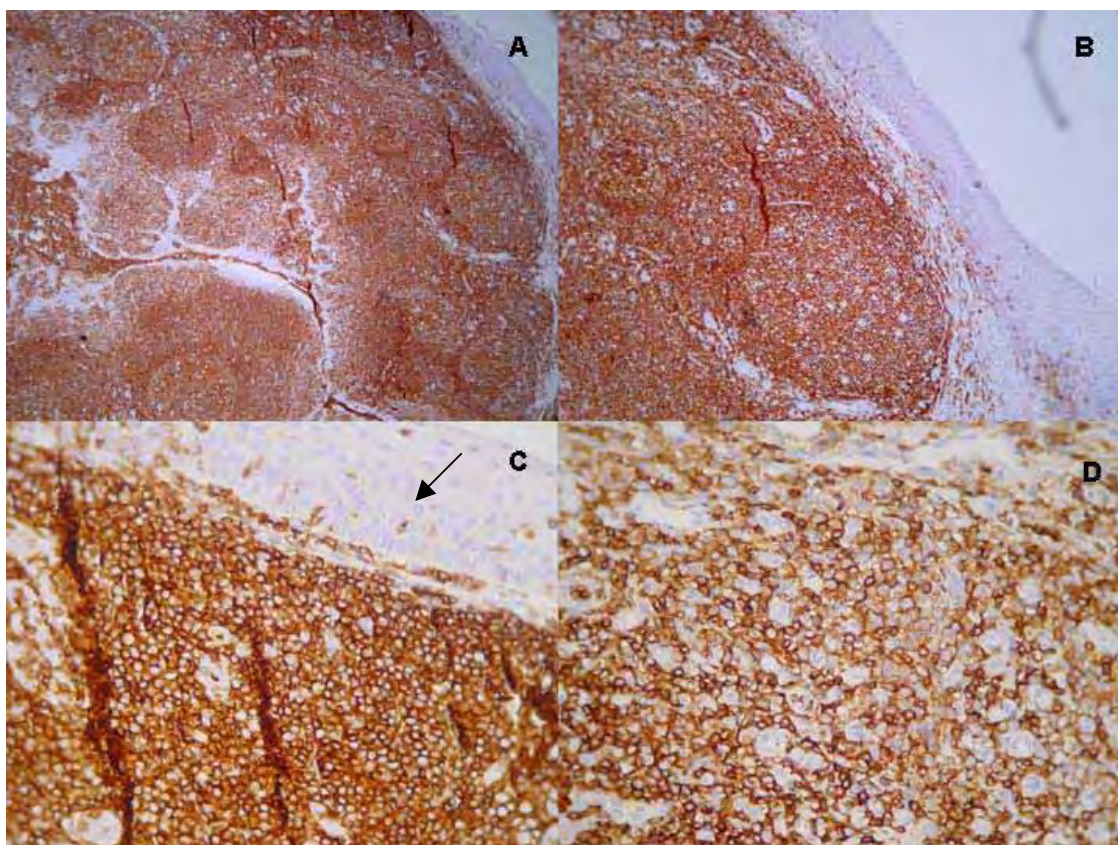


**Figura 15** – Positividade de co-expressão do anti-CD45 comercial com o AcMm obtido *in house* (LINB5).

## *Tissue Microarray e Imuno-histoquímica*

### **Testes de diluição do anti-CD45 obtido *in house***

Para proceder à validação do anti-CD45 obtido *in house* em imuno-histoquímica (IH) utilizamos lâminas padrão com cortes de amígdala, tecido muito utilizado como controle positivo em reações de IH. Foram testadas as seguintes diluições: 1:100 (Figura 17- A-C), 1:200 (Figura 18- A e B), 1:400 (Figura 18- C e D), 1:800 (Figura 19- A e B), 1:1000 (Figura 19- C e D), 1:3000 (Figura 20- A e B), 1:5000 (Figura 20- C e D), e 1:10000 (Figura 21- A-D). Utilizamos para comparação o anticorpo comercial Dako™ na diluição padrão de 1:250 (Figura 16 – A-D).



**Figura 16** - Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 comercial. **A** - aumento de 5x, **B** - aumento de 10x, **C** - aumento de 40 x evidenciando células escamosas que funcionaram como controle negativo (seta), **D**- aumento de 40 x.

