



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

JULIANA MAZIERO AZANHA

**OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
DIRIGIDOS CONTRA ANTÍGENOS i EXPRESSOS EM
HEMÁCIAS FETAIS HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

**Botucatu
2022**

Juliana Maziero Azanha

Obtenção De Anticorpos Monoclonais Murinos Dirigidos
Contra Antígenos i Expressos Em Hemácias Fetais
Humanas

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de Mestre em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Azanha, Juliana Maziero.

Obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos
contra antígenos i expressos em hemácias fetais humanas /
Juliana Maziero Azanha. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Andrei Moroz

Capes: 90400003

1. Anticorpos monoclonais. 2. Antígenos. 3. Transfusão
feto-materna.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal; Antígeno i;
Antígenos eritrocitários; Hemorragia feto-materna.

JULIANA MAZIERO AZANHA

**Obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos
contra antígenos *i* expressos em hemácias fetais humanas**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Banca examinadora:

Prof. Dr. Andrei Moroz
Orientador

Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune
FMB-UNESP

Prof(a). Dr(a) Priscila Murador
Mistério da Saúde

Botucatu, 20 maio de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades e conseguir mais essa conquista.

Aos meus pais, meus familiares e ao namorado por me dar amor, apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Andrei Moroz e a minha banca examinadora pela oportunidade, suporte, incentivo, confiança e correções.

A Prof.^a Dr.^a Elenice Deffune, pela paciência, carinho e apoio, a sua participação foi extremamente importante para a realização desse estudo.

Ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UNESP- FMB e ao Hemocentro de Botucatu, por disponibilizarem as amostras utilizadas ao longo da pesquisa.

A toda equipe do Hemocentro, principalmente do Laboratório de Hematologia e Hemostasia, pela compreensão nos momentos em que estive ausente e ocupada com o projeto e pelo incentivo aos estudos.

A Prof.^a Dr.^a Marjorie de Assis Golín e Aline Márcia Marques Braz pelas análises realizadas no Laboratório de Citometria de Fluxo.

Ao Ednelson Bianchi, pela imensa ajuda no manuseio dos animais.

À equipe do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, IBB, UNESP, Prof.^o Dr.^o Willian Fernando Zambuzzi e Thaís Silva Pinto pela colaboração e realização dos testes de Western blotting.

A todos os professores, alunos e funcionários da sessão de pós-graduação da FMB e do Hospital das Clínicas pela oportunidade e prestatividade.

À Suelen de Souza Assunção Nishio, pela elaboração do anticorpo e pela parceria de pesquisa.

À Pamela Leite da Silva e Ananda Lini Vieira da Rocha, por toda ajuda técnica no laboratório de Biologia Celular e pelo apoio e companheirismo ao longo desse período e que não me deixaram desistir.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Celular, pela amizade, companheirismo e ajuda.

Enfim, a todos que participaram direta e indiretamente desta dissertação, minha gratidão.

Resumo

Introdução: A membrana eritrocitária é composta por proteínas do esqueleto que recobrem a parte interna da bicamada lipídica, conferindo ao glóbulo vermelho inúmeras funções e ou atribuições e uma infinidade antigênica caracterizada pelo polimorfismo genético. Os antígenos Ii são estruturas de carboidratos referenciados como antígenos do grupo histo-sangue e o antígeno i pode ser utilizado como um marcador de hemácias fetais, pois é abundantemente expresso na superfície das hemácias fetais e neonatais. A hemorragia feto-materna (HFM) é a transferência de sangue fetal para o compartimento intravascular materno, ocasionada pela ruptura da membrana vâsculo-sincicial da placenta, acarretando a aloimunização materna. A detecção de células fetais que contém esses antígenos i na circulação materna, utilizando um anticorpo monoclonal de especificidade anti-i ou de outra especificidade, poderia ser um novo meio de realizar o imunodiagnóstico da HFM.

Objetivo: Obter anticorpo monoclonal murino de especificidade anti-*i* ou de outra especificidade expressa sobre a membrana das hemácias. Tendo em vista que atualmente não há anticorpos monoclonais anti-i disponíveis comercialmente.

Metodologia: Produção do anticorpo monoclonal utilizando-se a técnica de hibridoma. O líquido de cisto de ovário e o sangue de cordão umbilical foram utilizados como fonte de antígeno. A caracterização e a validação da especificidade dos anticorpos obtidos realizadas através de hemaglutinação, citometria de fluxo e *Western blotting*.

Resultados e Discussão: Na fusão obteve-se o total de 7.200 células construídas que correspondem aos protocolos COi e SCU_i. Das 2.700 células construídas pelo protocolo SCU_i, 1300 receberam *feeder cells* (protocolo clássico/controle) com taxa de eficiência de fusão de 33,61% enquanto os outros 1400 híbridos construídos receberam meio condicionado de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de origem murina, com taxa de eficiência de fusão de 69,71%. O Hemf1-46 tem uma maior positividade com CTM-ta, o Hemf1-85 tem maior positividade em CTM-ta, HUVEC e plaquetas, enquanto o HemF1-88, HemF3-121 e HemF3-122 reconhecem hemácias humanas.

Conclusão: O Sobrenadante de Cultura do HemF1-88 tem perfil sugestivo de CD36 que deverá ser objeto de caracterização definitiva. Os demais anticorpos ainda estão em análise. Os ensaios com o meio condicionado de células tronco murinas como aditivos do meio de cultura na etapa de fusão celular mostrou-se mais eficiente de que as *feeder cells* tradicionalmente utilizadas, devendo ser considerado como um produto biotecnológico inovador para a plataforma hibridoma.

Palavra-chave: Anticorpo monoclonal; Antígenos eritrocitários; Antígeno-i; Hemorragia Feto-Materna

Abstract

Introduction: The erythrocyte membrane is composed of skeletal proteins that cover the inner part of the lipid bilayer, giving the red blood cell numerous functions and/or attributions and an antigenic infinity characterized by genetic polymorphism. The Iⁱ antigens are carbohydrate structures referred to as histo-blood group antigens and the Iⁱ antigen can be used as a marker of fetal red blood cells, as it is abundantly expressed on the surface of fetal and neonatal red blood cells. Feto-maternal hemorrhage (FMH) is the transfer of fetal blood to the maternal intravascular compartment, caused by the rupture of the placental vascular-syncytial membrane, resulting in maternal alloimmunization. The detection of fetal cells that contain these Iⁱ antigens in the maternal circulation, using a monoclonal antibody of anti-Iⁱ or other specificity, could be a new way of carrying out the immunodiagnosis of FHM. However, for the construction of this type of immunosensor, a monoclonal antibody is required. **Objective:** To obtain a murine monoclonal antibody with anti-Iⁱ or with another specificity expressed on the red blood cell membrane. Considering that there are currently no commercially available anti-Iⁱ monoclonal antibodies. **Methodology:** Production of the monoclonal antibody using the hybridoma technique. Ovarian cyst fluid and umbilical cord blood were used as an antigen source. The characterization and validation of the specificity of the antibodies obtained through hemagglutination, flow cytometry and western blotting. **Results:** In the fusion, a total of 7.200 cells were constructed that correspond to the COI and SCUⁱ protocol. Of the 2700 cells built using the SCUⁱ protocol, 1300 received feeder cells (classical/control protocol) with a fusion efficiency rate of 33.61% while the other 1400 hybrids built received conditioned medium of mesenchymal stem cells derived from murine adipose tissue, with a melting efficiency rate of 69.71%. The Hemf1-46 has a higher positivity with ta MSC, the Hemf1-85 has a higher positivity in ta MSC, HUVEC and platelets, while HemF1-88, HemF3-121 and HemF3-122 recognize human red blood cells. **Conclusion:** The HemF1-88 culture supernatant has a profile suggestive of CD36, which should be subject to definitive characterization. The other antibodies are still under analysis. Assays with the conditioned medium of murine stem cells as additives of the culture medium in the cell fusion stage proved to be more efficient than the feeder cells traditionally used, and should be considered as an innovative biotechnological product for the hybridoma platform.

Keywords: Monoclonal antibody; Erythrocyte antigens; Antigen-Iⁱ; Fetomaternal hemorrhage

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: li presentes no interior das estruturas de cadeias complexas de carboidratos contendo ABH e Lewis.	13
Figura 2: Produção de anticorpos monoclonais pela tecnologia de hibridomas. Imunização, fusão celular, seleção de hibridomas, diluição limitante, triagem dos hibridomas.....	17
Figura 3- Cisto de ovário, como fonte de antígeno i.....	24
Figura 4: Inoculação de suspensão de SCU no camundongo, via intraperitoneal	27
Figura 5: Quantificação de proteínas do líquido do cisto de ovário purificado.	31
Figura 6: Diferentes etapas de extração dos linfócitos esplênicos para a fusão celular	32
Figura 7: Fotomicrografia obtida por microscopia invertida da cultura de NS1(mieloma murino) com alta viabilidade e confluência.	33
Figura 8: Esquema da fusão celular.....	34
Figura 9: Aspecto microscópico da visualização da técnica de viabilidade celular por Azul de Tripan	35
Figura 10: Placas de 96 poços apresentando híbridos enumerados para realização do <i>screening</i>	37
Figura 11: Aspectos da clonagem celular: Placa de 96 poços com marcação de U (azul) e fotos do clone em diferentes dias.....	40
Figura 12: Esquema da caracterização dos híbridos.	41
Figura 13: Distribuição dos híbridos construídos e híbridos descartados	47
Figura 14: Aspecto da cultura celular.	49
Figura 15: Gráfico da análise comparativa por Citometria de Fluxo dos diferentes SNC.....	57
Figura 16: Comparação do desempenho do SNC Hemf1-88 com anti-CD36 e anti-CD44	61
Figura 17– <i>Western blotting</i> dos SNC utilizando extrato membranário de diferentes hemácias.....	66

LISTA DE TABELA

Tabela 1:Eficiência de fusão comparando no quarto dia após a fusão; <i>feeder cells</i> X meio condicionado de célula tronco murina	48
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Etapas da produção do anticorpo monoclonal anti-i.....	26
Quadro 2: Protocolo SCU _i . Imunização dos camundongos com hemácias fetais de SCUP a 10%.	27
Quadro 3: Protocolo SCU _i e protocolo CO _i . Imunização de camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário não purificado	28
Quadro 4: Protocolo SCU _i e protocolo CO _i . Imunização de camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% tratadas com enzima papaína e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário purificado	29
Quadro 5: <i>Screening</i> de acordo com a fusão e protocolo de imunização	37
Quadro 6: Quantidade de células para plaquear em cada placa de 96 poços	39
Quadro 7: Citometria de fluxo.....	43
Quadro 8: Fenotipagem eritrocitária de 3 diferentes hemácias selecionadas	44
Quadro 9: Citometria de fluxo. Análises da validação ou exclusão das especificidades CD36 ou CD44.....	44
Quadro 10: Distribuição das fusões e os respectivos aditivos utilizados: SFB e <i>feeder cells</i> X SFB e MC-CTM _{tam} X HDLT.....	46
Quadro 11: Testes de hemaglutinação de hemácias humanas de sangue adulto (n=1 O adulto) e sangue de cordão umbilical (n=4), hemácias de diferentes animais (n=1): coelho, boi e cavalo. Testes realizados no método salino e enzimático com leitura em quinze minutos e 1 hora de incubação à 22°C ou 4°C	52
Quadro 12:Padrão de hemaglutinação dos anticorpos: crioaglutinina humana, HemF1-46, HemF1-85, HemF1-88, HemF3 116, HemF3-121 e HemF3-122 frente ao Painel de hemácias Panocell 16® após centrifugação imediata e incubação de 1 hora a 22°C	54
Quadro 13: Análise de Citometria de Fluxo com os diferentes SNC	56
Quadro 14:Identificação de possíveis perfis para os anticorpos obtidos.....	58

Quadro 15- Levantamento da reatividade de CDs em hemácias, endotélio, plaqueta e célula tronco mesenquimal.....	59
Quadro 16: Análise de Citometria de Fluxo com o SNC do HemF1-88.....	60
Quadro 17– Identificação dos prováveis CDs correspondendo à especificidade dos SNC em estudo, seu nome e respectivo peso molecular	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Descrição dos antígenos ABO li	12
1.2	Importância do antígeno li como marcadores de amadurecimento das hemácias humanas.	14
1.3	Identificação de anticorpos anti- I e anti-i.....	14
1.4	Anticorpos monoclonais murinos (AcMm).....	15
1.4.1	<i>Feeder cells</i> como elemento estabilizador da fusão celular	18
1.4.2	Meio condicionado de Células tronco murinas como fonte de fatores de crescimento para a fusão celular.....	20
1.4.3	– Lisado de células do timo	20
1.5	Problemática da hemorragia feto materna.....	21
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral.....	23
3.2	Objetivos Específicos.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Fase 1 – Identificação e obtenção de amostras de pacientes portadores de cisto de ovário, de sangue de cordão umbilical, sangue de doador saudável e pacientes portadores da Síndrome de Aglutinina Fria.....	24
4.1.1	Identificação de paciente portadora de cisto de ovário para obtenção do Líquido utilizado para etapa de imunização	24
4.1.2	Obtenção de amostras de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para as etapas de imunização, <i>screening</i> e caracterização	25
4.1.3	Obtenção de amostras de doadores de sangue saudáveis do sexo masculino para a etapa de caracterização	25

4.1.4 Identificação de pacientes portadores da Síndrome de Aglutinina Fria para obtenção de amostras de soro para controle positivo no momento da caracterização e validação do anticorpo obtido.....	25
4.2 Fase 2 – Produção do Anticorpo monoclonal murinho anti-i.....	26
4.2.1 Protocolo de imunização	26
4.2.2 Animais, esplenectomia e timectomia	31
4.2.3 Mieloma múltiplo murino.....	32
4.2.4 Fusão	33
4.2.5 <i>Screening</i>	36
4.2.6 Protocolo de tolerização	38
4.2.7 Clonagem	39
4.2.8 Caracterização	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6 CONCLUSÃO.....	67
7 PERSPECTIVAS	67
8 LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

Ao estudarmos o nascimento, a vida e a morte dos glóbulos vermelhos, descobrimos uma espetacular diversidade antigênica modulada em função do período de vida. O médico e bioquímico, Karl Landsteiner (1868-1943), é considerado o precursor dos estudos bioquímicos e moleculares dos antígenos dos grupos sanguíneos, por seus estudos detalhados, em Viena, e principalmente com a descrição do sistema ABO, em 1901. Estes estudos lhe conferiram em 1930 o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina. O grande mérito de Landsteiner foi conseguir classificar as hemácias em “grupos” A, B, AB e O (denominado por ele de zero antígeno), com isto, ele abriu o caminho da possibilidade real de uma transfusão de sangue ser possível. É atribuído a este médico também o fato de que a técnica de hemaglutinação tenha se consagrado na área de imuno-hematologia(1).

Os glóbulos vermelhos são estruturas encarregadas do transporte de gases no organismo. Em função disto, há o requerimento de propriedades elástica importantes, incluindo uma resistência muito alta às tensões de cisalhamento durante seu percurso nos capilares sanguíneos. Isto modulou ao longo do tempo a composição da membrana eritrocitária, com sua bicamada lipídica sobre a qual está inserida uma rede bidimensional, de proteínas do esqueleto, essenciais na deformabilidade das hemácias. Estas proteínas do esqueleto, recobrem a parte interna da bicamada lipídica de forma extremamente organizada, conferindo ao glóbulo vermelho inúmeras funções e ou atribuições, sendo a principal e mais relevante, a de transporte de gases(2).

Aspectos específicos da deformabilidade mecânica, elasticidade e da biorreologia comprovam o importante papel das hemácias influenciando ou determinando a função de muitos órgãos, tanto na saúde como na doença(3).

Sabe-se de longa data, que o aspecto da forma das hemácias, em disco bicôncavo de 7,5 a 8,7 μ m de diâmetro e 1,7 a 2,2 μ m de espessura e sua composição determinam sua capacidade de deformação, capacidade esta, essencial para que esta célula desempenhe sua função. Na sua membrana, composta pela camada fosfolipídica e uma intrincada rede de proteínas regidas pela espectrina onde tem sede as proteínas integrais, as periféricas e uma infinidade antigênica caracterizada pelo polimorfismo genético, que garante a condição de ser único exemplar na natureza(4). O papel destes antígenos proteicos, carboidratos, lipídicos,

glicoproteicos tem sido amplamente estudado atualmente pelos sistemas de microfluídica e sua diversidade, tanto em hemácias como em plaquetas expressam a atividade antigênicas destas células(5).

Segundo Gregory A. Denomme em seu artigo intitulado “*The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens*,

...a função proposta das moléculas que expressam antígenos de hemácias e plaquetas inclui estrutura de membrana, formação de transportador ou canal, sinalização ou adesão receptor/ligante, atividade enzimática e formação de glicocálice. No entanto, a função de algumas dessas moléculas não é conhecida, e muitos dos antígenos variantes não apresentam uma diferença funcional óbvia. Por razões desconhecidas, algumas dessas moléculas são excepcionalmente polimórficas e a elucidação do papel preciso que esses polimorfismos desempenham na estrutura e função é dificultada por limitações nas análises *in vitro* e *ex vivo* e no acesso a tipos de células precursoras(6).

The International Society of Blood Transfusion (ISBT) Working Party for Red Cell Immunogenetics and Blood Group em junho de 2021 reconheceu 345 antígenos sobre a superfície das hemácias humanas em 43 sistemas bem estabelecidos, esses sistemas são determinados geneticamente por 48 genes. O *ISBT* também mantém três categorias para antígenos identificados bioquimicamente, geneticamente ou sorologicamente, mas ainda necessitam mais elucidação para ser associados a sistemas de grupos sanguíneos. O que nos leva a reconhecer, que mesmo em sistemas bem estabelecidos como o ABO, novas descobertas ainda podem ser feitas (7).

Apesar de ter sua descrição datada de 1956,(8) este grupo sanguíneo foi considerado uma “coleção” até 2002, quando então fora promovido à condição de Sistema I. É o 27º sistema, cujo gene é o *GCNT2*, tendo sido mapeados até o momento apenas um antígeno. E é sobre este sistema, que este projeto foi delineado(9) (10) .

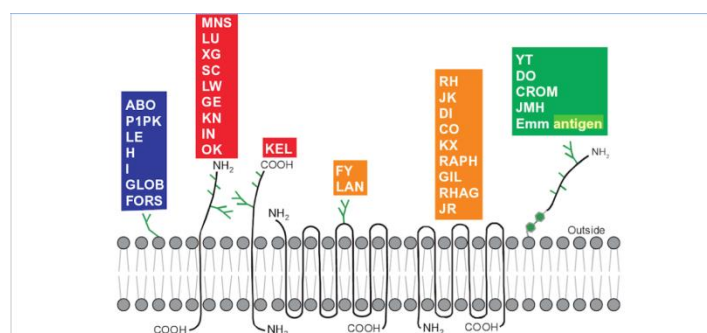
1.1 Descrição dos antígenos ABO li

Os antígenos li são estruturas de carboidratos transportadoras de glicolípídeos e glicoproteínas e estão presentes no interior das estruturas de cadeias

complexas de carboidratos contendo ABH e Antígenos de Lewis. Como demonstra a Figura 1 (11).