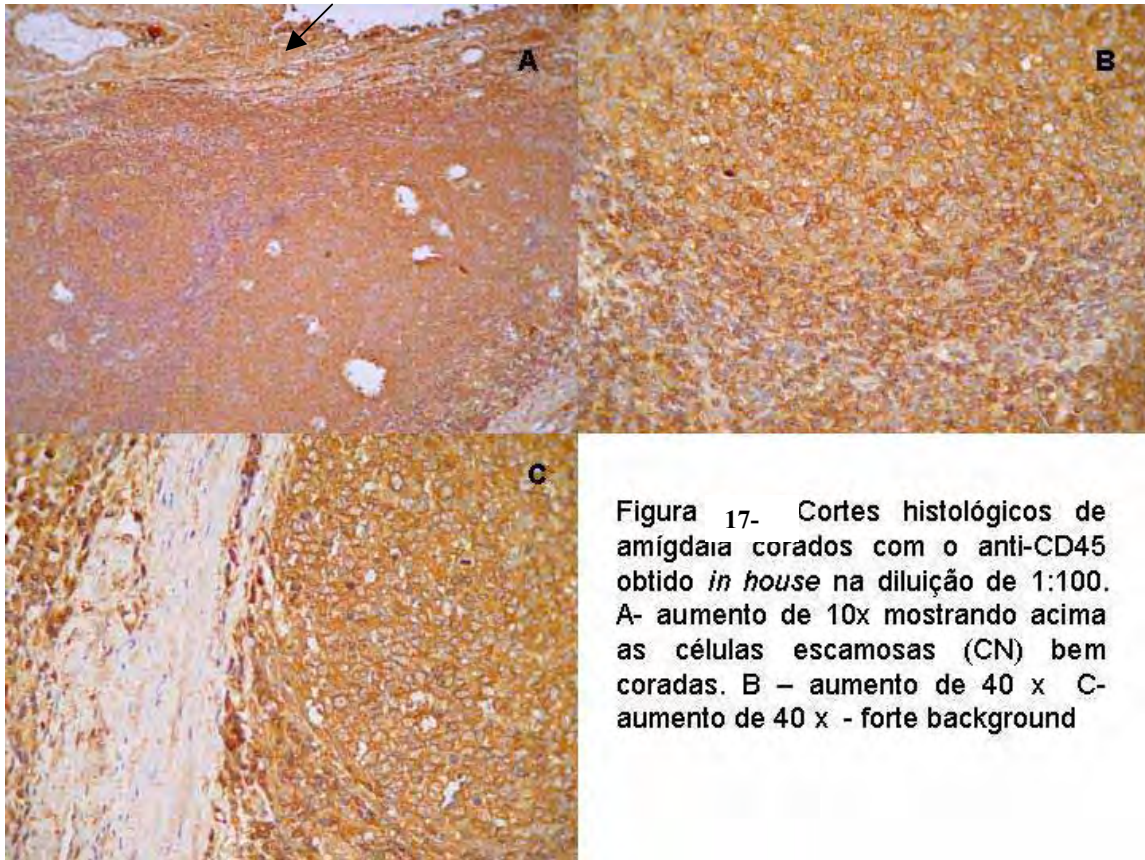
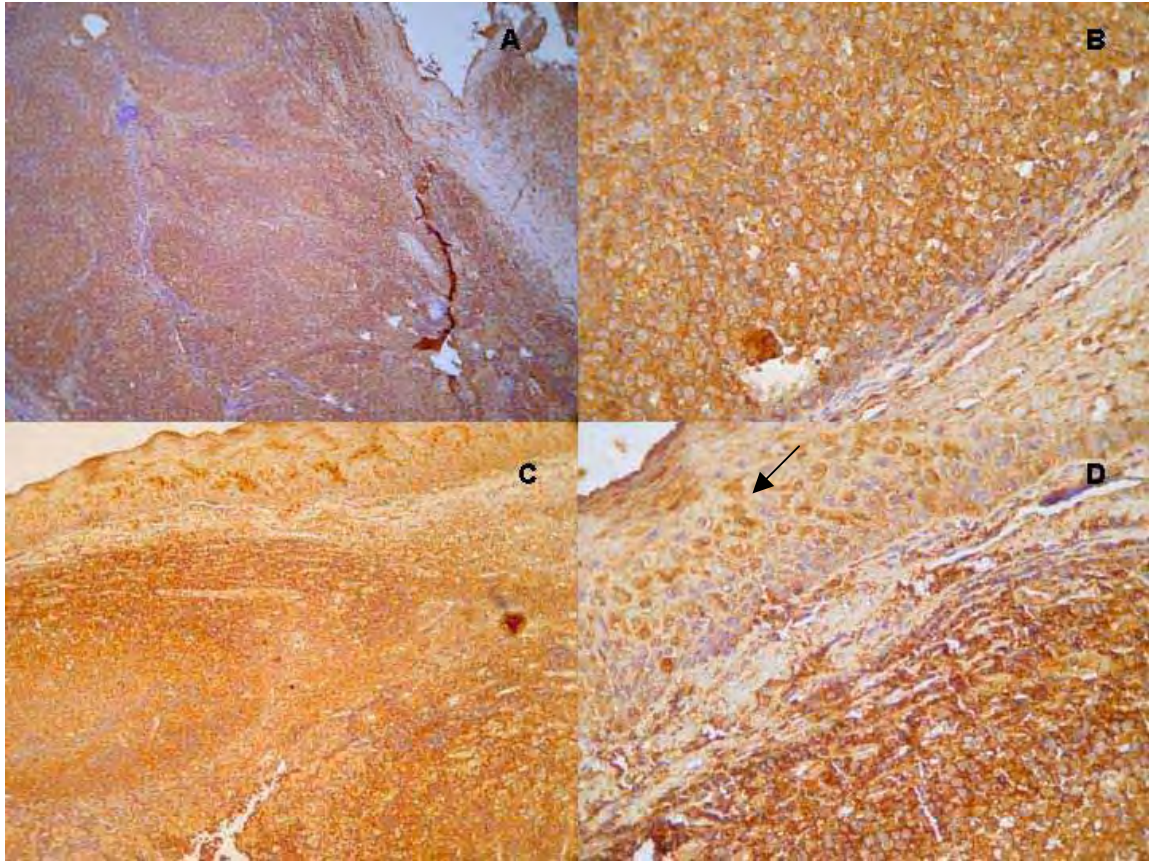
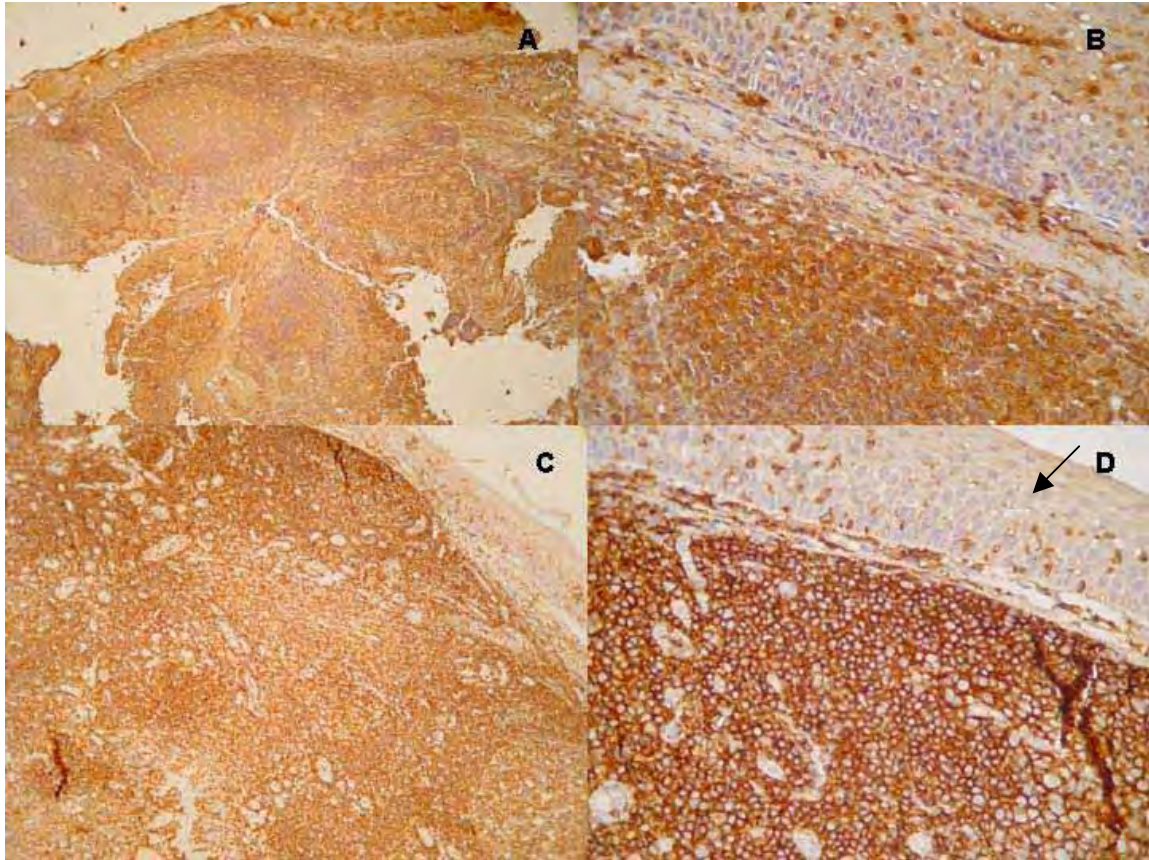


Figura 17- Cortes histológicos de amígdala corados com o anti-CD45 obtido *in house* na diluição de 1:100. A- aumento de 10x mostrando acima as células escamosas (CN) bem coradas. B – aumento de 40 x C- aumento de 40 x - forte background

As figuras 17 e 18 apresentam os resultados obtidos com as menores diluições do AcMm obtido *in house*. Observa-se alto *background* e coloração inespecífica nas células que funcionam como controle negativo da reação (Figuras 17-A e 18-D, setas: células escamosas, epitélio, estroma). Esse fato está relacionado à grande concentração do AcMm obtido *in house* utilizado na reação.

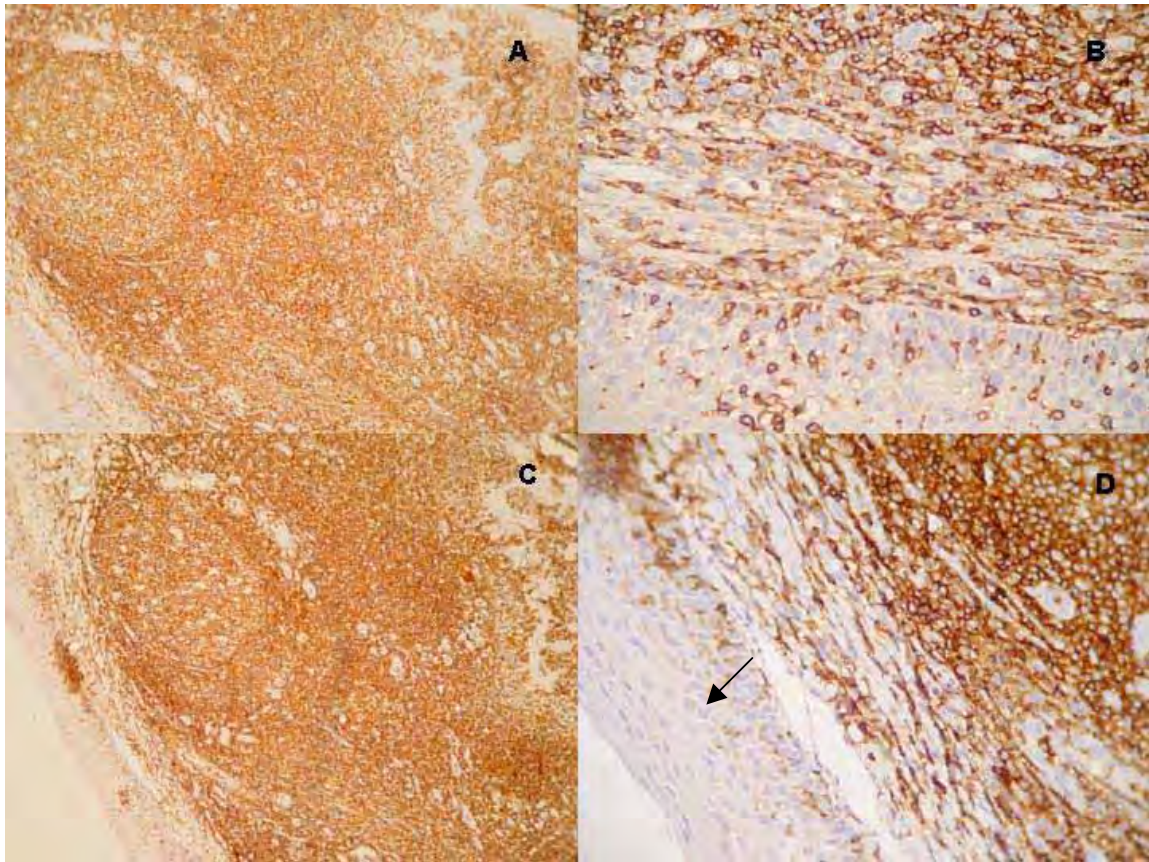


**Figura 18** - Cortes histológicas de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:200 - aumento de 10x, **B** – Diluição 1:200 - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:400 - aumento de 10 x evidenciando o material com bastante background, **D** – Diluição de 1:400 - aumento de 40 x.