Durante a ontogenia, a atividade ABH e Lewis está aumentada a partir da quinta semana da fecundação. Os antígenos ABH são encontrados em grande quantidade nas células endoteliais, nos epitélios primordiais (vida intraembrionária) na maioria dos órgãos, nas ilhas sanguíneas do saco vitelínico e no epitélio gástrico. Ao redor da 12^a e 14^a semana de gestação, a expressão da atividade do sistema ABH diminui(9).

Figura 1: li presentes no interior das estruturas de cadeias complexas de carboidratos contendo ABH e Lewis.



Fonte: Imagens obtidas de Reid.(9)

As estruturas i e I se distinguem por serem caracterizadas como repetições lineares e ramificadas de N-acetilactosamina, Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAc-R, e Galb1-4GlcNAcb1-3 (Galb1-4GlcNAcb1-6) Galb1-4GlcNAc-R, respectivamente. As enzimas b-1,3-N-acetilglucosaminiltransferase e b-1,4-galactosiltransferase são responsáveis por converter a cadeia linear em ramificada, esta estrutura final será ativada pela ação da terceira enzima, a B-1,6-N-acetilglucosaminiltransferase I-ramificada (b6GlcNAcT), a qual é codificada pelo gene *GCNT2*. Portanto o *locus* do grupo sanguíneo I é atribuído para codificar b6GlcNAc-T, evidenciando que antígeno i é o precursor de I, da mesma maneira que H é para A ou B, conseqüentemente, geram-se argumentações sobre este ser designado ou não um sistema de grupo sanguíneo. Além disso, há evidências bioquímicas que o I e i são precursores dos antígenos ABH(12)(13).

Os antígenos li também são referidos como antígenos do grupo histo-sangue, que apresentam expressão tecidual e nas hemácias, assim com os antígenos ABH, pois não são apenas detectados em glóbulos vermelhos, mas também nas

superfícies da maioria das células humanas células e em glicoproteínas solúveis em vários fluidos corporais, incluindo assim a saliva, plasma, leite, líquido amniótico, urina e fluido do cisto ovariano(14) (15)

1.2 Importância do antígeno Ii como marcadores de amadurecimento das hemácias humanas.

Há predominância do antígeno I em hemácias adultas, enquanto o antígeno i é abundantemente expresso na superfície das hemácias fetais e neonatais, e em eritrócitos durante o período de eritropoiese alterada. Depois do nascimento, nos 18 meses de vida, a quantidade de antígeno I aumenta gradualmente à medida que o antígeno i diminui(16). Podendo então, i ser utilizado como um marcador de hemácias fetais(17) (18).

Os antígenos Ii representam antígenos de desenvolvimento em células vermelhas e em muitos outros tecidos. A conversão de i para I nos glóbulos vermelhos e provavelmente, na maioria dos outros tecidos, aumenta entre seis e 18 meses de vida o qual coincide com processo de ramificação de cadeias oligossacarídicas. Sendo assim, essa conversão é processo contínuo de diferenciação eritróide, ou seja, células vermelhas “jovens” expressam mais i do que células vermelhas “velhas”(19).

A alta expressão do antígeno i também é uma característica das células imaturas, células neoplásicas e das células adultas menos diferenciadas, incluindo assim linfoblastos, fibroblastos, timócitos e eritroblastos(20)(21) . Essa expressão alterada de I e i provavelmente é decorrente da biossíntese incompleta dos determinantes ABH ou por um bloqueio durante o processo de ramificação de cadeias oligossacarídicas(22)(23)(24) .

1.3 Identificação de anticorpos anti- I e anti-i

Os anticorpos são moléculas glicoproteicas, também chamados de imunoglobulinas, originárias das células B, que circulam através do sangue e da linfa. São responsáveis pela capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se e inativar ou dar início ao processo de eliminação de um antígeno. Cada molécula de anticorpo possui uma estrutura única que lhe permite ligar-se especificamente ao seu antígeno correspondente. O anticorpo possui um local de ligação do antígenos,

que são as regiões variáveis terminais das cadeias leves e pesadas, e um local onde o anticorpo interage funcionalmente com outras moléculas no sistema imunológico, que são as regiões constantes terminais das cadeias pesadas (25).

Segundo Roelcke (1989) , os anticorpos Anti-I e Anti -i são referidos como aglutininas frias, pois são anticorpos que reagem otimamente no frio com os glóbulos vermelhos(26). Além de reagirem com hemácias, os anticorpos Anti-I e Anti -i são potentes linfocitotoxinas frias, eficazes na morte de linfócitos B e T os quais também apresentam antígenos i e I e também são citotóxicos para monócitos, macrófagos e cerca de 25% de granulócitos(27)(28).

Os anti-I reagem com as células vermelhas de quase todos os adultos, mas não reagem, ou reagem apenas fracamente, com as células vermelhas dos neonatos, podendo ser encontrados como autoanticorpos em pacientes com Síndrome de Aglutinina Fria ou após infecção por *Mycoplasma pneumoniae* (29). Os anti-i foram nomeados por Marsh e Jenkins, 1960 e Marsh,1961 quando encontraram dois anticorpos de aglutinação e, ao contrário do comportamento dos anti-I, reagiam fortemente com células do cordão e células i adultas, porém muito fracamente com células vermelhas dos adultos(18)(30).

Os anti-i são aglutininas frias, podendo ser hemolíticas e estão frequentemente presentes em soros de pacientes com mononucleose infecciosa. Estes anticorpos são exemplos clássicos de anticorpos policlonais. No entanto, para uso diagnóstico, desde 1980, a tecnologia dominante é da produção de anticorpos monoclonais murinos (AcMm).

1.4 Anticorpos monoclonais murinos (AcMm)

Os AcMm são anticorpos originados a partir de um único clone de célula e são produzidos contra antígenos específicos(31). Köhler e Milstein, em 1975, referiram-se ao processo de produção de anticorpos monoclonais, através da obtenção dos hibridomas, células viáveis com capacidade de se proliferar e secretar anticorpos, originárias pela fusão de linfócitos B com células de mieloma de camundongos. Os linfócitos B (esplenócitos) são células secretoras de anticorpos, mas que possuem vida curta *in vitro*, sendo muito difícil cultivá-las. As células mielomatosas, por sua vez, são linfócitos modificados que não secretam anticorpos,

mas têm características neoplásicas (células tumorais), com alta capacidade mitótica e vida longa em cultivo(32).

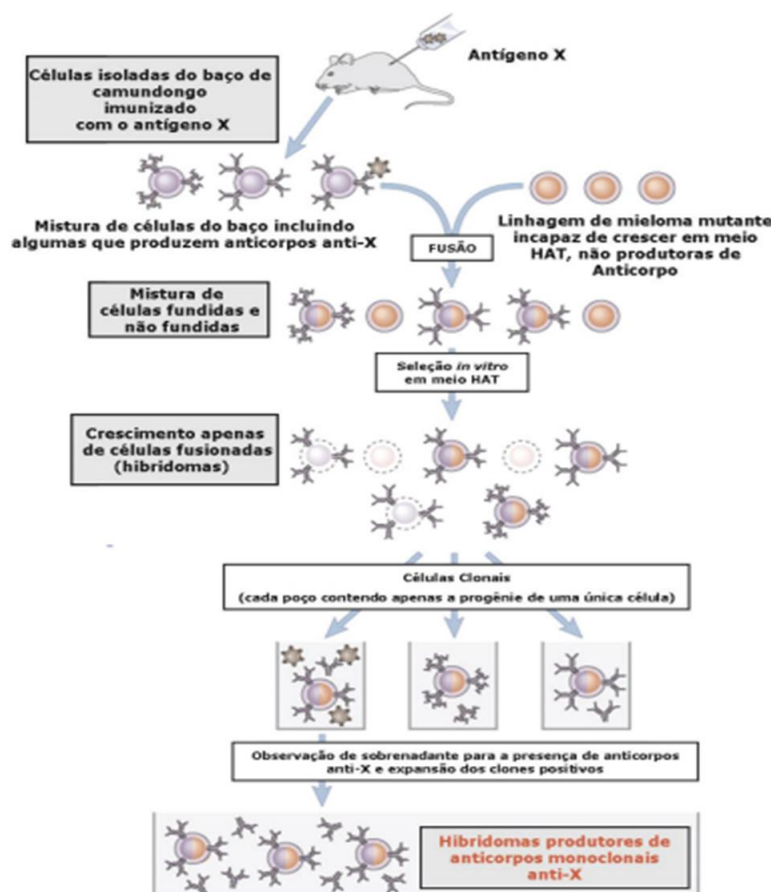
A primeira fase para produzir anticorpos monoclonais utilizando a tecnologia de hibridomas é a imunização. Na técnica, seleciona-se os antígenos específicos, contra o qual se deseja o anticorpo, estabelece-se a dosagem e a via de inoculação mais adequada, de acordo com o modelo animal escolhido (30). Os linfócitos B e as células de mieloma múltiplo do camundongo Balb/C são os mais utilizados. Assim, com auxílio do agente químico fusionante polietilenoglicol (PEG), demonstrado por Pontecorvo em 1975(33) considerado um procedimento rápido e de fácil manuseio, há a fusão dos linfócitos B do animal previamente imunizado com as células de mieloma múltiplo murinho (34).

Logo após a fusão obtêm-se células multinucleadas e o produto desta fusão é Linfócitos/Linfócitos, Mieloma/Mieloma e Mieloma/Linfócitos, sendo assim, é necessário isolar em meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) os híbridos de interesse. Este meio seleciona os hibridomas, pois não permite a multiplicação das células tumorais não fusionadas.(34) (35) Isso ocorre porque existe duas vias, uma chamada *de novo* e a outra uma via de salvamento (*salvage*). A via *de novo* as células normais sintetizam nucleotídeos e timidilato. A aminopterina do meio de cultura HAT inibe a síntese de purinas e timidilato, substâncias que são essenciais para a síntese de DNA, dessa forma as células normais na presença da aminopterina vão utilizar a outra via, via de salvamento (*salvage*) que utiliza hipoxantina e timidina através das enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT) e timidina quinase (TK), para síntese de nucleotídeos e timidilato. As células tumorais não têm a HGPRT e a TK. Como as células tumorais não possuem esta enzima a sua sobrevivência é inviabilizada, já as células tumorais que se fundiram as células normais, esplenócitos, os quais possuem as enzimas vão conseguir sobreviver nesse meio. O linfócitos B (esplenócitos) não fusionados morreram naturalmente após duas semanas de cultivo devido a sua sobrevivência curta (36).

A cultura celular dos híbridos contém uma mistura de anticorpos, devido à obtenção diversificada de clones de linfócitos B e para verificar a presença dos anticorpos de interesse no sobrenadante de cultura e a seleção de célula única (monoclonal) é realizada a diluição limitante, poços que ali são testados

individualmente os anticorpos e quando positivos são submetidos à clonagem celular para avaliar a produção dos anticorpos novamente (37).

Figura 2: Produção de anticorpos monoclonais pela tecnologia de hibridomas. Imunização, fusão celular, seleção de hibridomas, diluição limitante, triagem dos hibridomas.



Fonte: Kuby, (2018) (38).

Com o advento da técnica de produção de anticorpos monoclonais por fusão celular, muitos campos da imunologia e medicina apresentaram um formidável avanço. A produção de AcMm tem sido aplicada para diversos fins, para uso terapêutico, diagnóstico de doenças humanas e animais, identificação de moléculas, identificação viral, entre outros. São reagentes ideais para composição de kits de diagnóstico para doenças infecciosas, sorotipagem de microrganismos, terapia de uma grande variedade de doenças auto-imunes, controle e diagnóstico de tumores, devido, principalmente, a alta especificidade dessas biomoléculas (39).

No trabalho de Nishio, (2019) através da técnica de hidridomas, obteve-se um híbrido a qual reagia positivamente com as hemácias fetais e não reagiam com

as hemácias adultas, com a hipótese de ser um anti-i, ou anti-CD71 expressos em eritroblastos fetais, porém durante a amplificação ocorreram problemas técnicos e amostra do híbrido pretendido foi perdida devido a uma contaminação por fungo(34).

Kannag, 2001 comenta que os carboidratos são geralmente considerados como imunógenos pobres. Dessa forma, foi gerado anticorpos monoclonais para estruturas específicas de glicano usando glicoconjugados, como glicanos acoplado a proteínas transportadoras, obtendo sucesso como imunógeno(40).

Atualmente não há anticorpos disponíveis comercialmente reconhecendo o antígeno i. Hirvonen et al., 2013 sabendo desse fato e da importância dos anticorpos monoclonais recombinantes como uma fonte promissora de anticorpos para imunoterapia, em sua pesquisa mostra que a geração de anticorpos para as porções de carboidratos pode ser superada usando a tecnologia de exibição de fagos, que não depende da imunização e, portanto, permite a geração de anticorpos contra moléculas pouco imunogênicas ou mesmo auto-antígenos, concluindo que, o anticorpo nomeado por ele de B12.2, desenvolvido em seu trabalho é um anti-i proeminente, portanto, ele pode ser utilizado e desenvolvido para detecção de células tronco do sangue do cordão umbilical e sorologia para grupos sanguíneos(41).

1.4.1 *Feeder cells* como elemento estabilizador da fusão celular

Historicamente os primeiros a usar *feeder cells* foram por Theodore Puck e Philipp Marcus em 1955, quando comprovaram o uso de células irradiadas para melhorar o desempenho das unidades de formação de colônia com a linhagem HeLa(42).

As células de camada alimentadora, denominadas mundialmente, de *feeder cells* ou “damas de companhia, são normalmente células aderentes ao plástico, viáveis, de vida limitada (cultura primária) que secretam fatores bioativos. Estas células são usadas desde a descrição inicial da tecnologia hibridoma, por Kohler e Milstein(43).

As *feeder cells* são preparadas por serem identificadas como células que fornecem os fatores de crescimento apropriados para apoiar o crescimento dos hibridomas até que eles possam se expandir em número suficiente. Boas células alimentadoras devem ter propriedades que permitam que sejam selecionadas

durante o crescimento futuro dos hibridomas. Macrófagos peritoneais, células de mieloma irradiadas, esplenócitos, timócitos e células MRC-5 (uma linha de fibroblastos de pulmão humano) são as células da camada alimentadora mais comuns usadas em fusões de hibridoma(44).

Vários são os mecanismos de ação destas células listadas na literatura especializada. Entre elas identificam-se: 1) conforto espacial (tridimensional) às células de baixa densidade, pois sabe-se que muitas células necessitam deste “conforto físico” representado pelo contato com a camada alimentadora, principalmente células mais difíceis de crescer *in vitro* e células fragilizadas (como logo após a fusão celular e durante a clonagem; 2) secreção de fatores bioativos que condicionam as células a diminuir a apoptose e estimulam seu crescimento; 3) desintoxicação do meio de cultura; 4) presença de receptores solúveis, proteínas, vesículas extracelulares secretadas pelas células, que modulam e auxiliam o processo de expansão celular e 5) secreção de proteínas de matriz extracelular secretadas pelas células alimentadoras como laminina, colágeno e fibronectina, entre outras(45). Embora existam uma gama variável de *feeder cells*, e consequentemente o secretoma de cada uma é bastante variável, considera-se que existam fatores críticos para o processo de expansão celular e controle da apoptose que seja expresso de forma comum entre as diferentes fontes. Entre estas fontes encontram-se: monócitos, fibroblastos, macrófagos peritoniais, células do timo de animais de até 15 dias (timócitos), células irradiadas entre elas, a mais conhecida é a linhagem 3T3 de fibroblastos murino irradiada.

Para garantir que as *feeder cells* não superem as células alvo cultivadas, é necessário mantê-las em um estado não multiplicador, mas metabolicamente ativo. Os dois tratamentos mais comumente usados para a interrupção do crescimento de *feeder cells* são a γ irradiação e o uso da mitomicina C(46).

Com o crescimento dos trabalhos de vesículas extracelulares (VEs) que são como pequenas partículas heterogêneas produzidas pelas células animais e estão envolvidas na comunicação/interação célula-célula, cresceu o interesse de se usar o meio condicionado produzido por células tronco mesenquimais como fonte de fatores de crescimento na técnica de hibridomas, principalmente pelo alto valor do soro fetal bovino (SFB), sua heterogeneidade e a grande dificuldade em se ter SFB de boa qualidade em função de seu alto custo. Além disto, existe um esforço mundial na redução do SFB em cultura celular (47)(48)(49).

1.4.2 Meio condicionado de Células tronco murinas como fonte de fatores de crescimento para a fusão celular

Diversos estudos demonstraram o potencial anti-inflamatório das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM_{ta}), de forma bastante clara, em humanos(50)(51)(52). As vesículas extracelulares (VE) presentes no meio condicionado (MC) demonstraram mediar os efeitos citoprotetores do secretoma de CTM_{ta} humano(53). O papel das VE nos efeitos anti-inflamatórios das CTM_{ta} de camundongo não é conhecido(54), mas sabe-se que o MC CTM_{ta} e sua fração solúvel reduzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias em diversas espécies.

Diante destas recentes publicações postulou-se que este fator poderia ser benéfico como substituto do soro fetal bovino (SFB), ou ainda, como aditivo na presença de pequena concentração de SFB entendendo que um dos principais modos de ação do meio condicionado de CTM seja o efeito parácrino, mediado pelo amplo repertório de moléculas bioativas secretadas. Este secretoma é constituído por uma variedade importante de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos ligados a vesículas solúveis e extracelulares (VE). O secretoma pode promover/induzir a regeneração endógena celular e modular a resposta imune(55). Mas não há descrição desta aplicabilidade no escopo de produção de hibridomas. No entanto, como as células recém fusionadas dependem de um arsenal de proteínas auxiliaadoras na sua reconstituição e reorganização, inclusive nuclear, acreditamos que o uso de meio condicionado espécie específico possa trazer benefícios para esta plataforma tecnológica.

1.4.3 – Lisado de células do timo

As células de timo de camundongo Balb/C de até 15 dias de vida são utilizadas de longa data como células alimentadoras. No entanto, cada vez mais, existem restrições dos comitês de ética e pesquisa no sacrifício de animais recém-nascidos para esta finalidade. Diante da importância e da experiência do grupo no uso destas células e da sua importância, diante de tudo que já foi exposto até o momento, optou-se por usar animais de descarte, desta idade, para recuperar o timo e lisar as células para posteriormente dosar os fatores de crescimento e analisar seu desempenho como integrante dos protocolos de hibridomas. Esta idéia surgiu diante

da possibilidade de ser mais fácil o armazenamento do lisado e dos hormônios derivados da lise, a -80°C para a utilização no momento ideal.

Sabe-se que o timo produz uma infinidade de polipeptídeos envolvidos no processo de proliferação e maturação dos linfócitos, outras moléculas inibidoras de diversos patógenos (com destaque atualmente para COVID-19) além de muitos outros hormônios como a timosina(56)(57).

1.5 Problemática da hemorragia feto materna

Hemorragia feto-materna (HFM) é a transferência de sangue fetal para a circulação sanguínea materna, durante a gravidez, devido à ruptura na membrana vâsculo-sincicial da placenta (58)(59).

No feto existem antígenos eritrocitários de origem paterna, estes são responsáveis pela aloimunização materna e podem pertencer a numerosos sistemas, com poder antigênico variável, porém Levine et al., em 1941, já apontavam que a incompatibilidade Rh entre mãe e feto era responsável por 95,0% dos casos da doença hemolítica perinatal, sendo o antígeno D notoriamente o mais implicado(60).

A HFM pode ser resultado de procedimentos obstétricos invasivos, trauma, descolamento de placenta e aumento do trabalho de parto com ocitocina, entre outros(61)(62). Além disso, relatos de casos descreveram uma possível associação de HFM com outras gravidezes, pré-eclâmpsia ou a colocação de cateter de pressão intra-uterina. Geralmente levam a consequências adversas na gravidez, incluindo natimortos, encefalopatia hipóxico-isquêmica, prematuridade e anemia neonatal grave(62).

A detecção de células fetais no sangue materno é necessária para a confirmação da HFM. O teste mais utilizado para essa detecção continua sendo o teste de Kleihauer-Betke, porém também existem outros métodos como citometria de fluxo, teste de roseta, teste de gel e cromatografia líquida(63).

O teste da eluição ácida (K-B), por Kleihauer et al., em 1957, por meio da resistência à eluição ácida de hemácias fetais contendo hemoglobina fetal (HbF) consegue diferenciar hemácias fetais das hemácias adulta materna. Embora o teste de Kleihauer seja sensível, a sua precisão é argumentada, por causa da variabilidade do operador, baixo nível reprodutibilidade, má preparação da técnica e

falta de padronização entre os laboratórios e indivíduos. Além disso, o teste de diferenciar entre eritrócitos fetal e hemoglobina “F” adulta podem levar a falsos diagnósticos positivos devido ao aumento níveis de células HbF maternas como resultado de variações fisiológicas durante gravidez ou características como talassemia, anemia falciforme ou persistência hereditária de Hb fetal (62)(64).

Considerando-se os problemas com Teste de Kleihauer, uma nova tecnologia usando citometria de fluxo para detecção de HbF foi introduzida. A citometria de fluxo é mais sensível e precisa, além disso, ela é capaz de distinguir células fetais de células adultas. No entanto, citômetros de fluxo são caros e geralmente estão disponíveis apenas nos grandes centros e exige pessoal com conhecimentos específicos para operar o analisador.

Tendo em vista a importância do diagnóstico laboratorial da HFM foi desenvolvida por Nishio, 2019 (34) a proposta da construção de imunossensor para detecção de amostras de sangue fetal na corrente sanguínea materna. E como mencionado anteriormente, o respectivo estudo e a produção de um anticorpo monoclonal anti-i, um marcador de hemácias fetais, auxiliaria futuramente no imunodiagnóstico da HFM, expondo como exemplo, a construção de imunossensores.

2 JUSTIFICATIVA

Os precursores dos grupos sanguíneos ABO incluem as estruturas *I* (i grande) e *i* (i pequeno) que são estruturas relacionadas, pois o antígeno *i* é um precursor do *I*. Ao nascimento, existem grandes quantidades de *i* na superfície da hemácia fetal e quantidades indetectáveis nas hemácias adultas. À medida que ocorre o amadurecimento das hemácias com hemoglobina fetal sendo substituída por hemoglobina adulta, a expressão destes antígenos inverte. Progressivamente o antígeno *i* dá lugar ao *I*. É exatamente esta propriedade que se deseja explorar com a produção de um anticorpo monoclonal murino dirigido contra estruturas *i* o qual poderia ser usado futuramente no imunodiagnóstico da HFM. Levando em consideração a ausência de um anticorpo de especificidade anti-i no mercado. Neste projeto o objetivo se relaciona a identificação de hemácias fetais na circulação materna. Outros marcadores puderam ser identificados como glicoproteínas

receptoras de trombospondina, colágeno, LDL oxidado, e hemácias infectadas por parasitas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter anticorpo monoclonal murino de especificidade anti-*i* ou de outra especificidade expressa sobre a membrana das hemácias.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Obter AcMm anti-*i* e caracterizar sua especificidade contra hemácias fetais quando comparado com hemácias adultas.

3.2.2 Identificar eventuais outros anticorpos obtidos caracterizando-os e determinando provável aplicabilidade.

3.2.3 Avaliar a contribuição de meio condicionado obtido de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo murino (MC-CT_{am}) na efetividade da fusão celular comparando com método clássico (*feeder cells*) e lisado de células mononucleares do timo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido à análise pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos recebendo sua aprovação e catalogado como CAAE nº: 32650620.7.0000.5411. Houve a participação de outros setores como o Serviço Ginecologia e Obstetrícia e Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Botucatu e após a aprovação do mesmo pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos.

Metodologicamente foi composto pelas seguintes fases:

Fase 1 – Identificação e obtenção de amostras de pacientes portadores de cisto de ovário, de sangue de cordão umbilical e sangue de doador saudável e pacientes portadores da Síndrome de Aglutinina Fria.

Fase 2 – Produção do Anticorpo monoclonal de interesse com a análise de desempenho dos aditivos propostos

Fase 3 – Caracterização da especificidade do anticorpo obtido

4.1 Fase 1 – Identificação e obtenção de amostras de pacientes portadores de cisto de ovário, de sangue de cordão umbilical, sangue de doador saudável e pacientes portadores da Síndrome de Aglutinina Fria

4.1.1 Identificação de paciente portadora de cisto de ovário para obtenção do Líquido utilizado para etapa de imunização

Foi identificada a paciente submetida a cirurgia para exérese de cisto de ovário junto ao serviço de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu e o Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, sendo apresentado à paciente a problemática do projeto e a necessidade de se obter, parte do líquido contido no cisto de ovário, que pode chegar a mais de 1,5L. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação em Pesquisa (TCLE) foi assinado e a amostra obtida. Abaixo, na Figura 3, está representado o gigantismo que pode chegar um cisto de ovário. Foram coletados 20 mL de líquido de cisto de ovário, mantido aliquotado a -80°C (oitenta graus negativos) até o momento da imunização. O líquido de cisto ovariano foi utilizado como fonte de antígeno i. A amostra de 1 paciente foi suficiente ($n=1$).

O resultado da análise patológica do Serviço de Patologia do Hospital de Botucatu desse material proveniente dessa paciente do tipo sanguíneo A positivo foi Cistoadenoma mucinoso.

Figura 3- Cisto de ovário, como fonte de antígeno i.



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

4.1.2 Obtenção de amostras de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para as etapas de imunização, *screening* e caracterização

Para esta etapa houve a colaboração com projeto já aprovado e em andamento, parecer intitulado, “Validação de imunossensor para detecção de hemorragia feto– materna (HFM)” em desenvolvimento junto ao Hemocentro da UNESP de Botucatu, já aprovado C.A.A.E nº 20499019.4.0000.5411. Neste projeto já aprovado, houve amostras excedentes as quais seriam descartadas. Estas amostras coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA, armazenadas em geladeira e utilizadas em menos de 3 dias após a coleta, foram otimizadas para o presente trabalho.

Para a imunização de camundongos foi usado obrigatoriamente hemácias fetais de recém-nascidos de tipo sanguíneo O POSITIVO. No entanto, para o *screening* e caracterização a tipagem sanguínea não foi levada em consideração.

4.1.3 Obtenção de amostras de doadores de sangue saudáveis do sexo masculino para a etapa de caracterização

Para as etapas de confirmação da especificidade houve a necessidade de amostras de indivíduos adultos, saudáveis, comprovadamente não portadores de hemoglobinopatias e do sexo masculino. Foram selecionados 5 doadores de sangue que fazem a doação rotineira no Hemocentro de Botucatu. Após a explanação dos objetivos do trabalho e a assinatura do TCLE, foi coletado amostra de sangue em tubo contendo anticoagulante EDTA (n=5). A tipagem sanguínea dos doadores não foi levada em consideração.

4.1.4 Identificação de pacientes portadores da Síndrome de Aglutinina Fria para obtenção de amostras de soro para controle positivo no momento da caracterização e validação do anticorpo obtido

Nesta fase foram obtidas amostras de pacientes encaminhadas para Agência Transfusional do Hospital das Clínicas. Uma vez identificada a amostra com Pesquisa de Anticorpos Irregulares positiva, e perfil de painel de identificação compatível com anti-I e anti-i, foi solicitado a(o) paciente a doação de 1 mL de amostra de soro para pesquisa, após a assinatura do TCLE. Estas amostras foram utilizadas como controle positivo de reação no momento da caracterização dos AcMm produzidos.

4.2 Fase 2 – Produção do Anticorpo monoclonal murinho anti-i

A metodologia utilizada para a produção do anti-i foi padronizada pelo Laboratório de Engenharia Celular do Laboratório de Biotecnologia Aplicada de Botucatu, baseado nos dados de Kohler e Milstein (1975). Esquemáticamente, as cinco fases da produção do anticorpo estão descritas no Quadro 1 abaixo:

Quadro 1: Etapas da produção do anticorpo monoclonal anti-i.

Fase	Característica	Nome do protocolo	Número de Fusões
Imunização	Antígeno obtido de cisto de ovário	COi	9
	1-Sem purificação		4
	2-Após purificação		5
	Antígeno eritrocitário obtido de sangue de cordão umbilical e placentário	SCUi	21
	1-Hemácias de sangue de cordão a 10%		11
	2-Hemácias de sangue de cordão a 3%		4
	3-Hemácias de sangue de cordão a 5% com papaína		6
	Fusão Celular	Método Químico – Polietileglicol	
Screening	Hemaglutinação em microplacas e/ou tubos com hemácias de sangue de cordão a 5%		
Clonagem	Técnica de diluição limitante		
Caracterização	Painel de Identificação de antígenos eritrocitários, Citometria de Fluxo e <i>Western blotting</i>		

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

4.2.1 Protocolo de imunização

O protocolo de imunização foi dividido didaticamente em 3 períodos:

- ✓ Imunização de camundongos com hemácias fetais de SCUP a 10%.
- ✓ Imunização camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário não purificado.

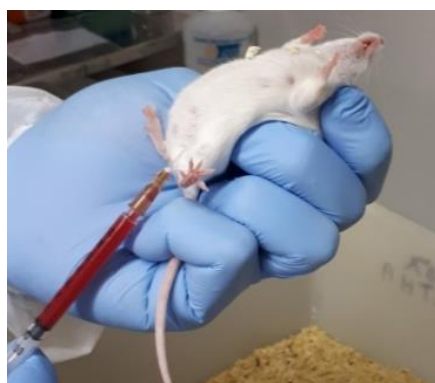
✓ Imunização camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% tratadas com enzima papaína e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário purificado.

4.2.1.1 Imunização de camundongos com hemácias fetais de SCUP a 10%

Como de início não havia amostra de líquido de cisto ovariano humano, apenas o protocolo de imunização de camundongos por hemácias de sangue de cordão umbilical (SCU) denominado de SCU_i foi realizado.

Foram utilizados 11 animais Balb/C fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas, mantidos em condições ideais de biotério. Os animais receberam hemácias em suspensão a 10% de SCU por via intraperitoneal (IP), como demonstra a Figura 4 no ciclo de D1, D15 e D30 e no *booster*, na sexta-feira anterior à fusão (sempre na terça-feira) receberam a dose por via intravenosa (IV) (50µL de suspensão de hemácias fetais a 10% nas 6 primeiras fusões e nas próximas a 1%). Conforme Quadro 2.

Figura 4: Inoculação de suspensão de SCU no camundongo, via intraperitoneal



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Quadro 2: Protocolo SCU_i. Imunização dos camundongos com hemácias fetais de SCUP a 10%.

DIA		O QUE INJETAR	VIA
D+1, D15 E D30	Imunização	200µL SCU-10%	IP
Sextas feiras antes da fusão	<i>Booster</i>	50µL SCU-10% (1ª Fusão a 6ª fusão) 50µL SCU-1% (6ª Fusão a 11ª fusão)	IV

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

4.2.1.2 *Imunização camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário não purificado*

Como não foi obtido o híbrido de interesse o qual secretasse anticorpos contra hemácias fetais através do protocolo de imunização com hemácias de SCUP a 10%, houve a necessidade de repetir o protocolo SCU_i, porém com ajustes de suspensão de SCU, além de iniciar o protocolo com líquido de cisto de ovário denominado CO_i. Conforme demonstra o Quadro 3.

Ao iniciar esse período de imunização, 10 animais receberam as primeiras injeções dos imunizantes, porém dois animais morreram em dias diferentes por motivo desconhecido, sendo que um animal do foi protocolo SCU_i e um animal do protocolo CO_i.

Dessa forma, foram imunizados 4 animais Balb/C fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas, para protocolo SCU_i e 4 animais para o protocolo CO_i.

Quadro 3: Protocolo SCU_i e protocolo CO_i. Imunização de camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário não purificado

DIA		SCU _i		CO _i	
		O que injetar	Via	O que injetar	Via
D+1, D15 e D30	Imunização	100µL SCU – 3%	IP	100µL de líquido de cisto de ovário humano (100µg por animal)	IP
Sextas feiras antes da fusão	Booster	50µL SCU- 3%	IV	50µLde líquido de cisto de ovário humano (100µg por animal)	IV

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Nesta imunização foi utilizado o líquido de cisto de ovário puro, isto é, sem passar por processos de purificação. A dose de 100µg de proteína por animal foi estabelecida para injetar no camundongo, por via intraperitoneal e/ou via intravenosa, com necessidade de ajustes de concentração proteica, utilizando-se água para injeção para se obter a concentração desejada. A quantificação realizada no equipamento NanoDrop com comprimento de onda específico de proteínas, 280nm, pois o fluido do cisto ovariano é rico em proteínas.

4.2.1.3 Imunização camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% tratadas com enzima papaína e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário purificado

Fez-se outra imunização, pois ainda não foi possível obter um clone de anticorpo monoclonal de interesse. Nessa 14 animais Balb/C foram todos imunizados para protocolo SCU_i e CO_i. Conforme Quadro 4.

Quadro 4: Protocolo SCU_i e protocolo CO_i. Imunização de camundongos com hemácias fetais de SCUP a 3% tratadas com enzima papaína e imunização de camundongos com líquido de cisto de ovário purificado

DIA		SCU _i		CO _i	
		O que injetar	Via	O que injetar	Via
D+1, D15 e D30	Imunização	100uL SCU- 3% -Hemácias tratadas com enzima papaína	IP	100uL líquido de cisto de ovário humano- líquido do cisto ovariano purificado	IP
Sextas feiras antes da fusão	Booster	50ul SCU- 3% - Hemácias tratadas com enzima papaína	IV	50uL líquido de cisto ovariano purificado (100ug por animal) + adjuvante	IV

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Nota-se diferença entre os protocolos anteriores sobre o que injetar no animal. A hemácias foram tratadas com papaína, porque a expressão do antígeno i é aumentada após o tratamento com essa enzima.

Tratamento de hemácias com a enzima papaína:



Blanchard D. et al, em 1992 também imunizaram camundongos Balb/c por injeções intraperitoneais de hemácias papainizadas (65), comprovando assim que tratamento enzimático realizado não é tóxico ao animal.

Sabe-se que o fluido do cisto ovariano é rico em proteínas, oligossacarídeos e glicoproteínas, sendo assim é fonte de substâncias de grupos sanguíneos. Devido a isso, o fluido foi utilizado como fonte de imunógeno e para a melhor expressão do antígeno i esse líquido precisou ser purificado. De acordo com Maisonrouge-

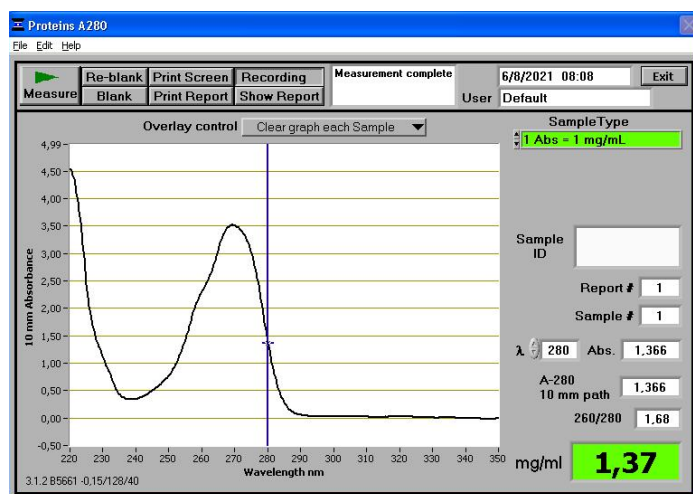
McAuliffe, F. and Kabat, E.A., 1976, a purificação envolve etapas de digestão do material por pepsina, precipitação por etanol e acetato de sódio e extração por insolubilidade de fenol (66).

Protocolo de purificação do líquido do cisto de ovário baseia-se primeiramente na solução feita com 2,5 g de ácido cítrico com 50mL de água injetável estéril, ajustado o pH para 1,5 a 2,0 (ajustou-se com HCl). Foi adicionado 3mg de PEPSINA em 10mL dessa solução, homogeneizado e incubado a 37°C por 10min. Foi adicionado 2mL do líquido do cisto de ovário, homogeneizado e pH entre 1,5-2,0 (ajustou-se com solução de ácido cítrico) e adicionado 2mg de PEPSINA, pH entre 1,5-2,0 (ajustou-se com solução de ácido cítrico), incubado o conjunto a 37°C por 5 dias. Após esse período adicionou-se 3,6g de acetato de sódio e 19mL de etanol para centrifugar a 3000rpm, 30min a 4°C, guardou-se o sobrenadante e adicionou-se 90% fenol no precipitado, centrifugou-se a 3000rpm, 30min a 4°C, guardou-se sobrenadante. O pellet foi ressuspendido com água para injeção injetável, filtrado por Amicon® de 3kDa, houve ajuste de concentração para 100ug por animal, Figura 5 o adjuvante Al (OH)₃ foi adicionado e inoculado no camundongo.

Albert Wu, 1976 em seu livro menciona que o antígeno i é insolúvel em fenol, dessa forma, pressupõe que este antígeno esteja no pellet da centrifugação realizada com fenol. (40)

Os adjuvantes aumentam a resposta inflamatória no local da imunização e ativam células imunocompetentes ou apresentadoras de antígeno, ou seja, são usados para ajudar o antígeno a desencadear uma resposta imune rápida e intensa utilizando a menor quantidade de antígeno possível(67).

Figura 5: Quantificação de proteínas do líquido do cisto de ovário purificado.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021. Legenda: Quantificação de proteínas do líquido de cisto ovariano purificado em absorbância 280nm. Observa-se pelo pico em 270nm demonstrando grande quantidade de fenol na amostra.

4.2.2 Animais, esplenectomia e timectomia

Foram utilizados 33 animais Balb/C, mantidos em condições ideais de biotério, sendo animais fêmeas com idade entre 4 e 6 semanas, para proceder-se a esplenectomia. Doze animais receberam a injeção de líquido de cisto de ovário, protocolo COi e 21 animais receberam hemácias em suspensão de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), protocolo SCU_i. A esplenectomia desses animais efetuou-se após todas as inoculações previstas, portanto os animais estavam imunizados contra o líquido de cisto de ovário e contra hemácias fetais, dependendo do protocolo seguido.

Os animais de idade entre 2 e 3 semanas foram selecionados para proceder-se a timectomia, remoção do timo para extração das células deste órgão para obtenção das *feeders cells*, células de companhia secretoras de fatores de crescimento necessárias na etapa de fusão e clonagem celular. Nesta etapa é importante que os animais sejam os mais novos possíveis, preferencialmente de 2 semanas de vida.