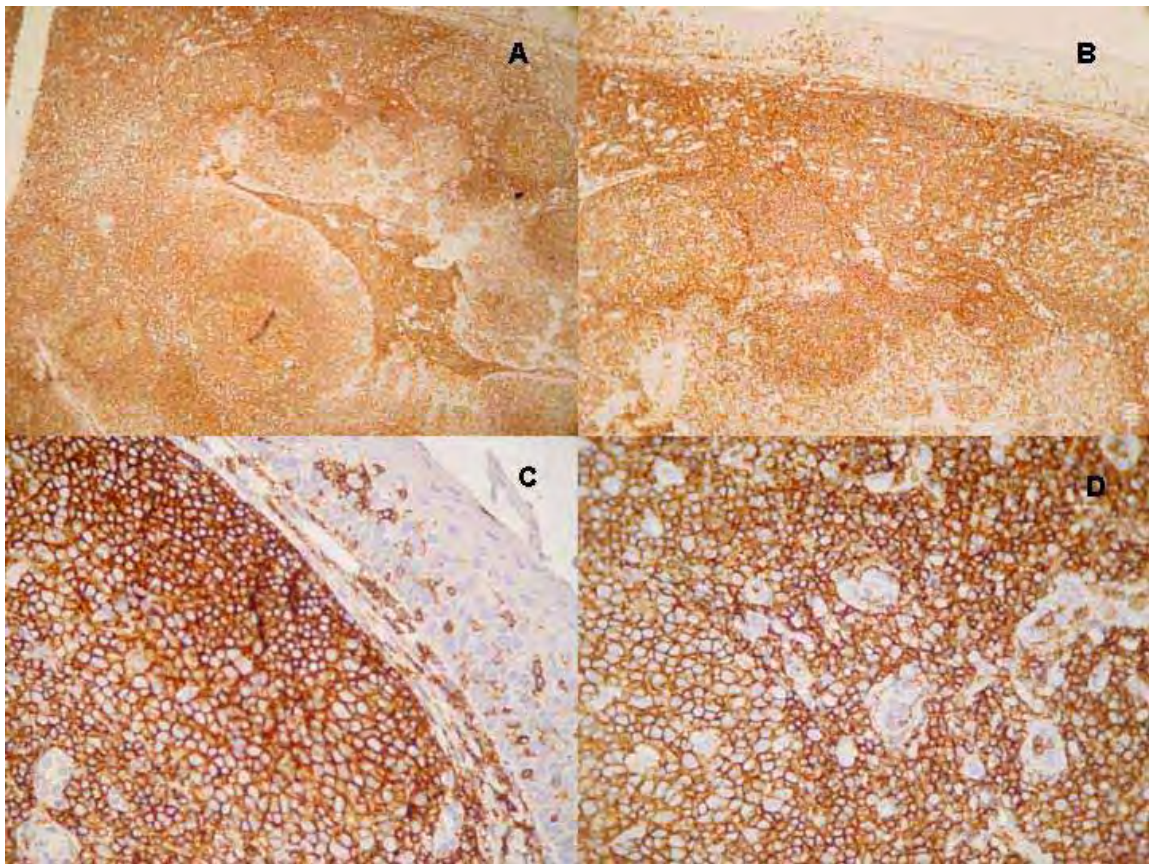
**Figura 19** - Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:800 - aumento de 10x, **B** – Diluição 1:800 - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:1000 - aumento de 10 x , **D** – Diluição de 1:1000 - aumento de 40 x.

A figura 19 demonstra ainda uma leve coloração inespecífica (Figura 19-D- seta), devido à alta concentração do reagente, que tende a diminuir à medida que aumenta-se a diluição do mesmo.

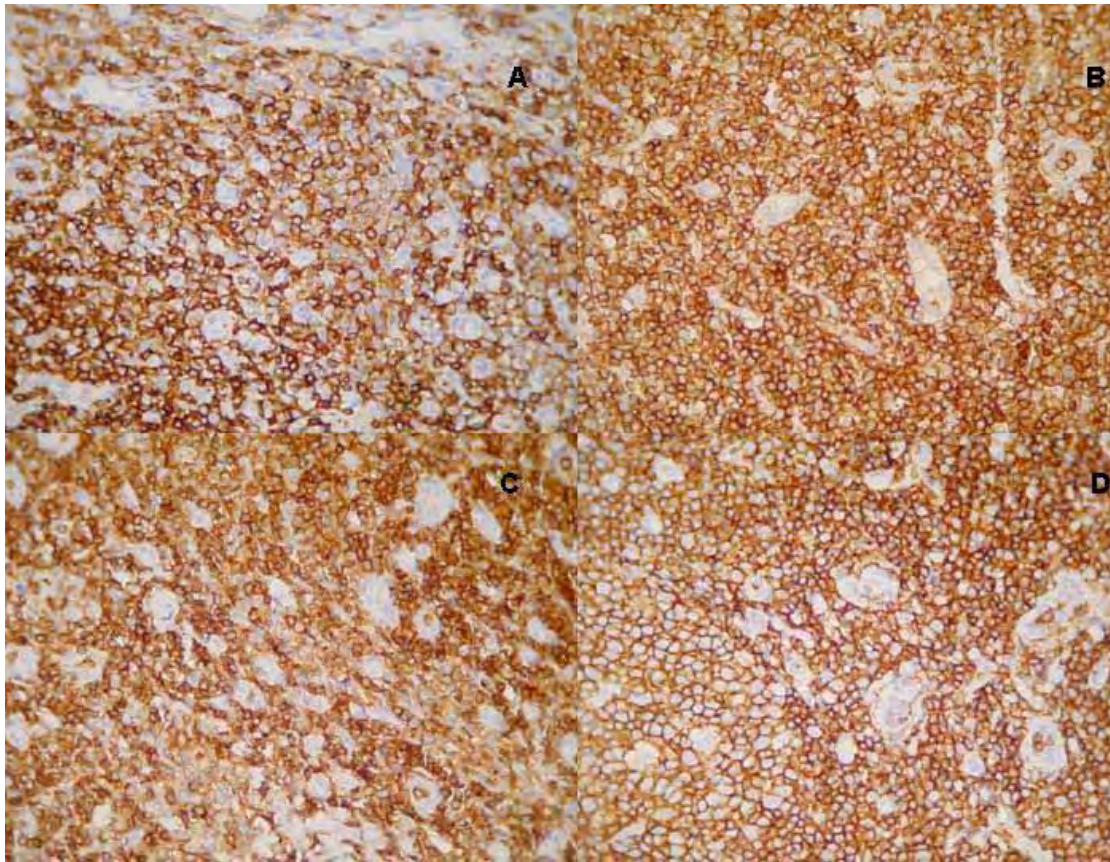


**Figura 20** - Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:3000 - aumento de 10x, **B** – Diluição 1:3000 - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:5000 - aumento de 10 x, **D** – Diluição de 1:5000 - aumento de 40 x.