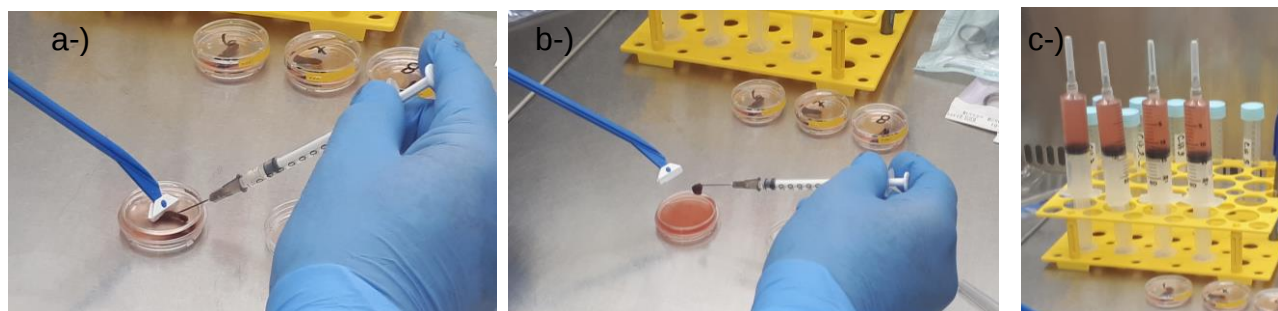
Ambos os grupos de animais foram mantidos no biotério da Unidade de Pesquisa Animal UPEA – UNIPLEX – UNESP, biotério este que conta com sistema de ar-condicionado central mantendo os animais a 22°C (padrão). Para os procedimentos de esplenectomia e timectomia os animais foram anestesiados com xilazina 5 mg/kg por via intraperitoneal e ketamina 80 mg/kg pela mesma via, após

os animais foram induzidos a morte com uma sobredose de tiopental de 150mg/kg por via intraperitoneal.

Após procedimento anestésico, os animais foram higienizados pela passagem de Hipoclorito a 1% e posteriormente de álcool 70°, colocados sobre leito cirúrgico previamente preparado, em cabine de segurança biológica Classe II-A. Após a incisão de pele e retirada tanto do timo como do baço, foi necessário cuidado para não lesionar o órgão que é extremamente frágil, e o rompimento da cápsula, aumenta a possibilidade de predominância de fibroblastos na cultura celular após fusão. Dessa forma, órgãos foram colocados em Placa de Petri para se proceder a dissociação e a obtenção das células em suspensão, conforme Figura 6.

Durante a dissociação, o órgão foi segurado pelo *cell scraper* e foram feitos vários furos para permitir que material, líquido interno, saia por esses poros após a inserção do meio de cultura Hepes (RPMI + HEPES), através de uma agulha de calibre pequeno. Esses movimentos foram repetidos várias vezes até notar diferença na cor e aspecto do líquido. Logo após, 11mL desse material é posto em seringas com o intuito de decantar por 10 minutos e assim descartar 1mL do sobrenadante e os 10mL serem armazenadas em tubo cônico em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C até o momento da fusão celular.

Figura 6: Diferentes etapas de extração dos linfócitos esplênicos para a fusão celular



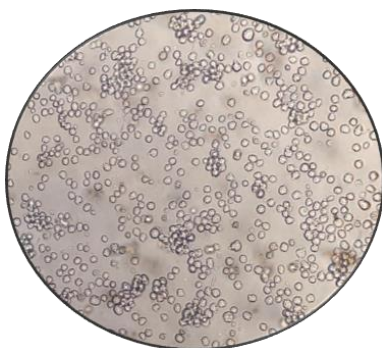
Fonte: Arquivo pessoal, 2021. **Legenda:** a-)Baço em uma placa de Petri. Observa-se que no início da dissociação o líquido (meio HEPES) está com sua cor original. b-)Cor do líquido está mais escura, demonstrando a presença de células nesse líquido após dissociação. c-)Decantação das células junto ao meio HEPES.

4.2.3 Mieloma múltiplo murino

Após completado o ciclo de imunização clássica, foi procedida a esplenectomia da animal e posterior extração dos linfócitos. Concomitantemente, a amplificação do clone de mieloma murino, NS1, esteve em expansão.

Na tecnologia de hibridomas, há a fusão dos linfócitos B do animal previamente imunizado com as células de mieloma múltiplo murinho, NS1. Para que ocorra a fusão, 15 dias antes essas células doadas pelo *Institute de Transfusion Sangüine de Paris/Institute Pasteur*, precisam ser descongeladas com meio HEPES já que elas permanecem armazenados em containers ou a freezer a -80°C e assim serem cultivadas em Meio Completo (RPMI-1640 + aditivos+ 20% Soro fetal bovino), em estufa de CO_2 a 5% e a temperatura de 37°C , como ilustra a Figura 7.

Figura 7: Fotomicrografia obtida por microscopia invertida da cultura de NS1(mieloma murino) com alta viabilidade e confluência. Aumento 10X



Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

4.2.4 Fusão

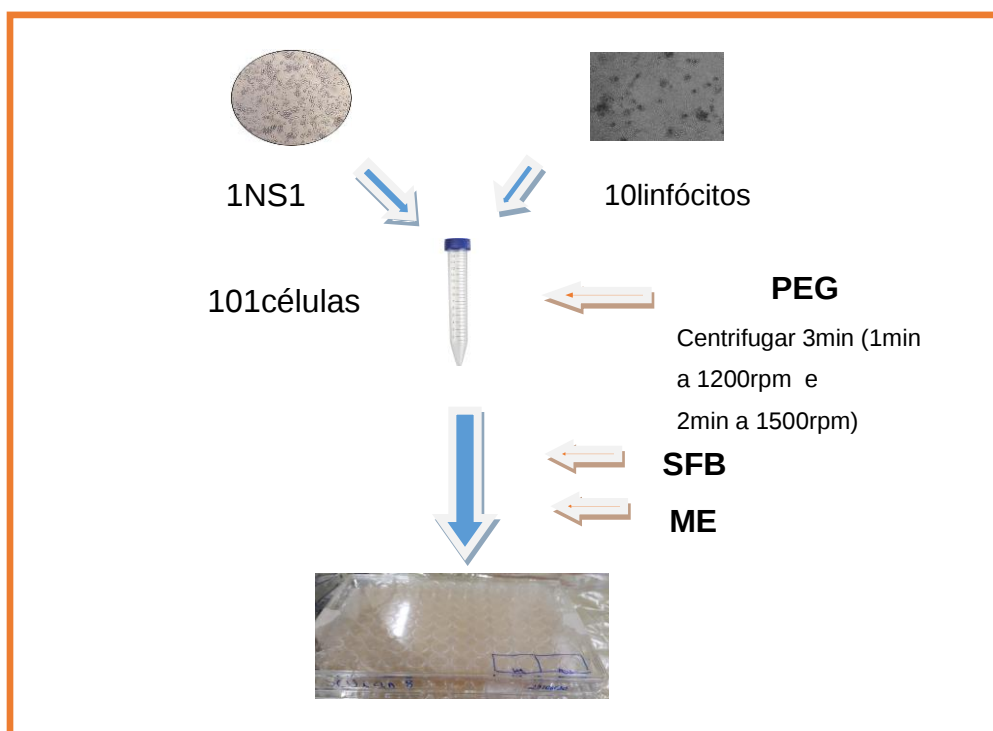
O procedimento da fusão foi realizado conforme Procedimento Operacional Padrão (POP) do LEC(68).

Para verificar se há presença de células vivas foi realizado um teste de viabilidade, através de contagens celulares do NS1 e dos linfócitos em câmara de Neubauer utilizando o corante Azul de Tripan. Se a porcentagem de viabilidade ($>95\%$), a quantidade for suficiente e adequada para o procedimento, ocorre a fusão.

Na fusão, usou-se a relação 1:10, isto é, 1 NS1, em fase exponencial de crescimento para cada 10 linfócitos B dos animais imunizados. Após cálculos e a somatória de células, o PEG, PM 4.000 (1mL a cada 100×10^6 células) foi adicionado por ser um produto químico que agride a membrana celular e gera poros, permitindo a fusão do material genético entre as células em um processo de centrifugação. Posteriormente adicionou-se o Soro Fetal Bovino (5mL a cada 100×10^6 células) com a finalidade de “cicatrizar” a membrana celular e o Meio Enriquecido (RPMI-1640 mais aditivos) (19mL a cada 100×10^6 células) por fornecer os nutrientes e

substâncias essenciais para o cultivo celular. As células fusionadas foram distribuídas em placas de células em suspensão de 96 poços, recebendo cada poço o volume de 100 μ L e mantidas em estufa de CO₂ a 5% e a temperatura de 37°C. Lembrando que, é importante separar dois poços na placa para o controle de linfócitos imunizados e dois poços de NS1 em cada fusão. Como demonstra a Figura 8.

Figura 8: Esquema da fusão celular.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

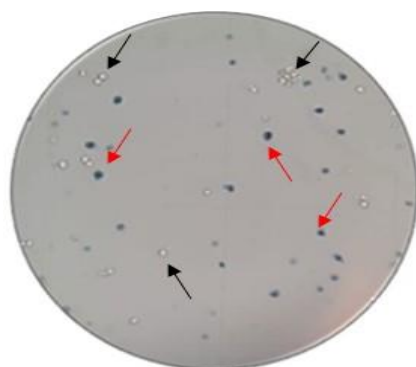
O meio HAT (Meio completo + HAT), foi adicionado no dia seguinte da fusão. O objetivo de se adicionar esse meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina é para selecionar somente as células HGPRT (hipoxantina-fosforibosil-transferase) positivas, no caso os híbridos que sobrevivem e conseguem entrar em divisão celular, por herdarem características dos linfócitos dos camundongos. No caso da linhagem NS1, esta células não sobrevivem, pois são HGPRT negativas (69). Lembrando que os linfócitos esplênicos não fusionados não tem capacidade de divisão celular, após alguns dias eles morreram naturalmente sem se multiplicar. Este meio foi utilizado do dia D+1 ao D+15 após a fusão celular. Do dia D+16 ao D+30, foi utilizado meio HT, meio contendo hipoxantina e timidina, sem aminopterina. A troca de meio foi a cada 48 horas ou conforme necessidade.

4.2.4.1 *Feeder cells*

As *feeder cells*, células de companhia secretoras de fatores de crescimento necessários na etapa de fusão e clonagem celular. Elas são obtidas através da timectomia e dissociação do timo. Seu mecanismo de ação foi descrito no item 1.4.1 da Introdução deste trabalho.

Na fusão foram adicionadas 100000/poço no D+4. Antes de serem acrescentadas na cultura é necessário fazer a sua contagem em câmara de Neubauer com corante azul de Tripán e fazer cálculos de viabilidade. Na fusão SCUi 4, 5 e 6, conforme Figura 9 a maioria das células estavam mortas, impossibilitando a adição dessas nos poços.

Figura 9: Aspecto microscópico da visualização da técnica de viabilidade celular por Azul de Tripán



Fonte: Arquivo pessoal, 2020. Microscopia óptica comum com visualização da técnica de viabilidade por Azul de Tripán em câmara de Neubauer evidenciando baixa viabilidade dos timócitos. Células mortas na cor azul (seta vermelha) e células viáveis refringentes (seta preta).

Na clonagem celular, após a timectomia as *feeders cells* permaneceram em estufa de CO₂ a 5% e a temperatura de 37°C, mantidas em tubo cônico de 15mL junto a Meio Completo por um dia para o controle microbiológico. Após o controle, elas foram plaqueadas em placas de 96 poços sendo que cada poço possuía 100000 células por poço. Transcorrido 1 dia, os hibridomas foram adicionados a esses poços.

4.2.4.2 *Meio condicionado murino*

As *feeder cells* foram substituídas por meio condicionado de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de origem murina. Este material já havia sido produzido e armazenado no Laboratório em projeto de Iniciação Científica e

estava mantido a -80°C . Resumidamente, as CTM_{ta} foram expandidas até atingirem a confluência de 70%, na presença de 10% de soro fetal bovino quando então foram submetidas a técnica de wash out. As células foram lavadas 3 vezes na solução de Hanks (Sigma®) e mantidas em DMEM-F12 sem a presença de vermelho fenol, por 24 horas. O sobrenadante foi removido e as células alimentadas com DMEM-F12 aditivado com antibióticos e antimicóticos, L-glutamina e aminoácidos essenciais e não essenciais. As células permaneceram em contato com este meio por 48 horas, quando o mesmo, agora denominado meio condicionado de célula tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo murino (MC-CTM_{tam}) foi coletado e submetido à clarificação para remoção dos debris. Este material foi mantido criopreservado a -80°C até o momento do uso. No projeto anterior foram quantificadas as citocinas produzidas no MC-CTM_{tam} utilizando Kit CBA Cytoflex, pelo método de Citometria de Fluxo: TNF, IFN- γ (pró-inflamatórias) e IL-4, IL-10 (anti-inflamatórias). A concentração média de TNF era de 6,64 pg/mL, IFN- γ se manteve abaixo do limite de detecção, e a concentração das citocinas IL-4 e IL-10 foram respectivamente de 3,38 e 10,35 pg/mL respectivamente. Foi procedido o descongelamento a 37°C , centrifugado a 4000rpm por 15 minutos a 4°C , recuperado o sobrenadante e submetido à filtração com poro de $0,22\mu\text{m}$. Após estas etapas, foi aliquotado em frascos de 10mL a cada 500mL de meio de cultura HAT. O meio condicionado murino junto com o meio de cultura HAT foi adicionado no segundo dia após a fusão nas placas de 96 poços até ao D+15, com troca de meio a cada 48 horas.

4.2.4.3 *Lise de timócitos*

Hormônio derivado do timo, é uma solução resultante da lise dos timócitos através de congelamento e adição de água destilada aos timócitos, liberando apenas o hormônio de crescimento de células, a exemplo do que o grupo já realizara com hormônios derivados de plaquetas(70).

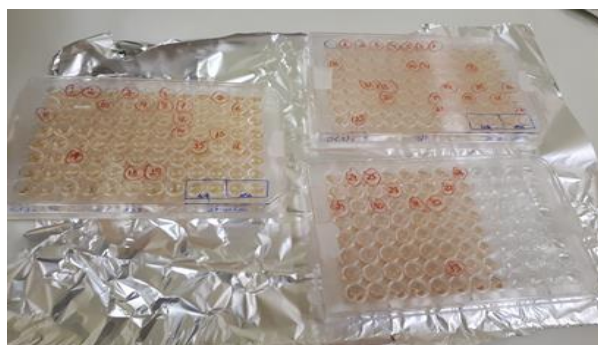
As *feeder cells* foram substituídas por essa solução em algumas fusões.

Esse hormônio junto ao meio de cultura HAT no D+4 foi adicionado nas placas de 96 poços.

4.2.5 **Screening**

Após a fusão celular, os híbridos criados foram monitorados diariamente para que seja feita a seleção da coleta de sobrenadante de cultura (SNC) dos poços que apresentou confluência maior que 80%. Os poços que apresentaram esses híbridos foram enumerados para melhor identificação e visualização nas placas

Figura 10: Placas de 96 poços apresentando híbridos enumerados para realização do *screening*



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Ao decorrer na fusão houve placas que todos os poços havia híbridos com confluência maior que 80%, sendo necessário testar todos os poços.

Coletou-se 100µL de SNC para se processar o teste de hemaglutinação em placas de 96 poços ou em tubos, dependendo da quantidade de híbridos obtidos.

No Quadro 5 demonstra a realização do *screening* de acordo com a fusão e protocolo de imunização.

Quadro 5: *Screening* de acordo com a fusão e protocolo de imunização

Fusão	<i>Screening</i>
SCUi 1 a SCUi 11	100µL de SNC + 50µL de suspensão de hemácias de SCU a 5% Solução Salina
SCUi 12 e 13, COi 1 e 2:	100µL de SNC + 50µL de suspensão de hemácias de SCU a 5% Solução Salina
SCUi 14 e 15, COi 3 e 4	100µL de SNC + 50µL de suspensão de hemácias de SCU a 5% Solução Salina Leitura após 15 minutos a 4°C e leitura após 15 minutos a 37°C

Fonte: Arquivo pessoal, 2020.

Os híbridos reagentes foram repicados para placas de 24 poços com intervalos de pelo menos 48 horas sem troca de meio de cultura, por três vezes.

4.2.6 Protocolo de tolerização

Nas imunizações mencionadas anteriores não foi identificado nenhum híbrido de interesse, então a caracterização teve enfoque nos híbridos obtidos em protocolo realizado no Laboratório de Biologia Celular pela doutoranda Suelen Nishio.

Nesse protocolo os animais foram imunizados através de inoculações intraperitoneais (IP) nos ciclos de 1 a 5 e endovenosa (EV) na veia caudal no *Booster*.

A etapa de tolerização foi realizada nos ciclos de 1 a 4. A cada ciclo do 1 ao 4 é composto por D+1, onde o animal recebeu suspensão de hemácias de sangue adulto a 10%, o qual é um antígeno de não interesse e no D+2 e D+3, por um quimioterápico, a ciclofosfamida (CFM) na concentração de 100 mg/kg, a fim de não o reconhecer como estranho. Após 15 dias do D+1 do ciclo 1 se inicia o ciclo 2 e assim sucessivamente até o 4º ciclo.

No 5º ciclo, o animal foi imunizado com suspensão de hemácias de sangue de cordão umbilical a 10% contendo o i, antígeno de interesse, em intervalos de 7 dias por 3 vezes.

Essas etapas de tolerização e imunização são necessárias, pois os animais recebem amostras de sangue de cordão umbilical contendo hemácias adultas e fetais.

Dessa forma, foi inoculado no animal hemácias adultas nos primeiros ciclos, provocando tolerização, ou seja, a resposta imune do camundongos foi modulada com ajuda do quimioterápico, evitando que no ciclo 5, imunização com as hemácias de sangue de cordão, eles respondam imunologicamente contra as hemácias adultas e reconheçam como estranho o antígeno i das hemácias fetais.

Antecedendo a fusão foi aplicada uma dose reforço (*Booster*) do antígeno por via EV, para garantir que o antígeno seja percebido pelo sistema imunológico do animal e a resposta imune seja forte e rápida.

Para as análises pós-fusão Polietilenoglicol, o método escolhido do *screening* foi hemaglutinação, devido ao anticorpo de interesse ser contra antígenos de

superfície de hemácias fetais, antígeno i. Foram considerados positivos aqueles que o sobrenadante testado reagiu com suspensão de hemácias fetais a 5%.

Seis híbridos testaram positivo, sendo que cada híbrido foi congelado em tubos criogênicos contendo Soro Fetal Bovino e 10% de DMSO em freezer -80°C, para um banco de células e depois cultivados em frascos por 10 a 14 dias, sem troca de meio, para posterior retirada do sobrenadante de cultura (SNC), pois nele que se encontra o anticorpo.

Foram armazenados em freezer -80°C cinco sobrenadantes de cultura dos respectivos híbridos: HemF1-46, HemF1-85, HemF3-116, HemF3-121, HemF3-122.

Como o sobrenadante de cultura do híbrido HemF1-88 não estava armazenado, foi necessário descongelá-lo, cultivá-lo em meio completo e coletar seu sobrenadante para os testes de caracterização.

4.2.7 Clonagem

Confirmado a reatividade dos híbridos nos testes com sangue de cordão umbilical, por hemaglutinação, o híbrido HemF1-88 foi submetido à clonagem celular pela técnica de diluição limitante.

Para clonagem, é necessário retirar o timo do camundongo, dissociar o órgão, realizar a contagem celular, efetuar o controle biológico por 24h em estufa de 37°C com CO₂ e plaquear em 4 placas de 96 poços. Cada poço precisa conter 200.000 timócitos para que no outro dia esses timócitos foram observados por microscopia invertida, com intuito de confirmar ausência de contaminação e adicionar a eles as células a serem clonadas. Sendo que, dessas quatro placas, duas vão conter 0,5 célula por poço e as outras duas 1,0 célula por poço.

Foi realizada a contagem celular das células a serem clonadas, as quais estavam sendo cultivadas em Meio Completo. No Quadro 6 abaixo demonstra o número de células utilizadas das placas de 96 poços.

Quadro 6: Quantidade de células para plaquear em cada placa de 96 poços

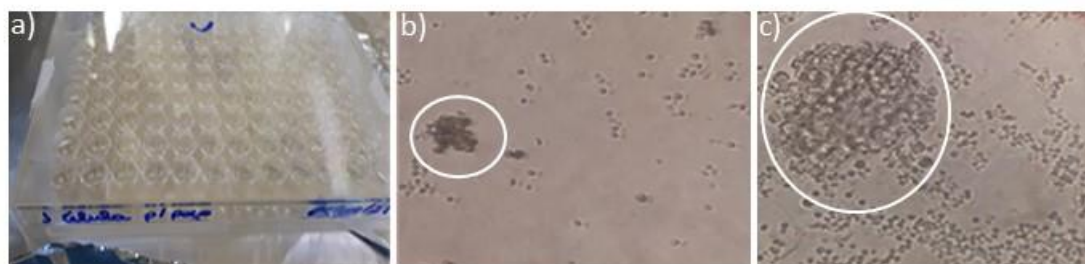
Placas	Número de células
Placa 1 célula por poço	96, para efeito de cálculo, foi utilizado 100 células
Placa 0,5 célula por poço	50 células

Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

No dia seguinte, foi observado e anotado na tampa M ou U. Entretanto na maioria dos poços do dia seguinte não foi identificada células.

Após 4 dias, foi observado poço por poço e reafirmado M ou U, Figura 11, aspirado o sobrenadante e adicionado Meio Completo nos poços. A observação e a troca de meio foi realizada a cada 48 horas.

Figura 11: Aspectos da clonagem celular: Placa de 96 poços com marcação de U (azul) e fotos do clone em diferentes dias



Fonte: Arquivo pessoal, 2022. Legenda: a) foto da placa de clonagem celular, 96 poços, com a marcação da visualização de um clone (U azul); b) aspecto do clone, por microscopia invertida para cultura celular, campo claro, aumento 5X e c) mesmo clone 24 horas após, aumento 10X.

Quando as células tomaram conta do poço, procedeu-se o *screening* por hemaglutinação em alguns e outras com células únicas e boa confluência por citometria de fluxo e *Western blotting*.

Na Técnica de aglutinação em tubo: 100µL dos SNC foram testados com 50 µL de suspensão de hemácias a 3%. Centrifugou-se, e fez a leitura. Depois incubou-se por 15 minutos a temperatura de 4°C, centrifugou e fez a leitura. Após, os negativos ficaram por mais 15 minutos a 37°C, centrifugou e fez a leitura. Com os negativos procedeu-se três lavagens e adicionou-se a antiglobulina murina, centrifugou-se e fez leitura. Feita leitura em lâmina por microscopia após 4°C e 37°C, para analisar se havia a presença microaglutinados.

As células foram criopreservadas para se manter banco de células produzidas.

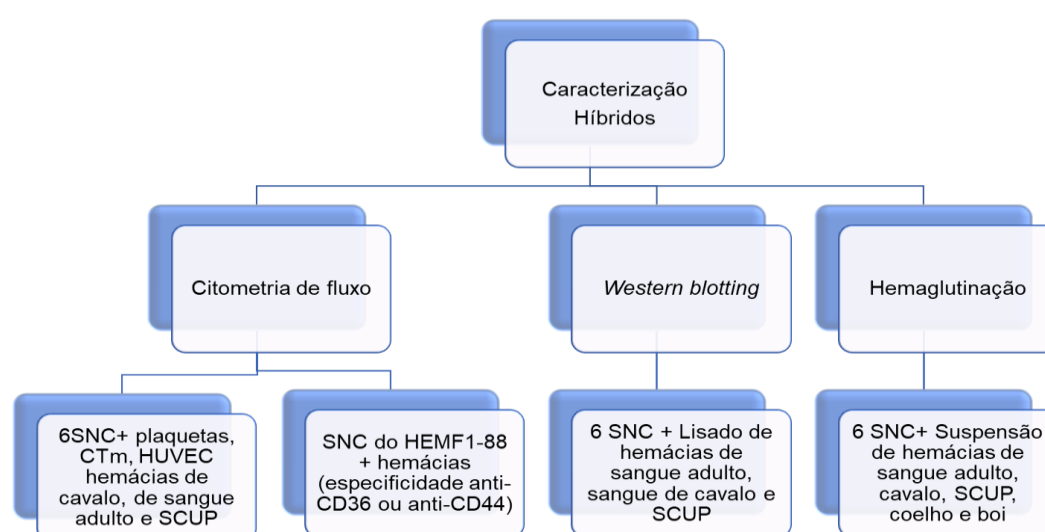
As outras com células únicas e com boa confluência, foram amplificadas para a obtenção de maior quantidade de volume de SNC para proceder a validação da especificidade por citometria de fluxo e *western blotting*.

4.2.8 Caracterização

Os seis híbridos obtidos em protocolo realizado no Laboratório de Biologia Celular pela doutoranda Suelen Nishio foram caracterizados conforme esquema da Figura 12. Lembrando que para a caracterização usou-se o sobrenadante de cultura.

Os testes foram realizados com os híbridos HemF1-46, HemF1-85, HemF1-88, HemF3-116, HemF3-121, HemF3-122:

Figura 12: Esquema da caracterização dos híbridos.



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

4.2.8.1 Hemaglutinação

Para a caracterização dos seis híbridos obtidos, a hemaglutinação foi a metodologia escolhida, pois como os animais foram imunizados com sangue de cordão umbilical é esperado que o híbrido secrete um anticorpo o qual reaja com o antígeno presente em hemácias, ocorrendo uma aglutinação entre antígenos e anticorpo.

Hemácias de cavalos, hemácias de boi, hemácias de adultos doadores de sangue, hemácias de cordão umbilical e painel contendo 16 hemácias comerciais fenotipadas serviram de antígenos para a reação com os anticorpos presentes no sobrenadante de cultura dos híbridos(71).

4.2.8.1.1 Teste com crioaglutinina e SNC.

Primeiramente as hemácias de adultos, cavalo, boi, coelho foram lavadas 3 vezes e do sangue de cordão umbilical 6 vezes.

Feita uma suspensão de hemácias a 3% com solução salina.

- Na Técnica de aglutinação em tubo realizada a 22°C: 100µL dos 6 SNC foram testados com 50 µL de suspensão de hemácias. Incubou-se por 15 minutos a temperatura de 22°C (ambiente), centrifugou e fez a leitura. Após, os negativos ficaram por mais 45 minutos a 22°C, centrifugou e fez a leitura.

- Na Técnica de aglutinação em tubo realizada a 22°C com enzima papaína: 100µL dos 6 SNC foram testados com 50 µL de suspensão de hemácias junto a 50 µL da enzima papaína. Incubou-se por 15 minutos a temperatura de 22°C (ambiente), centrifugou-se e fez a leitura. Após, os negativos ficaram por mais 45 minutos a 22°C, centrifugou e fez a leitura.

- Na Técnica de aglutinação em tubo realizada a 4°C: 100µL dos 6 SNC foram testados com 50 µL de suspensão de hemácias. Incubou-se por 15 minutos a temperatura de 4°C, centrifugou-se e fez a leitura. Após, os negativos ficaram por mais 45 minutos a 4°C, centrifugou e fez a leitura.

- Na Técnica de aglutinação em tubo realizada a 4°C: 100µL dos 6 SNC foram testados com 50 µL de suspensão de hemácias junto a 50 µL da enzima papaína. Incubou-se por 15 minutos a temperatura de 4°C, centrifugou-se e fez a leitura. Após, os negativos ficaram por mais 45 minutos a 4°C, centrifugou-se e fez a leitura.

4.2.8.1.2 Teste com Pannel de hemácias:

Foram testados, a crioaglutinina e todos os SNC dos seis híbridos com 16 hemácias comerciais fenotipadas.

Técnica utilizada: 100µL do SNC com 50 µL das hemácias de pannel. Centrifugou-se logo após e os que resultaram como positivos foram descartados e os negativos foram incubados por 1h a 22°C.

Diluições de 1:5, 1:10 e 1:25, foram testadas com as hemácias comerciais, quando resultaram em positivos, para analisar se o anticorpo presente no SNC possa ter especificidade contra algum antígeno fenotipado da hemácia do pannel.

4.2.8.2 Caracterização imunoquímica da especificidade do anticorpo obtido.

Os SNCs obtidos dos híbridos foram testados por citometria de fluxo e por *Western blotting* no Laboratório do Prof. William Zambuzzi.

4.2.8.2.1 Citometria de fluxo

Reafirmando o perfil, amostras de SNC dos seis híbridos foram testados por citometria de fluxo com hemácias de SCUP, hemácias de adultos de doador de sangue, hemácias de cavalo, plaquetas, CTM e HUVEC.

Quadro 7: Citometria de fluxo.

Controle auto	100 μ L de	
	SCUP/Sadulto/Scavalo/CTM/HUVEC	
Controle secundário	100 μ L de	3 μ L Ac secundário (IgM+IgG)
	SCUP/Sadulto/Scavalo/CTM/HUVEC	
SNC +	100 μ L de SNC + 100 μ L de	3 μ L Ac secundário (IgM+IgG)
SCUP/Sadulto/Scavalo/CTM/HUVEC	SCUP/Sadulto/Scavalo/CTM/HUVEC	

Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Sendo que a suspensão de hemácias e CTM com o SNC foi incubada por 30 minutos a 4°C, após incubação, realizou-se uma lavagem com PBS ou Isoton (400 μ L para retirar 500 μ L e deixar apenas o pellet de células), as células foram ressuspensas com 100 μ L de PBS ou Isoton ou para posterior marcação com Ac secundário, incubou-se por 30min no escuro com AC secundário; realizou-se uma lavagem com PBS ou Isoton (Adicionar e retirar a mesma quantidade) e foi adicionado 500 μ L de Isoton(BD). Protocolo de plaquetas e HUVEC foi adicionado BSA 5% e as lavagens realizadas com PBS-EDTA.

Usou-se:

- ✓ 3×10^5 de células por tubo em um volume de 100 μ L.
- ✓ Diluição da crioaglutinina: 100 (1:100)
- ✓ Diluição do HemF3-121 e HemF3-122: 600 (1:600)

4.2.8.2.2 Sobrenadantes de culturas dos híbridos HEMF1-88 e HEMF3-122

Com os híbridos HemF1- 88 e HemF3-122 teve um outro protocolo o qual foram usadas hemácias do painel de 16 hemácias (lote: 26792- Panocel®) do número 9, 12 e 15 devido a essas expressarem em sua membrana o antígeno

Lutheran. Hemácia 9: heterozigose Lutheran, Hemácia 12: homozigose para Lu^a e hemácia 15 em heretrozigose Lutheran. As hemácias selecionadas no painel de 16-Panocell®, estão abaixo, representadas com seu respectivo fenótipo eritrocitário.

Quadro 8: Fenotipagem eritrocitária de 3 diferentes hemácias selecionadas

Nº	D	C	c	E	E ^{Cw}	K	k	kp ^a	kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	Lu ^a	Lu ^b	Xg ^a
9	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0
12	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+
15	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0

Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Alguns artigos referem que o anti-i é um marcador de CTm de cordão umbilical (41), dessa forma foi testado também com CTM de cordão de umbilical e células endoteliais de cordão umbilical (HUVEC), pela metodologia de citometria de fluxo.

4.2.8.2.3 Validação ou exclusão das especificidades CD36 e CD44

De acordo com a caracterização e como existem reagentes no laboratório, foram indicados testes por citometria de fluxo para validar ou excluir as especificidades do CD36 e CD44.

Quadro 9: Citometria de fluxo. Análises da validação ou exclusão das especificidades CD36 ou CD44

Controle auto	100 µL de hemácias ou plaquetas	
Controle secundário	100 µL de hemácias ou plaquetas ou monócitos	2 µL Ac secundário (IgM+IgG)
Controle positivo	235a PE ou CD61FITC ou CD14FITC/CD14PE	
CD36FITC/CD44 PE	CD36FITC/CD44 PE	
SNC + hemácias ou plaquetas ou monócitos	100 µL de SNC + 100 µL de hemácias ou plaquetas ou monócitos	2 µL Ac secundário (IgM+IgG)

Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Foi preparado:

- ✓ 1mL de suspensão de 3x10⁶ de sangue de cordão (SC);
- ✓ 1mL de suspensão de 3x10⁶ de sangue de adulto (SAdulto)
- ✓ 1mL de suspensão de plaquetas
- ✓ Distribuído 100µl das células em tubos, ou seja, em cada tubo teve 3x10⁵ de células.

- ✓ Apenas testado com SNC do híbrido HemF1-88

4.2.8.2.4 Western blotting

Para a caracterização imunoquímica foi utilizada a técnica de *Western blotting*, clássica, com a produção de lisado de hemácias de SCUP como descrito por De Santis, 2018 (36). Após a eletroforese em gel SDS-PAGE e transferência para membrana de PVDF, a caracterização foi realizada com o AcMm produzido comparado com marcadores de peso moleculares (36).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o desenvolvimento deste projeto, o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu sofreu mudanças administrativas e de gestão, desvinculando-se do Hemocentro e sendo integrante do Laboratório de Biotecnologia Aplicada, como uma unidade de pesquisa ligada diretamente ao Hospital das Clínicas de Botucatu. Além destas mudanças de ordem administrativas, durante todo o transcorrer do trabalho o laboratório se encontrava em obras de adaptação e adequação do ar-condicionado central permeio à um período de interrupções aliadas a pandemia da COVID-19. Este fato trouxe consequências diretas sobre a pesquisa das quais podemos listar: 1) aumento considerável dos insumos laboratoriais a serem adquiridos, em especial o SFB que passou a ter valores exorbitantes; 2) dificuldade de acesso a compra de materiais e interrupção temporária/descontinuidade dos trabalhos por falta de equipamentos de proteção individual como a falta de luvas estéreis, máscaras e aventais descartáveis e 3) período de proibição das atividades laboratoriais em função da pandemia. Apesar de todos estes fatores listados, e das frequentes contaminações registradas no transcorrer dos ensaios, com perda de material, o trabalho foi executado arduamente.

A etapa de imunização é o alicerce dos protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais murino(70). Nesta etapa foram utilizados 33 camundongos Balb/C, de linhagem isogênica, oriundos do biotério da Unidade de Pesquisa Experimental da UNESP – UNIPEX. Os protocolos foram divididos em dois grandes grupos: aqueles usando hemácias de sangue de cordão umbilical humano e os que usaram líquido de cisto de ovário. Problemas técnicos da purificação do líquido de cisto de ovário

determinaram a falta de resultados deste protocolo. Desta forma, em protocolos futuros, deve ser mais bem delineada a etapa de purificação do líquido de cisto de ovário.

Quanto às etapas de imunização utilizando hemácias de sangue de cordão umbilical, duas grandes vertentes foram utilizadas: protocolos clássicos usando a injeção repetida vezes das hemácias de sangue de cordão umbilical e protocolos interfaceados com doutorado de Suelen Nishio, onde foram utilizados protocolos de imunização subtrativa conforme descrito (73) (74).

A etapa subsequente, foi a fusão celular, pelo método clássico modificado por Deffune conforme descrito no material e métodos. Foram realizadas 18 fusões cujo baço foi oriundo de animal que recebeu a imunização com hemácias e 9 com líquido de cisto de ovário.

Quadro 10: Distribuição das fusões e os respectivos aditivos utilizados: SFB e *feeder cells* X SFB e MC-CTM_{tam} X HDLT

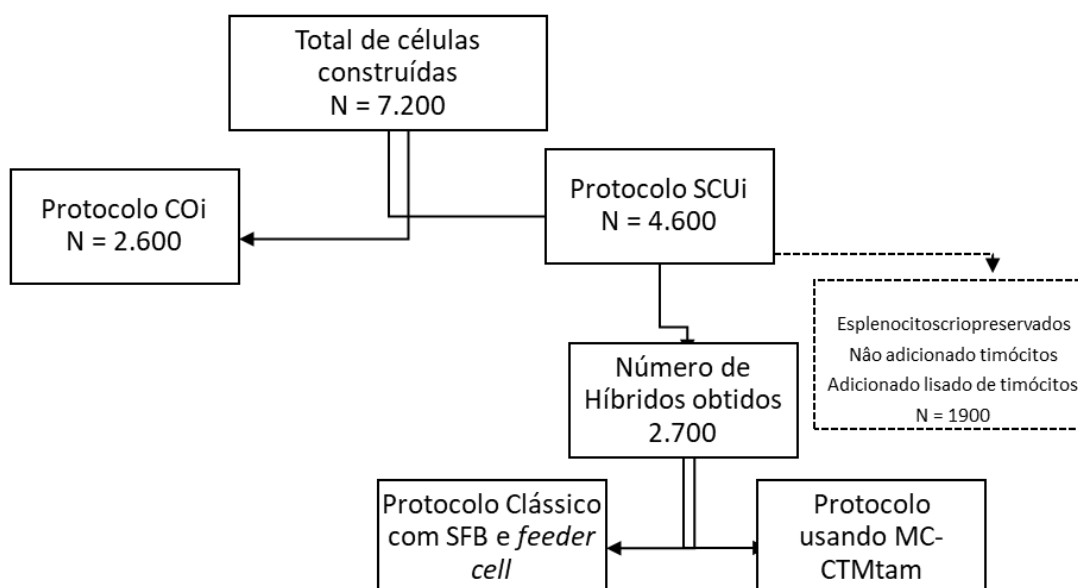
PROTOCOLO	ADITIVO UTILIZADO	NÚMERO FUSÕES	DE
SCUI – injeção de suspensão de hemácias a 10%	SFB – Protocolo controle	8	
SCUI – injeção de suspensão de hemácias a 3%	MC-CTM _{tam}	4	
SCUI – injeção de suspensão de hemácias a 3% previamente tratada com papaína	Hormônio derivado de lisado de células do timo	5	
	MC-CTM _{tam}	4	
CISTO DE OVÁRIO NÃO PURIFICADO			
CISTO DE OVÁRIO PURIFICADO	Hormônio derivado de lisado de células do timo	5	
TOTAL DE FUSÕES		26	

Fonte: Arquivo pessoal, 2022. Legenda: HDLT = hormônio derivado de lisado de timócitos.

O número de híbridos por protocolo foi variável, perfazendo um total de 7.200 células construídas. Desde total, 2600 correspondem ao protocolo COi (38,111%) e 4.600 delas correspondendo a 63,89% das células construídas pelo protocolo SCU i. Deste total de 4.600 foram retirados 1900 híbridos construídos correspondentes aos protocolos de células congeladas, fusões que não foram adicionados timócitos, por causa de sua invalidade e aquelas cujo aditivo hormônio derivado de lisado de timócitos foi adicionado. Como o congelamento pode determinar um viés na análise de eficiência de fusão, foram consideradas apenas as fusões com células dentro do

protocolo clássico (não congeladas, ou aquelas em que não foi possível adicionar os timócitos). Portanto, para a análise de eficiência de fusão, foram considerados 2700 híbridos construídos que receberam separadamente soro fetal bovino e *feeder cells* ou meio condicionado (MC-CTM_{tam}). Como demonstras a Figura 13.