Na diluição de 1:3000 e 1:5000 obteve-se resultados similares aos encontrados com o reagente comercial. Observam-se, na figura 20-D, as células do epitélio negativas (seta) e a marcação dos linfócitos.



**Figura 21** - Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45 obtido *in house*. **A** – Diluição 1:10000 - aumento de 5x, **B** – Diluição 1:10000 - aumento de 10x, **C** – Diluição de 1:10000 - aumento de 40 x , **D** – Diluição de 1:10000 - aumento de 40 x.



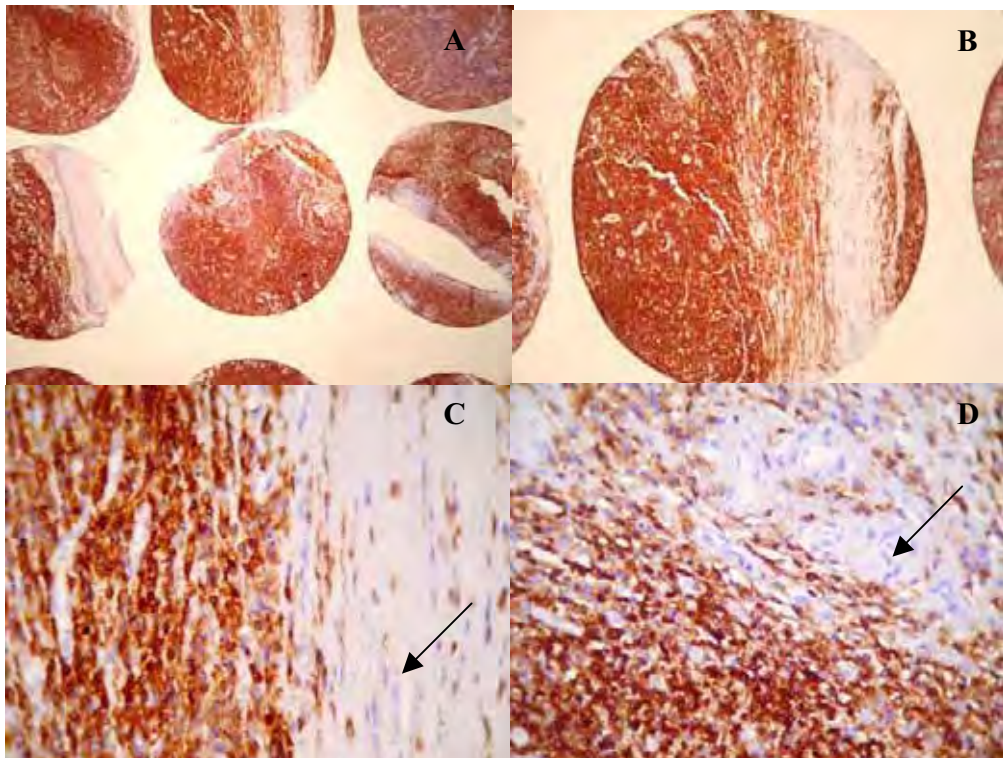
**Figura 22** - Cortes histológicos de amígdala corados com anticorpo anti-CD45. **A** – Diluição 1:250 anticorpo comercial - aumento de 40x, **B** – Diluição 1:3000 anticorpo obtido *in house* - aumento de 40x, **C** – Diluição de 1:5000 anticorpo obtido *in house* - aumento de 40 x, **D** – Diluição de 1:10000 anticorpo obtido *in house* - aumento de 40 x.

Observou-se que a partir da diluição 1:3000 do AcMm (LINB5) obtido *in house* (Figura 22- B), obtivemos resultados semelhantes aos das amostras coradas com o reagente comercial Dako™ 1:250 (Figura 22- A). A melhor diluição, porém foi a de 1:10000 (Figuras 21-A-D e 22-D). Esses resultados apontam para a minimização de custos, pois além destes monoclonais serem obtidos nacionalmente, foi observada excelente performance sob altas diluições, portanto, apresentando maior rendimento, especialmente quando comparado ao reagente comercial testado.