Figura 13: Distribuição dos híbridos construídos e híbridos descartados



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Das 2.700 células construídas, 1300 receberam *feeder cells* (protocolo clássico/controle) e determinaram uma eficiência de fusão de 33,61% enquanto os outros 1400 híbridos construídos receberam no segundo dia após a fusão, MC-CTM_{tam}. Sendo que estes, tiveram bom desenvolvimento determinando uma taxa de eficiência de fusão de 69,71%, mas o que chamou a atenção, é que nenhum híbrido foi reagente. Desta forma podemos afirmar que quanto à eficiência da taxa de fusão, o MC-CTM_{tam} foi superior ao protocolo clássico com soro fetal bovino e *feeder cells*. Apesar das falhas contidas neste estudo, estes resultados abrem a possibilidade de se analisar com maior exatidão, formas alternativas de se dar suporte às células recém-construídas, sem o uso efetivo de *feeder cells*, Tabela 1.

Tabela 1: Eficiência de fusão comparando no quarto dia após a fusão; *feeder cells* X meio condicionado de célula tronco murina

Protocolo	Híbridos criados (n)	Híbridos Viáveis (n)	Eficiência de Fusão %
SCUI/ <i>Feeder cells</i>	1300	437	33,61
SCUI/MC CTM _{tam}	1400	976	69,71

Fonte: arquivo pessoal. Legenda: SCUI – protocolo de imunização usando hemácias de sangue de cordão umbilical *i*;

Os resultados obtidos colocam em questionamento a necessidade das células de terem um ambiente tridimensional para se “acomodarem”, ou que o contato direto com a camada alimentadora seja relevante no desenvolvimento dos híbridos. Os resultados apontam de forma mais efetiva para a presença das proteínas no MC-CTM_{tam}, inclusive proteínas de matriz como a fibronectina entre outras, que dão este suporte de “companhia” para as células recém fusionadas.

Além da importância do uso de *feeder cells* na plataforma hibridoma, este tema se tornou ainda mais relevante na produção de células tronco induzidas (iPS), que dependem do suporte da camada alimentadora. Propostas alternativas com uso de Matrigel® são utilizadas, porém nem sempre com resultado esperado além de mais elevado custo(75).

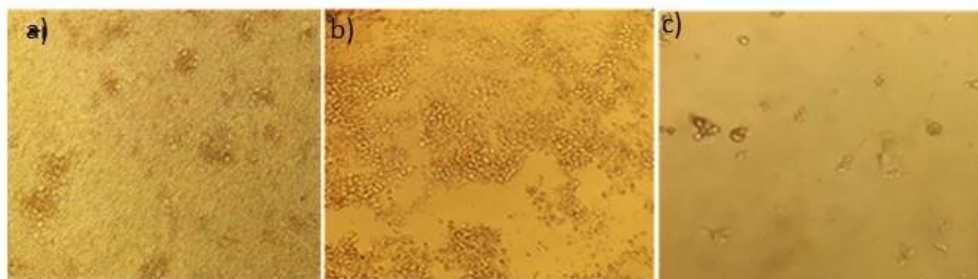
Basicamente, as células alimentadoras consistem em uma camada de células incapazes de se dividir, que fornece secreções extracelulares para ajudar outra célula a proliferar, diferente da co-cultura(45). Baseado nisto, a proposta de MC-CTM_{tam} se fortalece ainda mais, ficando várias lacunas a serem respondidas em trabalhos futuros: porque não foi obtido nenhum híbrido reagente (de especificidade anti-hemácia)? Teria no MC-CTM_{tam} algum fator inibidor de linfócitos B/plasmócitos secretores de imunoglobulinas? Haveria uma relação entre este achado e a condição das CTM serem imunoreguladoras e imunoprivilegiadas?

Há descrito na literatura que para o cultivo de progenitores hematopoiéticos, a camada de *feeder cells* tem um papel relevante como no impacto da interação direta entre a camada alimentadora e as células-tronco na expansão quanto à capacidade de diferenciação celular. O efeito do contato célula-célula na manutenção e multipotencialidade das células-tronco foi demonstrado de forma predominante para as células progenitoras hematopoiéticas. O contato direto entre as células

progenitoras hematopoiéticas e o microambiente celular parece ser essencial para a manutenção do “tronco”(76). Já quando as células-tronco neurais foram cultivadas em monocamadas de células-tronco, sua proliferação foi diminuída em a presença de *feeder cells*. O contato físico direto entre as CTM_{ta} e as células-tronco neurais foi necessário para a indução da diferenciação neuronal(77).

A análise do lisado de células do timo deve ser com muita cautela tendo em vista que foram utilizados nos protocolos usando proteínas purificadas do cisto de ovário, que posteriormente se averigou estarem “contaminadas” com fenol da purificação, sendo um grande viés na análise de eficiência de fusão. No entanto foi observado nas fusões que receberam hormônios derivados do lisado de timo o aparecimento de fibroblastos em grande quantidade, de forma bastante precoce (figura 14). Isto pode estar relacionado ao método de obtenção dos hormônios, onde a primeira etapa consiste na perfuração da capsula do timo para a retirada das células. Esta manipulação pode ter liberado uma grande quantidade de fibroblasto da cápsula, que ao serem lisados, enriqueceu o conteúdo com Fator de Crescimento de Fibroblastos 1 e 2.

Figura 14: Aspecto da cultura celular.



Fonte: Arquivo pessoal,2020. Legenda: Microscopia invertida de campo claro. a) Cultura alimentada com SFB 20% e *feeder cells*; b) cultura que recebeu meio condicionado de célula tronco murina derivada de tecido adiposo e em c) fusão celular que no 4º dia recebeu hormônio derivado de lisado de células do timo. Aumento 10X.

Apesar de termos afirmado no capítulo de *feeder cells*, que fibroblastos murinos são boas células alimentadoras, há que se fazer o destaque, de que estas células a serem utilizadas recebem irradiação gama para não proliferarem, fato este diferente do desenvolvimento do fibroblasto *wild* na cultura, que dominará o crescimento e eliminará o híbrido.

Em artigo publicado em 2021, Sharma e Moroni abordam os aspectos dos recentes avanços na regeneração tímica. Os autores fazem uma revisão detalhada dos aspectos anatômicos, funcionais e celulares do timo e destacam que os lóbulos do timo são compostos e regidos por células epiteliais tímicas que organizam uma rede de trabalho tridimensional muito bem organizada, onde interagem células endoteliais, dendríticas, células tronco do tecido adiposo, fibroblastos, macrófagos e linfócitos B (cuja taxa é muito baixo na idade em que se extrai o timo dos camundongos – entre 15 e 20 dias de vida) (57). Não foi possível fazer as dosagens de fatores de crescimento e ou citocinas dos hormônios derivados de timócitos.

Diante dos resultados negativos do *screening* das fusões realizadas, deram-se inícios os protocolos de fusão, exclusivamente pelo método clássico com uso de *feeder cells* e soro fetal bovino, do doutorado de Suelen Nishio. Detalhamento sobre o protocolo de imunização subtrativa serão apresentados no trabalho de Nishio. Dos protocolos que usaram a imunização subtrativa, o resultado do *screening* foi superior, e foram retidos seis híbridos, cujo *screening* por hemaglutinação foram positivos com hemácias de cordão umbilical humano. São eles: HemF1-46, HemF1-85, HemF1-88, HemF3-116, HemF3-121 e HemF3-122.

Todos estes híbridos foram testados a cada 48 horas sem troca de meio até a 4ª testagem para se certificar de que não perdiam a especificidade, posteriormente ampliados e gerados sobrenadantes de cultura (*bath* de cultura de 10 dias sem troca de meio). Foram produzidos 50mL de SNC de cada célula. Os híbridos foram expandidos e congelados sem a imediata clonagem em função dos subsequentes episódios de contaminação por fungo e/ou bactérias que estavam acontecendo no Laboratório. Neste período também se implantou a pesquisa de *Mycoplasma* no sobrenadante de cultura pela técnica de biologia molecular, tendo sido identificado que o mieloma múltiplo, ou seja, o parceiro de fusão estava contaminado. Foi procedido a descontaminação das células e a retestagem por 3 semanas consecutivas para se garantir a eliminação do agente microbiológico e procedeu-se o vazio sanitário do laboratório com extensivo protocolo de desinfecção ambiental.

Com o sobrenadante dos híbridos em maior quantidade, foi possível: repetir extensivamente os testes de hemaglutinação, testar os sobrenadantes de cultura com hemácias humanas de cordão umbilical e de indivíduos adultos sem história de glaucoma congênito na família, com células tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo e cordão umbilical.

Como pode ser observado no quadro 11, a amostra de crioaglutinina humana utilizada não reconheceu hemácias de sangue de cordão, mas reconheceu hemácias de indivíduos adultos caracterizando a amostra como tendo um perfil de anti I, como é de se esperar na maioria das crioaglutininas encontradas na rotina imunohematológica e bem caracterizados há mais de 30 anos(24)(78)(79).

Os anticorpos denominados HemF1-46 e HemF3-116 não reconheceram nenhum tipo de hemácias. O HemF1-85 difere do anterior, pois reconhece as hemácias de indivíduos adultos, quando tratadas com enzimas proteolíticas e seu reconhecimento de hemácias de sangue de cordão sugere o mesmo padrão das hemácias tratadas com enzima. O HemF1-88 reconheceu no método salino hemácias de sangue de indivíduo adulto e sangue de cordão umbilical. Os HemF3-121 e HemF3-122 reconheceram as hemácias de indivíduos adultos e sangue de cordão, porém não teve reconhecimento de hemácias de cavalo, boi e coelho.

Quadro 11: Testes de hemaglutinação de hemácias humanas de sangue adulto (n=1 O adulto) e sangue de cordão umbilical (n=4), hemácias de diferentes animais (n=1): coelho, boi e cavalo. Testes realizados no método salino e enzimático com leitura em quinze minutos e 1 hora de incubação à 22°C ou 4°C

Hemácia	O adulto				O1 cordão- J				O2 cordão- A				O3 cordão- K				O4 cordão- D				Coelho				Boi				Cavalo				
Anticorpo	Salina		Enzima		Salina		Enzima		Salina		Enzima		Salina		Enzima		Salina		Enzima		Salina		Enzima		Salina		Enzima		Salina		Enzima		
Tempo de incubação	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	15'	1h	
Crio	3+	3+	3+	4+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	3+	1+	3+	3+	3+	3+	3+	1+	3+ H	1+	4+ H	
HemF1-46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HemF1-85	0	0	2+	2+	0	0	2+	2+	0	0	2+	1+	0	0	2+	2+	0	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HemF1-88	+	2+	0	0	+	2+	0	0	2+	3+	0	0	+	2+	0	0	2+	2+	0	0	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
HemF3-116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HemF3-121	3+	3+	3+	4+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HemF3-122	4+	4+	2+	3+	3+	4+	2+	3+	3+	4+	2+	3+	3+	4+	2+	3+	3+	4+	2+	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

De acordo com a literatura, hemácias de coelho, boi e cavalo, são descritas como portadoras de antígeno i, semelhantes ao antígeno encontrado em hemácias humanas (80). Destaca-se que os antígenos i, e o sistema li, é considerado, como o sistema ABH, sistema de antígenos de grupos sanguíneos de expressão tissular pois são detectados em muitos outros tecidos e fluidos, como cisto de ovário, leite, plasma além das hemácias (22).

A síntese de antígenos I em diferentes tecidos foi sugerido como resultado de diferentes enzimas de ramificação I dadas que as quantidades normais de antígeno I na saliva, leite e plasma de pessoas com fenótipo i adulto foi observada. Identificação das origens moleculares do fenótipo i nos indivíduos adultos encontram 3 perfis distintos de base molecular na sua associação com catarata congênita em asiáticos (80).

Futuras parcerias com ambulatório de oftalmologia do Hospital das Clínicas podem abrir acesso à pacientes catalogados com catarata congênita (n=100).

Além destes testes, foi realizada a pesquisa de anticorpos, com o objetivo de determinar a especificidade usando painel de hemácias Panocell16® da Fresenius®, com centrifugação imediata à temperatura ambiente e com 1 hora de incubação. O resultado se encontra no quadro12.

Observa-se que novamente, a amostra de crioaglutinina utilizada reagiu fortemente com todas as hemácias do grupo O, sangue de adulto, do painel e não reagiu nem com o tempo de incubação de 1 hora, consolidando novamente a especificidade já previamente determinada tanto no Laboratório de imuno-hematologia do Hemocentro de Botucatu, como nesta pesquisa.

Quadro 12: Padrão de hemaglutinação dos anticorpos: crioaglutinina humana, HemF1-46, HemF1-85, HemF1-88, HemF3 116, HemF3-121 e HemF3-122 frente ao Pannel de hemácias Panocell 16® após centrifugação imediata e incubação de 1 hora a 22°C

Painel de hemácias Panocell 16®	Crio		HemF1- 46		HemF1- 85		HemF1-88		HemF3- 116		HemF3- 121		HemF3- 122	
	imediate	1h	imediate	1h	imediate	1h	imediate	1h	imediate	1h	imediate	1h	imediate	1h
1	4+	NR	+	4+	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
2	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
3	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
4	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
5	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
6	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
7	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
8	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
9	4+	NR	-	-	-	-	pó	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
10	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
11	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
12	4+	NR	-	-	-	-	Pó	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
13	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
14	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
15	4+	NR	-	-	-	-	Pó	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
16	4+	NR	-	-	-	-	+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR
SC	0	0	-	-	-	-	2+	4+	-	-	3+	NR	4+	NR

Fonte: Arquivo pessoal, 2021. Legenda: imediata = centrifugação imediata a 22°C; 1 h = incubação à 22°C (temperatura ambiente) seguido de centrifugação e leitura do padrão de aglutinação. Padrão de aglutinação 0 = sem aglutinação, 1+ = pequenos aglutinados que se soltam facilmente; 2+ grumos um pouco maiores, mas múltiplos, e mais sólidos; 3+ = presença de dois fragmentos de aglutinados grandes e 4+ = presença de um botão de hemácias sólido, que não se desfaz. NR= técnica não realizada em função da etapa anterior já ter apresentado forte aglutinação.

Após a chegada de novo lote (Lote nº 50559) de painel de hemácias, agora com as células absolutamente frescas, foi realizado novamente o teste com o SNC HemF1-46, sendo que houve desaparecimento de todas as reações de aglutinação. Diante destes resultados levantou-se a hipótese de que as aglutinações que haviam ocorrido teriam sido inespecíficas em função das hemácias do painel estarem próximas ao vencimento e de que as lesões de estocagem podem expor criptoantígenos por lesões determinadas pelo estresse oxidativo e formação de radicais livres (antígenos espontaneamente aglutináveis)(81)(82).

Com o mesmo lote novo de painel de hemácias, fora realizada a titulação dos anticorpos HemF1-121 e 122. Ambos mantiveram aglutinação de 1+ acima do título 25.

Diante do padrão heterogêneo de aglutinação com algumas hemácias do painel comercial, optou-se por realizar, com estas hemácias, o teste por citometria de fluxo, utilizando outras células como plaquetas humanas, células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, células tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical e com a linhagem HUVEC obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro. Tanto as células tronco mesenquimais como a linhagem de HUVEC tiveram seu fenótipo confirmado por citometria de fluxo antes da realização dos testes.

Diante destes resultados, os sobrenadantes de cultura foram submetidos à análise por citometria de fluxo utilizando FACSCaliburBD™ e software *Cell Quest Pro*™.

O quadro 13 registra os resultados obtidos pelo método de Citometria de Fluxo onde pode ser observado que foram testadas três diferentes hemácias de sangue de cordão umbilical humano e de indivíduos “saudáveis”, adultos, além de hemácias de cavalo e CTM_{-ta}, CTM_{-cup}, HUVEC e concentrado de plaquetas humanas. O SNC HemF1-46 tem uma maior positividade com CTM_{-ta} enquanto o HemF1-85 tem maior positividade em CTM_{-ta}, CTM_{-cup}, HUVEC e plaquetas, sendo que a MIF expressa em % está acima de 20% em todas as células, chegando a 94% nas HUVECs, ainda na condição de SNC de híbrido, evidenciando potencial na sua futura caracterização.

O SNC do híbrido HemF1-88 reconhece em média 24,77% das hemácias fetais, 37,04 % das hemácias humanas adultas. Não reagiu com CTM-ta, CTM-cup, e com HUVEC, mas reconhece plaquetas. O SNC do HemF3-116 teve um fraco desempenho nas técnicas de citometria de fluxo em plaquetas, todas as hemácias e outras células. Os HemF3-121 e HemF3-122 apresentam fraca reatividade com outras células e com sangue de cavalo, que expressa antígeno i em alta concentração e alta reatividade com hemácias humanas (99,78%).

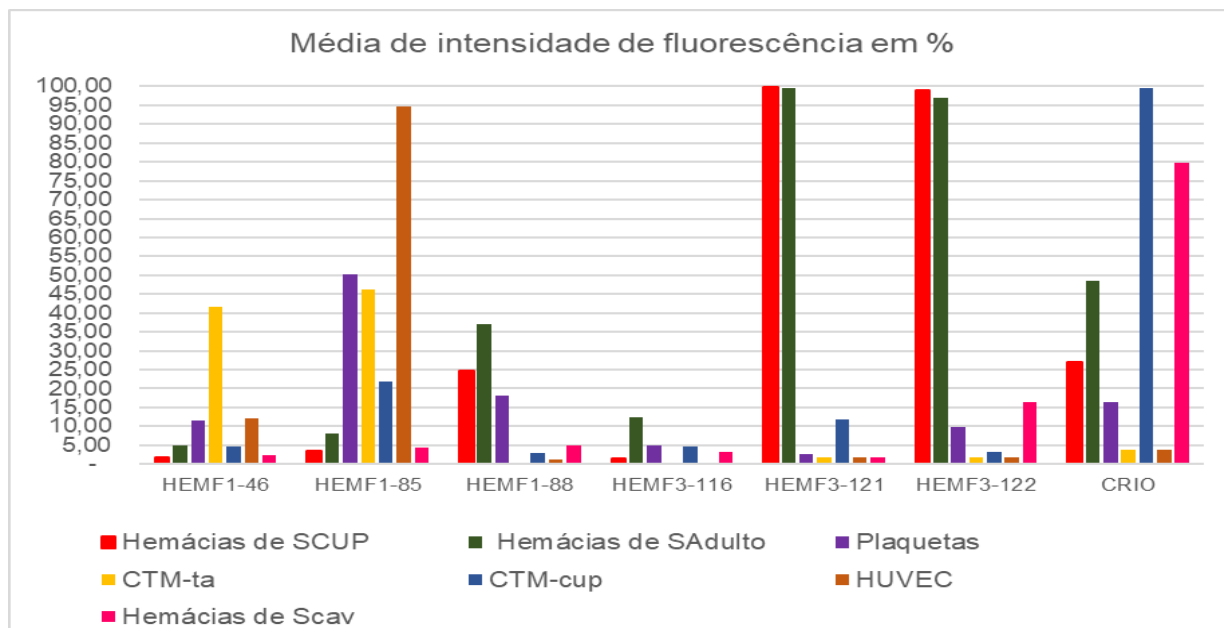
A amostra de crioaglutinina foi positiva com todas as hemácias, plaquetas e CTM-cup.

Quadro 13: Análise de Citometria de Fluxo com os diferentes SNC

Média de intensidade de fluorescência em %							
Híbrido	Hemácias			Plaquetas N=3	Outras células		
	Humanas		Cavalo				
Marcador	Sangue de Cordão Umbilical N=3	Sangue de Adulto saudável N=3	Sangue de cavalo N=3		CTM-CUP N=1	HUVEC N=1	CTM-TA N=1
HEMF1-46	1,82	5,01	2,37	11,61	4,59	1,98	41,70
HEMF1-85	3,49	8,03	4,26	50,18	21,75	94,71	46,33
HEMF1-88	24,77	37,04	5,09	18,17	2,91	1,16	0,14
HEMF3-116	1,50	12,45	3,23	5,07	4,57	0,42	0,42
HEMF3-121	99,78	99,46	1,68	2,57	11,78	1,78	1,78
HEMF3-122	98,96	96,90	16,48	9,75	3,24	1,76	1,76
CRIO	27,09	48,54	79,70	16,52	99,68	3,9	3,90

Fonte: Arquivo pessoal, 2022. **Legenda:** Os dados representam a. Média de intensidade de fluorescência dos sobrenadantes testada, da amostra de crioaglutinina frente a hemácias de cordão, adultas, de cavalo, células tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, células tronco mesenquimais humanas derivadas de cordão umbilical, linhagem celular HUVEC e plaquetas humanas.

Figura 15: Gráfico da análise comparativa por Citometria de Fluxo dos diferentes SNC



Fonte: arquivo pessoal, 2022. Desempenho dos SNC e da amostra de crioaglutinina por citometria de Fluxo com hemácias humanas de sangue de cordão umbilical e de indivíduos adultos, CTM-ta, CTM-cup, HUVEC e plaquetas.

Pode se observar na figura 15, que os anticorpos HemF1-46, HemF1-85 e HemF1-88 tem perfis de reconhecimento diferente um do outro. Já o SNC do HemF 3-116 perdeu a especificidade. Os anticorpos HemF3-121 e 122 parecem reconhecer o mesmo antígeno, sendo que a única observação é que no HemF3-121 o reconhecimento de CTM de cordão umbilical e placentário é 3 vezes maior que para o híbrido HemF3-122. Nenhum dos anticorpos monoclonais obtidos tem perfil superponível à crioaglutinina, que no painel de hemácias e nas análises por citometria de fluxo se comportam como de especificidade anti-I.

Mediante estes resultados, fez-se amplo levantamento dos CDs expressos em hemácias, CTM, HUVEC e plaquetas para estreitar as hipóteses a serem consideradas. Chama a atenção, que o híbrido HemF1-88 teve reação atípica frente a plaquetas. Por vezes francamente negativo, e em alguns outros testes, reagente. Isto justifica o ponto de interrogação colocado no quadro 14. Levantou-se a hipótese desta reatividade ter sido causada pelo fato de não ter se usado plaquetas frescas, e sim, criopreservadas e descongeladas. Na dissertação de Oliveira (2021) o autor observa que o CD41 diminui sua expressão com hemácias criopreservadas, ou seja, deve haver um eluição dos antígenos. Levando isto em

consideração, não poderia o contrário acontecer com outros antígenos? Não estaria a exposição de criptoantígenos plaquetários levando a um reconhecimento indevido? Para tal, foi proposto a realização de novo experimento apenas usando plaquetas frescas.

Quadro 14: Identificação de possíveis perfis para os anticorpos obtidos

CD	Reatividade frente a diferentes células				
	Hemácia	Endotélio	Plaqueta	CT	
Hemf1-46	-	-	+	+	CD43
Hemf1-85	-	+	+	+	CD31, CD32b , CD40, CD43, CD46, CD98, CD109, CD110, CD114
Hemf1-88	+	-	+/?	-	CD36, CD40, CD44, CD49e CD55, CD111, CD147
Hemf3-116	+/-	-	-	-	CD241, CD75
Hemf3-121	+	-	-	-	
Hemf3-122	+	-	+/-	-	

Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Foi realizado um amplo levantamento na literatura especializada, para a identificação de anticorpos que reconhecem hemácias e outras células como endotélio, plaquetas e células tronco (quadro 15).

Quadro 15- Levantamento da reatividade de CDs em hemácias, endotélio, plaqueta e célula tronco mesenquimal

CD	Reatividade frente a diferentes células			
	Hemácia	Endotélio	Plaqueta	CT
CD9	-	+	+	-
CD10	-	+	-	-
CD13	-	+	-	+
CD31	-	+	+	? NT
CD32b	-	+	+	NT
CD36	+	+	+	+
CD40	-	+	NT	+
CD43	-	NT	+	+
CD44	+	+	-	+?
CD46	-	+	+	NT
CD47	+	+	+	-?
CD49e	+	+	?	+
CD55	+	+	+	+
CD58	+	+	NT	NT
CD75	+	-	-	-
CD75S	+	+	-	-
CD98	-	+	+	NT
CD99	+	+	+	+
CD105	-	+	-	+
CD106	-	+	-	-
CD109	-	+	+	+
CD111	+	+	+	+
CD110	-	+	+	+
CD114	-	+	+	+
CD147	+	+	+	?
CD173 (Lewis)	+	+	NT	NT
CD176 Duffy	+	+	NT	+
CD233 banda 3	+	NT	NT	NT
CD234 GPA-Duffy	+	+		
CD235 GPA	+	NT		+
CD235B GPB	+	NT	NT	+
CD236	+			+
CD238 Kell	+	+		+
CD239 Lutheran	+	+		
CD240 Rh	+			+
CD241 Anquirina	+	-	-	-
CD242	+	+	-	+
CD321	+	+	+	?
CD324 E caderina	+			+

Fonte: arquivo próprio extraído de diferentes páginas da internet, 2022. As linhas com sombreado cinza correspondem a anticorpos que reconhecem hemácias e outras células

As novas análises de citometria de Fluxo foram realizadas utilizando 3 hemácias diferentes (Hem 1 e 2 oriundas de sangue adulto e Hem 3 de sangue de cordão umbilical), plaquetas coletadas de forma extemporânea, sem preservação e da amostra de hemácia e plaquetas 1, ainda foram separados os monócitos do *buffy coat*, tendo em vista, já ter sido observado uma reação do sobrenadante do híbrido HemF1-88 com estas células. No quadro 16 estão representadas as médias de intensidade de fluorescência obtido com as análises de citometria usando o software Cell Quest Pro. Utilizou-se como controle positivo para hemácias, o CD235a marcado com ficoeritrina (PE), para plaquetas o CD61-FITC, além dos dois anticorpos disponíveis para validação: CD36 e CD44.

Quadro 16: Análise de Citometria de Fluxo com o SNC do HemF1-88

	Hemácias			Plaquetas			Monócitos
	Hem 1	Hem 2	Hem 3	Plaqueta	Plaqueta	Plaqueta	
				1	2	3	
Controle 235a PE	99,27	99,99	99,9	nt	nt	nt	nt
CD61 FITC	nt	nt	nt	98,83	98,81	95,29	nt
CD14 FITC	nt	nt	nt	nt	nt	nt	100
CD36 FITC	20,99	9,45	19,44	98,02	97,82	94,98	66,74
CD44 PE	99,73	99,45	98,77	1,84	0,7	3,41	99,8
SNC HemF1-88C	7,34	5,33	5,39	2,13	1,47	4,48	33,64

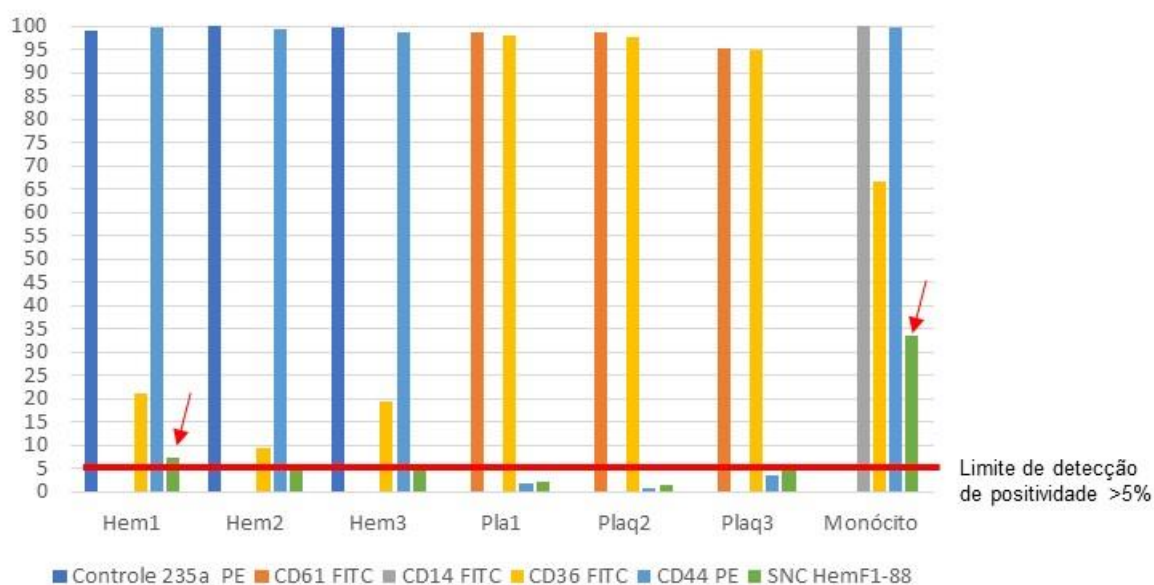
Fonte: Arquivo pessoal, 2022. Legenda: nt= não testado.

Todos os controles positivos marcaram fortemente as células correspondentes: CD235a marcou fortemente as hemácias, CD14 marcador positivo de monócitos, CD61 de plaquetas e os anticorpos CD36 e CD44 também tiveram o desempenho esperado nas análises. Como pode ser observado na figura 16, o SNC do híbrido HemF1-88 reagiu fracamente com hemácias, foi negativo com Plaquetas 1 e 2 e no limite detecção de positividade (>5%) com a

terceira plaqueta testada (4,48%), mas reagiu fortemente com monócitos (33,64%).

Transportando estes resultados para gráfico, observa-se que o sobrenadante de cultura HemF1-88 tem fraca reatividade com uma das três hemácias testadas, mas uma reatividade expressiva com monócitos. Há de se destacar de que a quantidade de imunoglobulinas no SNC está na faixa de 25-50 µg/mL enquanto os reagentes comerciais estão ajustados, na forma purificada, a 1mg/mL, ou seja, o SNC está em uma concentração 40 a 20 vezes menor que os anticorpos comerciais utilizados como controle positivo (83). Os clones obtidos por este híbrido estão em análise e os resultados não serão computados neste documento.

Figura 16: Comparação do desempenho do SNC Hemf1-88 com anti-CD36 e anti-CD44



Fonte: Arquivo pessoal, 2022. Observação: Desempenho dos anticorpos por citometria de Fluxo com hemácias humanas de sangue de cordão umbilical e de indivíduos adultos, plaquetas e monócitos.

Como pode ser observado, o HemF1-88 não tem o perfil de CD235a ou seja, de uma anti-glicoforina A.

O desempenho do CD36 comercial com hemácias é heterogêneo e esta constatação corrobora os achados de Schravendijk (1992) que identificou um reconhecimento que variou de 2,2% (negativo para os padrões de citometria de fluxo) até 99,9% (fortemente reagente). (84)

Considerando as diferenças de concentrações entre os anticorpos analisados (comerciais) *versus* o SNC, mais a importante heterogeneidade de reconhecimento das hemácias por CD36 e a identificação de que as hemácias mais reagentes são aquelas de indivíduos com anemia falciforme, infectados por *Plasmodium falciparum* e sendo o CD36 um marcador de patologias trombogênicas. A presença de alguns antígenos sobre as hemácias e plaquetas é resultado de uma seleção natural, por exemplo, o antígeno Duffy corresponde a uma mutação GATA-1 que ocorreu em FYB e FYA em áreas infestadas por *Plasmodium vivax*). Muitos antígenos, expressos em hemácias e plaquetas expressam uma série de moléculas de adesão, moléculas estruturais e enzimas que variam em sua sequência de um ou dois aminoácidos (85).

Analisando o desempenho do SNC HemF1-88 com plaquetas, observa-se da mesma forma a não reatividade com duas amostras e uma terceira amostra, se encontra no limite de detecção. Gosh e colaboradores (2011) publicaram que a expressão antigênica do CD36 pode ser bastante diferente segundo o polimorfismo herdado. Analisando amostras de 500 indivíduos, identificaram que a variabilidade do número de antígenos está entre 200 – 14.000 moléculas/plaqueta) e de que existe uma correlação entre os níveis de CD36 e de LDL oxidado (oxLDL) e de que esta herança determina também os perfis de indivíduos trombóticos. (86)

Os resultados obtidos com análise de apenas 3 amostras, acrescido do fato de que nas análises iniciais, uma das amostras de plaquetas foi reconhecida em 47% pelo SNC, mas como a maioria das demais amostras teve um desempenho inferior, a média apresentada acabou sendo baixa. Outra hipótese levantada, é de que a manutenção do sobrenadante de cultura à +/-4°C pode ter determinado a degradação do anticorpo. Análises posteriores, como o produto dos clones, purificados e em condições de concentração semelhantes aos reagentes comerciais com um maior painel de amostras de plaquetas deverá dirimir a dúvida levantada.

A análise imunofluocitométrica com *gating* em monócitos foi realizada, tendo em vista, que o CD36 também se expressa em monócitos, macrófagos e células dendríticas. Chandran *et al* em seu artigo afirma que em virtude de seu papel na absorção de lipoproteína de baixa densidade, oxidada (oxLDL) a análise

da expressão do CD36 em monócito se configura em uma ferramenta potencial, promissora, não invasiva de análise do risco trombótico, em especial, nos portadores de diabetes mellitus (87).

O SNC HemF1-88 tem um perfil compatível com CD36 de reconhecimento de monócitos. A literatura não esclarece se este perfil de reconhecimento é superponível às hemácias, e se os epítomos da molécula são os mesmos reconhecidos em hemácias, plaquetas e monócitos.

De acordo com figura 16, ao se comparar os anticorpos de especificidade anti-CD36 e anti-CD44 com SNC do HemF1-88 o resultado foi inconclusivo, não conseguindo obter uma correlação entre os anticorpos comerciais e o SNC.

Por se tratar de um SNC de híbridos, não se exclui totalmente a possibilidade do híbrido HemF1-88 secretar um anti-CD36 ou anti-CD44, pois ainda é necessário analisar os SNC dos clones os quais estão armazenados para análises posteriores de citometria de fluxo, *western blotting* e proteômica. Além disso, também é importante ajustar a concentração do anticorpo obtido.

Para efeito de discussão do *Western blotting* realizado foram identificados os CDs de maior probabilidade, seu respectivo nome e o peso molecular em quilodaltons. O quadro 17 apresenta estes dados.

Quadro 17– Identificação dos prováveis CDs correspondendo à especificidade dos SNC em estudo, seu nome e respectivo peso molecular

Marcador	Nome	PM
CD31	PECAM-1 – Molécula de adesão	120-140
CD32b	FCG2, FCGR2B, IGFR2	40
CD36	Glicoproteína 4 ou FAT	75-100
CD40	Membro da família de receptores do fator de necrose tumoral	45-50
CD43	Sialophorin, Leukosialin, Galactoglycoprotein, SPN	90-100
CD44	Homing cell adhesion molecule	80-100
CD46	Proteína do Coeficiente de Membrana(MCP), Antígeno comum de leucócitos trofoblásticos, TRA2	56-66
CD49e	Anti-integrina alfa 5	120
CD55	Decay accelerating fator - DAF	70
CD75	ST6GAL1, MGC48859, SIAT1, ST6GALL, ST6N, ST6 b-Galactosamide a-2,6-sialyltransferase, Sialo-masked lactosamine, Carbohydrate of a2,6 sialyltransferase	47
CD98	SLC3A2, 4F2, 4F2HC, 4T2HC, MDU1, NACAE, FRP-1, RL-388	80-94
CD99	MIC-2/ single-chain type-1 glycoprotein	32
CD109	8A3, E123 7D1, 150kD TGF-b-1-binding protein, Platelet-specific Gov antigen	150-170
CD110	TPO-R, MPL, C-MPL	82-84
CD111	Nectina 1 – receptor de poliovírus, herpesvirus	55-65
CD114	CSF3R, G-CSFR, HG-CSFR	95-139
CD147	Basigina 1 ou indutor da matriz de metaloproteinases	37-50
CD241	TGF-b-1- proteína de ligação, antígeno Gov específico de plaquetas	50

Fonte: Arquivo pessoal, 2021, obtido de diferentes fontes bibliográficas.

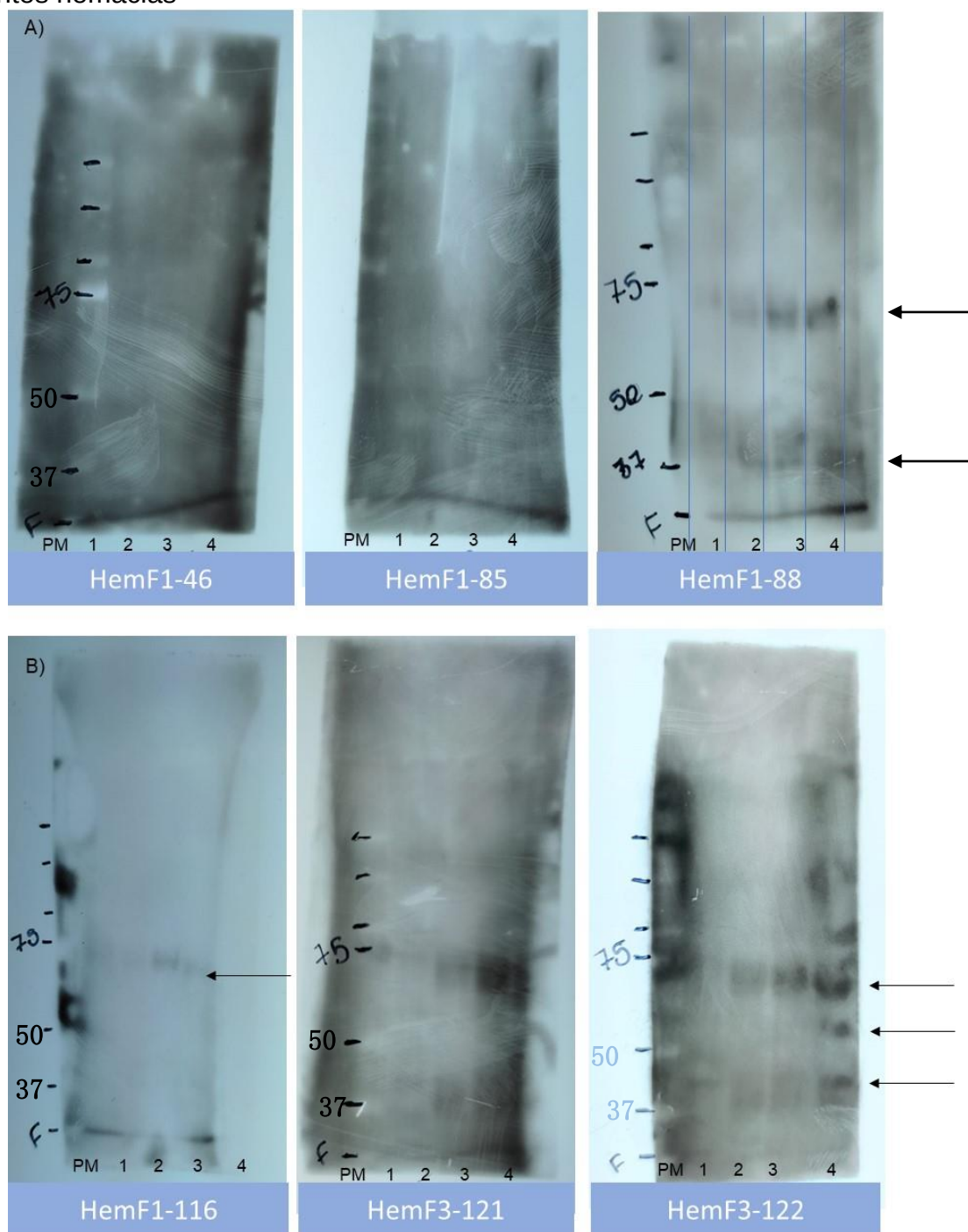
A técnica de *Western blotting* com sobrenadante de cultura com incubação *overnight*, conforme Figura 17, manteve um padrão não interpretável para os sobrenadantes HemF1-46 e HemF1-85.