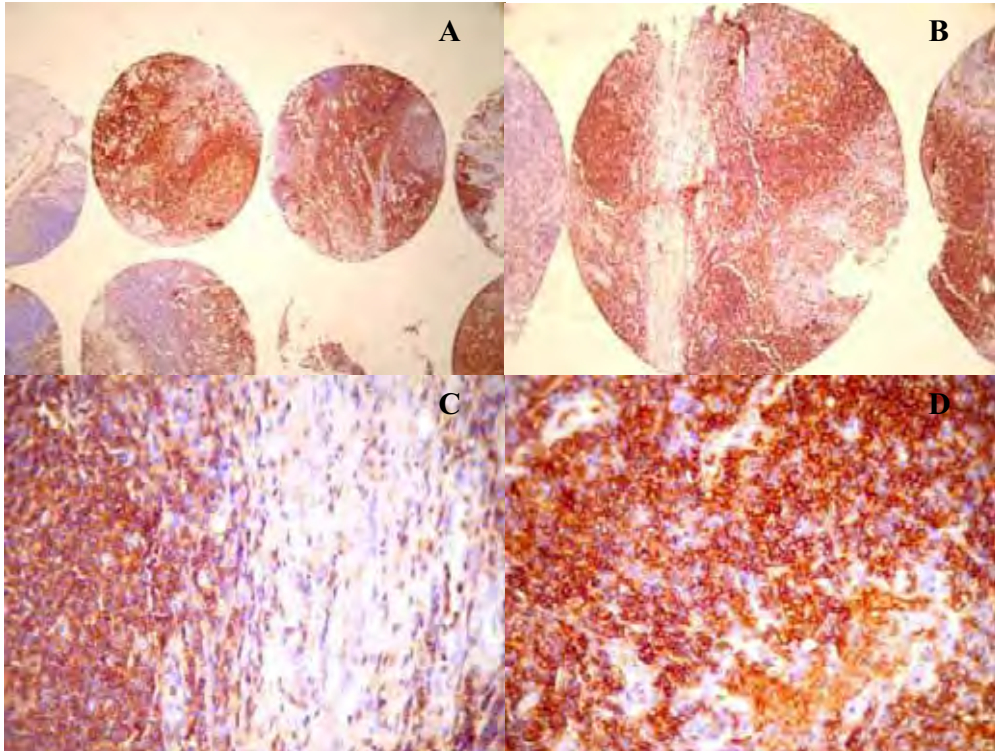
### Validação do anti-CD45 obtido *in house* em TMA

Procedeu-se a validação do AcMm (LINB5) nas lâminas de TMA utilizando o reagente Dako™, como controle positivo, na diluição 1:250 e, padronizando-se a recuperação antigênica com o uso de forno microondas.



**Figura 23** – Lâmina de Tissue Microarray corada com anticorpo anti-CD45 comercial. **A** – aumento de 5x, **B** - aumento de 10x, **C** – aumento de 40x, **D**: aumento de 40x.

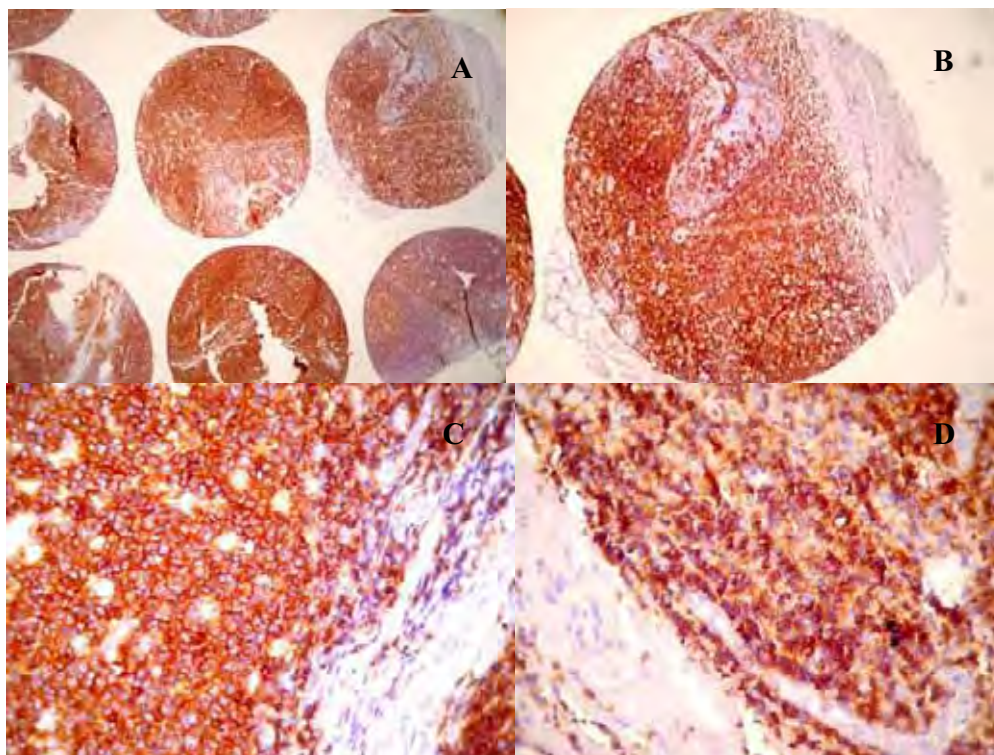
Observa-se na figura acima (Figura 23 – A-D) que o tecido apresenta-se plenamente corado a não ser pelas células escamosas (setas: Figura 23- C-D) que funcionaram como controle negativo da reação.



**Figura 24** – Lâmina de Tissue Microarray corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:5000 . **A** – aumento de 5x, **B** - aumento de 10x, **C** – aumento de 40x, **D**: aumento de 40x.

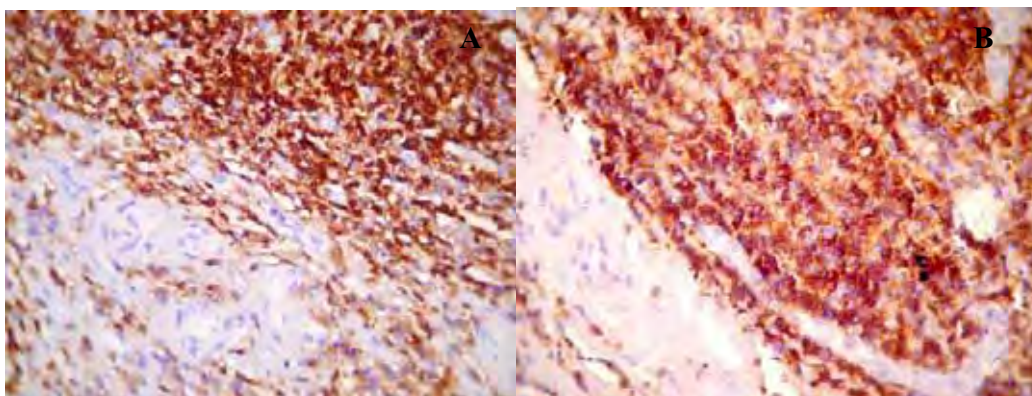
Nos resultados obtidos tanto na diluição 1:5000 (Figura 24- A-D) quanto na diluição 1:10000 (Figura 25 – A-D), o AcMm (LINB5) *in house* apresentou-se superponível ao AcMm comercial.

Com base no alto rendimento, esses dados apontam a possibilidade da utilização do AcMm obtido *in house*, oriundo de sobrenadante de cultura, para essa finalidade, excluindo a necessidade de uso de animais para produção de líquido ascítico.



**Figura 25** – Lâmina de Tissue Microarray corada com AcMm (LINB5)-Diluição 1:10000 . **A** – aumento de 5x, **B** - aumento de 10x, **C** – aumento de 40x, **D**: aumento de 40x.

Na figura 26 A-B observa-se que o padrão de reconhecimento celular é semelhante entre os reagentes testados, não ocorrendo marcação inespecífica por parte do AcMm obtido *in house*, visto que as células escamosas do estroma e as células epiteliais presentes (controle negativo da reação) não apresentaram positividade. O tecido hepático encontrado na lâmina de TMA, utilizado como iniciador, apresentou-se negativo na reação de imunohistoquímica com ambos os reagentes, apesar de encontrarem-se linfócitos positivos próximos ao espaço porta-hepático, o que corrobora a questão da especificidade e sensibilidade do reagente.



**Figura 26** – Lâmina de Tissue Microarray. **A** – corada com anticorpo anti-CD45 comercial - aumento de 40x, **B** - corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:10000 - aumento de 40x.

Dos 114 fragmentos presentes na lâmina de TMA 12 fragmentos não apresentaram positividade na reação de imuno-histoquímica. Destes, 6 fragmentos encontram-se na região periférica da lâmina (bordas) que, segundo referência de serviços que utilizam TMA, podem ter sido prejudicados pela cola da fita adesiva utilizada na confecção das lâminas. Os outros 6 fragmentos considerados negativos inadequadamente, apresentaram mesma relação frente aos reagentes comercial e *in house*, o que nos faz supor que trata-se de problemas referentes às condições de fixação das amostras (tempo de fixação, solução de formol usada) ou ainda à forma de recuperação antigênica utilizando microondas que não tenha sido tão agressiva a ponto de expor os epítomos adequadamente.

Testaram-se então as lâminas de TMA procedendo à recuperação antigênica através da panela de Pascal (Figura 27), que trabalha com altas temperatura e pressão e, observou-se que houve coloração intensa dos fragmentos anteriormente não corados e que as concentrações do AcMm *in house* padronizadas anteriormente utilizando-se microondas não são coincidentes, apontando a necessidade de maior diluição do reagente. Portanto, é necessária a padronização do reagente obtido *in house* considerando a forma de recuperação antigênica utilizada na reação (panela de Pascal, microondas ou banho-maria).



**Figura 27** – Lâmina de Tissue Microarray processada segundo protocolo de recuperação antigênica em panela de Pascal. **A** – corada com anticorpo anti-CD45 comercial - aumento de 5x, **B** - corada com AcMm (LINB5)- Diluição 1:10000 - aumento de 5x.

A validação de reagentes em imuno-histoquímica utilizando-se a técnica de TMA é interessante uma vez que permite, numa reação homogênea, verificar se todos os fragmentos foram corados, com que intensidade, revelando possíveis diferenças segundo o padrão de fixação e inclusão de cada amostra. Observou-se que o AcMm *in house* foi capaz de garantir o mesmo padrão de coloração dos tecidos amostrados quando comparados com o reagente comercial frente a essas diferenças.

A técnica de *Tissue Microarray* – TMA tem como fator limitante, o alto custo de implantação e manutenção. Além disso, outro problema é a perda por descolamento, das amostras de tecidos dos cilindros, durante a confecção dos cortes histológicos ou durante o processamento histológico ou imuno-histoquímico. A fim de minimizar esse problema, foi introduzido o uso de fita adesiva e lâminas silanizadas. Atualmente, o uso da fita adesiva em associação ao uso de lâminas especialmente preparadas, soluções solventes e lâmpadas ultravioletas está amplamente difundido (Henshall, 2003; Kallioniemi, 2001; Moch et al., 2001), porém ainda tivemos alguma perda de material durante o processamento o que não impossibilitou a leitura e comparação das amostras.

## CONCLUSÕES

Os dois clones avaliados, LINB5 e LINB19, com atividade pan-leucocitária (anti-CD45) apresentam boa reatividade em citometria de fluxo, no entanto seu desempenho não foi comparável, nas concentrações estudadas, ao anticorpo comercial, principalmente no parâmetro intensidade de fluorescência.

O clone LINB5 apresentou desempenho superponível ao anticorpo comercial nas técnicas de imuno-histoquímica clássica e em Tissue Microarray com a superioridade relacionada à otimização quantitativa do anticorpo uma vez que o LINB5 foi validado ao comercial utilizando respectivamente diluições de 1:5000 e 1:10000 e o reagente comercial 1:250.

## PERSPECTIVAS

- Obtenção dos anticorpos em concentrações 5X mais elevadas de proteínas purificadas, e posterior conjugação com FITC para realização de novos testes por citometria de fluxo, inclusive utilizando amostras de outras espécies.
- Padronizar o protocolo de imuno-histoquímica utilizando a recuperação antigênica através da panela de Pascal.
- Proceder à análise quantitativa da intensidade das reações de imuno-histoquímica em lâminas de TMA, utilizando o clone LINB5 purificado, através de softwares/programas de análises de imagens.
- Registro do clone LINB5 junto à ANVISA e sua disponibilização para uso em imuno-histoquímica e *Tissue Microarray* para serviços que tenham interesse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A.H. Receptores de antígenos e moléculas acessórias dos linfócitos T. In: \_\_. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. cap. 6, p.123.

ANDRADE, V. P. et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab**, vol. 43, n. 1, p. 55-60, 2007.

BACAL, N.S., FAULHABER, M.H.W. **Aplicação prática em citometria de fluxo**. São Paulo: Ed. Atheneu; 2003.

BATTIFORA, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. **Lab Invest**, vol. 55, n. 2, p. 244-8, 1986.

BATTIFORA, H. and P. Mehta. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block. **Lab Invest**, vol. 63, n. 5, p. 722-4, 1990.

BOROWITZ, M.J., GUENTHER, K.L., SHULTS, K.E., STELZER, G.T. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. **Am. J. clin. Pathol.**, v. 100 (5), p.534-40, 1993.

BRUIN, H.G., LEUR-EBELING, I., AAIJ, C. Quantitative determination of number of FITC-molecules bound per cell in immunofluorescence flow cytometry. **Vox Sang.**, v.45, p. 373-7, 1983.

COON, J.S., WEINSTEIN, R.S. **Diagnostic flow cytometry – techniques in diagnostic pathology**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991.

DALCHAU, R., KIRKLEY, J., FABRE, J.W. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. **Eur. J. Immunol.**, v.10, p.737, 1980.

GOLIM, M. A. *Obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos da superfície de linfócitos B humanos para aplicações diagnósticas e terapêuticas (fase murina)*. Botucatu, 2008. 109p. Tese (Doutorado: Fisiopatologia em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina - Universidade Estadual Paulista – UNESP.

GOLIM, M.A. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.29, n.4, p.361-368, 2007.

HENSHALL, S. Tissue microarrays. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, vol. 83, n. 3, p. 347-58, 2003.

HUDSON, P.J., SOURIAU, C. Engineered antibodies. **Nat. Med.**, v. 9, p. 129-134, 2005.



JAVOIS, L.C. Immunocytochemical methods and protocols. 2<sup>a</sup> ed. Totowa (NJ): Human Press; **Methods in molecular biology**, 34, 1999.

JOHNSON,G. Immunofluorescence. In: Catty D. **Antibodies: a practical approach**. Birmingham: URL Press – Oxford University Press; v.2, p.176-89, 1989.

JOHNSON, I. Florescent probes for living cells [review]. **Histochem. J.**, v. 30, p. 123-40, 1998.

KALLIONIEMI *et al.* Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. **Hum Mol Genet**, vol. 10, n. 7, p. 657-62, 2001.

KISHIHARA, K., PENNINGER, J., WALLACE, V.A. et al. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. **Cell**, v.74, p. 143-56, 1993.

KONONEN *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, vol. 4, n. 7, p. 844-7, 1998.

KORETZKY, G.A., PICUS, J., THOMAS, M.L., WEISS, A. Tyrosine phosphatase CD45 is essential for coupling T-cell antigen receptor to the phosphatidyl inositol pathway. **Nature**, v. 346, p. 66-68, 1990.

KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p.495-7, 1975.

LACOMBE, F., DURRIEU, F., BRIAIS, A. et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. **Immunobiology**, v. 11, p.1878-86, 1997.

LEDBETTER, J.A., ROSE, L.M., SPOONER, C.E. et al. Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL-2 receptor expression. **J. Immunol.**, v. 135, p.1819, 1985.

LIU, C. L. et al. TMA-Combiner, a simple software tool to permit analysis of replicate cores on tissue microarrays. **Mod Pathol**, vol. 18, n. 12, p. 1641-8, 2005.

MITTLER, R.S., GREENFIELD, R.S., SCHACTER, B.Z. et al. Antibodies to the common leukocyte antigen (T200) inhibit an early phase in the activation of resting human B cells. **J.Immunol.**,v. 138, p.3159-66, 1987.

MOCH, H. et al. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? **Adv Anat Pathol**, vol. 8, n. 1, p. 14-20, 2001.

MORIMOTO, C., LETVIN, N.L., DISTASO, J.A. et al. The isolation and characterization of the human supressor inducer T cell subset. **J. Immunol.**, v. 134, p.1508, 1985.

NELSON, P.N., ASTLEY, S.J., RODEN, D. et al. Characterization of anti-myosin monoclonal antibodies. **Hybridoma**, v.42, p.314-7, 2005.

NEWMAN, W., TARGAN, S.R., FAST, L.D. Immunobiological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. **Mol.Immunol.**, v. 21, p.1113, 1984.

NORMAN, G.R., STREINER, D.L. **Biostatistics –the bare essentials**. St Louis: Ed. Mosby-Year Book; 260p., 1994.

PINGEL, J.T., THOMAS, M.L. Evidence that the leukocyte-common antigen is required for antigen-induced T lymphocyte proliferation. **Cell**, v.58, p. 1055-65, 1989.

RIMM, D. L. et al. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. **Cancer J**, vol. 7, n. 1, p. 24-31, 2001.

ROSSI-FERREIRA, R., DEFFUNE, E., THOMAZINI-SANTOS, I., MACHADO, P.E.A. Obtenção e caracterização de anticorpo monoclonal murino anti-fator VIII da coagulação sanguínea. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.28, p.97-104, 2006.

RUDD, C.E., MORIMOTO, C., WONG, L.L., SCHLOSSMAN, S.F. The subdivision of the T4 (CD4) subset on the basis of the differential expression of L-C/T200 antigens. **J. Exp.Med.**, v. 166, p. 1758, 1987.

STREULI, M., MORIMOTO, C., SCHRIEBER, M., et al. Characterization of CD45 and CD45R monoclonal antibodies using transfected mouse cell lines that express individual human leukocyte common antigens. **J. Immunol.**, v. 141 (11), p. 3910, 1988.

STROME, S.E., SAUSVILLE, E.A., MANN, D.A. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. **The Oncologist**. v. 12, p. 1084-95, 2007.

SUTHERLAND, S.D., ANDERSON, L., KEENEY, M. et al. \_\_\_\_\_ **The Journal of Hematotherapy**, v. 25, p.238-42, 2006.

THOMAS, M.L. The leukocyte common antigen family. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p.339-69, 1989.

TROWBRIDGE, I.S., THOMAS, M.L. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. **Annu. Rev. Immunol.**, v.12, p.85-116, 1994.

WAN, W. H. et al. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. **J Immunol Methods**, vol. 103, n. 1, p. 121-9, 1987.