No SNC HemF1-46 existe uma banda sugerida em hemácia de sangue de cordão, grupo A+ (pista 4, de mais alto peso molecular), figura 17 A) que deverá ser elucidado em novo *western blotting*. No entanto, mesmo sendo não interpretável, o não aparecimento de banda seria confirmatório ao teste de hemaglutinação e citometria de fluxo os quais o HemF1-46 e HemF1-86 não reconhecem hemácias. Dessa forma, apenas lisados de hemácias não seriam os mais adequados para esse tipo de anticorpo, sendo necessário futuros testes com lisados de outras células, como por exemplo, plaquetas, HUVEC e CTM.

Para o sobrenadante HemF1-88 o perfil é diferente e podem ser observadas bandas de entre 65 e 75kDa e eventualmente banda de menor PM (ao redor de 37kDa). Estas dúvidas deverão ser elucidadas com novo *blotting* feito a partir do clone gerado (em andamento). Com o WB, a hipótese do Hemf1-88 ser um marcador de CD49e foi eliminada.

As hipóteses a serem validadas com proteômica ou com testes em paralelo por citometria de fluxo ficam com especificidades prováveis: CD36, CD44, CD55, CD111, CD147. Como das duas primeiras hipóteses existem reagentes no laboratório, foram indicados testes por citometria de fluxo para validar ou excluir as especificidades: CD36 e CD44. Conforme quadro 16 e figura 16.

Figura 17– Western blotting dos SNC utilizando extrato membranário de diferentes hemácias



Fonte: arquivo pessoal, 2022. **Legenda.** PM = pista de peso molecular; 1 = pista com lisado membranário de hemácias de cavalo; 2= lisado membranário de hemácia de sangue de cordão O+; 3= lisado membranário de hemácias de indivíduo adulto O+, e 4= lisado membranário de sangue de cordão A+

6 CONCLUSÃO

Apesar do grande número de fusões realizadas não foi obtido anticorpo monoclonal murino de especificidade anti-*i*.

Foram obtidos 6 híbridos secretores de anticorpos potencialmente de interesse, dirigidos contra outras especificidades expressas sobre a membrana das hemácias.

Não foi possível caracterizar, de forma definitiva, o anticorpo secretado pelo híbrido HemF1-88. Há necessidade de novos ensaios de *Western blotting* e análise proteômica.

O meio condicionado obtido de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo murino (MC-CT_{tam}) se mostrou efetivo como aditivo de fusão celular quando comparado com método clássico (*feeder cells*) e lisado de células mononucleares do timo. O MC-CT_{tam} deve despontar como produto de base tecnológica, como substituto de células do timo de camundongos recém-nascidos.

7 PERSPECTIVAS

Inúmeros ensaios foram realizados com a finalidade de se caracterizar a especificidade dos anticorpos obtidos, mas isto não foi possível. Há necessidade de se realizar a análise proteômica para determinar com certeza contra qual proteína os anticorpos são dirigidos. Além disto, uma vez com a especificidade definida, testes de competição poderão ser realizados por Citometria de Fluxo.

8 LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO

Puderam ser identificadas limitações neste trabalho, entre elas, a dificuldade em se pesquisar durante uma pandemia, com muitos laboratórios fechados, além do pequeno número de amostras testadas na etapa de validação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jabri B. Immuno-hématologie et groupes sanguins [Internet]. Casablanca-Marrocos; 2018. Available from: <http://www.ipsin.ma/img/immunohemato.pdf>.
2. Iolascon A, Andolfo I, Russo R. Advances in understanding the pathogenesis of red cell membrane disorders. *Br J Haematol*. 2019;187(1):13–24.
3. Suresh S. Mechanical response of human red blood cells in health and disease: Some structure-property-function relationships. *Journal of Materials Research*. 2006; 21: 1871–1877.
4. Murador P, Deffune E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(2): 168-178.
5. Diez-Silva M, Dao M, Han J, Lim CT, Suresh S. Shape and biomechanics characteristics of human red blood cells in health and disease. *MRS Bull*. 2010;35(5):382–8.
6. Denomme GA. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens. *Transfus Med Rev*. 2004;18(3):203–31.
7. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. ISBT. 2021 Available from <https://www.isbtweb.org/isbt-working-parties/rcibgt/resources.html>8. Politis C, Wiersum JC, Richardson C, Robillard P, Jorgensen J, Renaudier P, et al. The International Haemovigilance Network Database for the Surveillance of Adverse Reactions and Events in Donors and Recipients of Blood Components: technical issues and results. *Vox Sang*. 2016;111(4):409–17.
9. Reid ME, Lomas-Francis C. li blood group collection. *Blood Gr Antigen Factsb*. 2004;486–8.
10. Cooling L. Polylactosamines, there's more than meets the "li": a review of the I system. *Immunohematology*. 2010;26(4): 133-55.
11. Yu LC, Twu YC, Chang CY, Lin M. Molecular basis of the adult i phenotype and the gene responsible for the expression of the human blood group I antigen. *Blood*. 2001;98(13):3840–5.
12. Sasaki K, Kurata-Miura K, Ujita M, Angata K, Nakagawa S, Sekine S, et al.

- Expression cloning of cDNA encoding a human β -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase that is essential for poly-N-acetyllactosamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14294–9.
13. Pourazar A. Red cell antigens: Structure and function. *Asian J Transfus Sci*. 2007; 1: 24–32.
 14. Marsh WL, Jenkins W. anti-i: a new cold antibody. *Nature*. 1960;125(4752):753–5.
 15. Rouger P, Juszczak G, Doinel C, Salmon C. Relationship between I and H antigens, I: a study of the plasma and saliva of a normal population. *Transfusion*. 1980;20:536-539.
 16. Corinne M, Larochelle N. Identification de la base moléculaire de l'antigène érythrocytaire de haute fréquence PEL. Mémoire de maîtrise. 2013.
 17. K Burnie. Ii antigens and antibodies No Title. *Can J Med Technol*. 1973;55(6):5–7.
 18. Marsh WL ; Nichols ME; Reid M. The definition of two I antigen components. *Vox Sang*. 1971;20:209–17.
 19. Testa U, Rochant H, Henri A, Titeux M, Ton That H, Vainchenker W. Change in i-antigen expression of erythrocytes during in vivo aging. *Rev Fr Transfus Immunohematol*. 1981;24(3):299–305.
 20. S Hirohashi, H Clausen, E Nudelman, H Inoue YS and SH. A human monoclonal antibody directed to blood group i antigen: heterohybridoma between human lymphocytes from regional lymph nodes of a lung cancer patient and mouse myeloma. *J Immunol*. 1986;136(11):4163–8.
 21. DB Thomas. The i antigen complex: A new specificity unique to dividing human cells. *Eur Jounal Immunol*. 1974; 4: 819—24.
 22. Clausen H, Hakomori S -i. ABH and Related Histo-Blood Group Antigens; Immunochemical Differences in Carrier Isotypes and Their Distribution. *Vox Sang*. 1989;56(1):1–20.
 23. Feizi T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*. 1985;314:53–7.
 24. Feizi T. Chapter 15 Carbohydrate Differentiation Antigens Ii, SSEA-1 (Le x) and Related Structures. *Prototype Mammalian Carbohydrate Antigens That*

- Serve as Ligands in Molecular Recognition [Internet]. Vol. 29, New Comprehensive Biochemistry. Elsevier Masson SAS; 1997. 571–586 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60628-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60628-6)
25. Silverton EW, Navia MA, Davies DR. Three dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(11):5140–4.
 26. Roelcke D. Cold Agglutination. *Transfus Med Rev*. 1989;3(2):140–66.
 27. Shumak KH, Rachkewich RA, Greaves MF. I and i antigens on normal human T and B lymphocytes and on lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Immunol Immunopathol*. 1975;4(2):241–7.
 28. Zilow G. · Kirschfink M. · Roelcke D. Red Cell Destruction in Cold Agglutinin Disease. *Transfus Med Hemotherapy*. 1994;21(6):410-415.
 29. Daniels G. Human Blood Groups. 2^a ed. Blackwell Science Ltd. 2012; 571p
 30. Marsh WL. Anti-i: A Cold Antibody Defining the li Relationship in Human Red Cells. *Br J Haematol*. 1961;7(200): 200–9.
 31. de Almeida R, Nakamura CN, de Lima Fontes M, Deffune E, Felisbino SL, Kaneno R, et al. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. *MAbs*. 2018;10(1): 46-54.
 32. Kohler, G.; Milstein C. Cultivos continuos de células fusionadas que secretan anticuerpos de especificidad predefinida. *Nature* [Internet]. 1975;256(Mopc 21):495–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/256495a0%0Apapers3://publication/doi/10.1038/256495a0>
 33. Pontecorvo G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet*. 1975;1(4):397–400.
 34. Nishio, SA. Desenvolvimento de imunossensor para detecção de hemorragia feto – materna (HFM) [Dissertação]. [Botucatu]: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2019. 73 p.
 35. Martinez PF. Caracterização de anticorpos monoclonais anti-glicoforina humana [Dissertação]. [Botucatu]: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2016. 47 p
 36. De Santis L. Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários

- humanos. [Dissertação]. [Botucatu]: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"; 2018. 89 p.
37. Liu JKH. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg.* 2014;3:113–6.
 38. J Punt, S Strasfor PJJO. *Kuby Immunology*. 8th ed. MKcmillan Publisher, editor. London; 2019. 880 p.
 39. Marques. H. Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica. [Tese]. [Rio de Janeiro] : Fiocruz; 2005. 109 p
 40. Wu AM. The molecular immunology of complex 2 carbohydrates [Internet]. Albert M. Wu, editor. Vol. 1, Springer Science. New York: y Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2001. 634 p. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4615-1267-7.pdf>
 41. Hirvonen T, Suila H, Tiitinen S, Natunen S, Laukkanen M-L, Kotovuori A, et al. Production of a Recombinant Antibody Specific for i Blood Group Antigen, a Mesenchymal Stem Cell Marker. *Biores Open Access.* 2013;2(5):336–45.
 42. Puck TT, Marcus PI. a Rapid Method for Viable Cell Titration and Clone Production With Hela Cells in Tissue Culture: the Use of X-Irradiated Cells To Supply Conditioning Factors. *Proc Natl Acad Sci.* 1955;41(7):432–7.
 43. Kohler, G.; Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495–7.
 44. Catarina S. Silva, Rui L. Reis, Albino Martins NMN. Recapitulation of Thymic Function by Tissue Engineering Strategies. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2021;10(20). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.202100773>
 45. Llames S, García-Pérez E, Meana Á, Larcher F, Del Río M. Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2015;21(4):345–53.
 46. Wang HX, Gao XW, Ren B, Cai Y, Li WJ, Yang YL, et al. Comparative analysis of different feeder layers with 3T3 fibroblasts for culturing rabbits limbal stem cells. *Int J Ophthalmol.* 2017;10(7):1021–7.
 47. Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhason BV, Venkatachalam S, Mohan M, et al. Alternative to FBS in

- animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon* [Internet]. 2021;7(8):e07686. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07686>
48. Menezes K, Takamori ER, Teixeira MVT, Carias RBV, Borojevic R. Revisão integrativa para substituição do soro fetal bovino por plasma humano rico em plaquetas para cultivo e expansão ex vivo de células humanas destinadas às terapias avançadas. *Vigilância Sanitária em Debate*. 2018;6(1):109.
 49. Van Der Valk J, Kolar R, Gstraunthaler G. Fetal Bovine Serum-free Media and Alternatives The use of FBS in cell culture presents significant issues. 2010;(2004):2010. Available from: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/3r/pdf/jan_vandervalk.pdf
 50. Tegel H, Dannemeyer M, Kanje S, Sivertsson Å, Berling A, Svensson AS, et al. High throughput generation of a resource of the human secretome in mammalian cells. *N Biotechnol* [Internet]. 2020;58(June):45–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.05.002>
 51. Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells Int*. 2016;2016. 2016:6901286
 52. Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, Basalova N, Kalinina N, Akopyan Z, et al. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1–16.
 53. Chouw A, Facicilia G, Sartika CR, Faried A, Milanda T. Factors Influencing the Therapeutic Potential of the MSC-derived Secretome. *Regen Eng Transl Med* [Internet]. 2022;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s40883-021-00242-x>
 54. Madonna R, Angelucci S, Di Giuseppe F, Doria V, Giricz Z, Görbe A, et al. Proteomic analysis of the secretome of adipose tissue-derived murine mesenchymal cells overexpressing telomerase and myocardin. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2019;131(November 2018):171–86. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.04.019>
 55. Lapuente JP, Bl A, Marco-brualla J, Gonzalo G, Desportes P, Sanz J, et al.

- Cytokine Profile and Anti-Inflammatory Activity of a Standardized Conditioned Medium Obtained by Coculture of. 2022;1–18.
56. JF. B. Thymic hormones. *J Immunopharmacol*. 1979;1(3):277–89.
 57. Sharma H, Moroni L. Recent Advancements in Regenerative Approaches for Thymus Rejuvenation. *Adv Sci*. 2021;8(14):1–22.
 58. Y. Brossard, J. C. Pons, I. Jrad, J. van Nifterik, R. Gillot, C. Saure, M. Le Gaudion, A. Richard EP. Maternal-Fetal Hemorrhage: A Reappraisal. *Vox Sang*. 1996;71(2):103–7.
 59. ES1 S, Polesky HF, Polesky' S articles by 'H F, HF P. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion* [Internet]. 1990;30(4):344–57. Available from: <https://europepmc.org/article/med/2190367>
 60. Clarke C. Rhesus Haemolytic Disease [Internet]. Ltd. MM and TPC, editor. Liverpool; 2000. 58 p. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-94-011-6138-1.pdf>
 61. Wylie, Blair J. MD, MPH; D'Alton MEM. Fetomaternal Hemorrhage. *Obstet Gynecol* [Internet]. 2010;115(5). Available from: https://journals.lww.com/greenjournal/fulltext/2010/05000/fetomaternal_hemorrhage.26.aspx
 62. Meleti D, De Oliveira LG, Araujo Júnior E, Caetano ACR, Boute T, Nardoza LMM, et al. Evaluation of passage of fetal erythrocytes into maternal circulation after invasive obstetric procedures. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013;39(9):1374–82.
 63. Stefanovic V. Fetomaternal hemorrhage complicated pregnancy risks, identification, and management. *Obstet Gynecol*. 2016;28(2):86–94.
 64. Duckett JRA, Constantine G. The Kleihauer Technique: An accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1997;104(7):845–6.
 65. Blanchard D, Bernard D, Loirat MJ, Frioux Y, Guimbretiere J, Guimbretiere L. Caracterisation d'anticorps monoclonaux murins diriges contre les erythrocytes feetaux .*Rev. Fr. Transfus. Hemobiol*.1992; 35: 239-254.
 66. Maisonrouge-McAuliffe, F, Kabat, EA. Immunochemical studies on blood groups LXIV. Fractionation, heterogeneity, and chemical and

- immunochemical properties of a blood group substance with B, I, and i activities purified from human ovarian cyst fluid. *Arch. Biochem. Biophys.* 1976; 175: 71-80.
67. Office of the Institutional Animal Care and Use Committee. Adjuvants and Antibody Production: [Internet]. 2021 [cited 2021 Oct 12]. Available from: <https://animal.research.uiowa.edu/>
 68. Deffune E. Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Biologia Celular. Botucatu-SP, Brasil; 2020.
 69. Gooding J. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 2nd ed. 1988. 93 p.
 70. Moroz A, Felisbino SL, Deffune E. Platelet and plasma bioactive scaffolds for stem cell differentiation: What are we missing? *Platelets.* 2014;25(7): 556-557.
 71. Kämpf S, Seiler E, Bujok J, Hofmann-Lehmann R, Riond B, Makhro A, et al. Aging markers in equine red blood cells. *Front Physiol.* 2019;10(JUL).
 72. Harbour C, Low KS, Marquis CP, Barford JP. pH Control options for hybridoma cultures. Vol. 3, *Biotechnology.* 1989.
 73. Xu J, Rodriguez D, Kim JJ, Brooks PC. Generation of monoclonal antibodies to cryptic collagen sites by using subtractive immunization. *Hybridoma.* 2000;19(5):375–85.
 74. de Almeida R, Nakamura CN, de Lima Fontes M, Deffune E, Felisbino SL, Kaneno R, et al. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. *MAbs* [Internet]. 2018;10(1):46–54. Available from: <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1331804>
 75. Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, Krebsbach PH. Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: From feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells.* 2013;31(1):1–7.
 76. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7(1).
 77. Kang SK, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Interactions between human adipose

- stromal cells and mouse neural stem cells in vitro. *Dev Brain Res.* 2003;145(1):141–9.
78. Feizi T, Kabat E. Immunochemical studies on blood groups. Classification of anti-I and anti-i sera into groups based on reactivity patterns with various antigens related to the blood group A,B,H, Le a, Le b and precursor substances. *J Exp Med.* 1972;135(3):1247–58.
 79. Toh BH, Diggle TA, Koh SH. Ii blood group antigens on fibroblast cell surfaces. *Clin Immunol Immunopathol.* 1979;12(2):177–82.
 80. Wiener, as; unger, Ij; cohen I and fj. Type-specific cold auto-antibodies as a cause of acquired hemolytic anemia and hemolytic transfusion reactions: biologic test with bovine red cells. *Ann Intern Med [Internet].* 1956;1(44):2. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/pdf/10.7326/0003-4819-44-2-221>
 81. Bardyn M, Tissot JD, Prudent M. Oxidative stress and antioxidant defenses during blood processing and storage of erythrocyte concentrates. *Transfus Clin Biol [Internet].* 2018;25(1):96–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.traccli.2017.08.001>
 82. Desmarets M, Bardiaux L, Benzenine E, Dussaucy A, Binda D, Tiberghien P, et al. Effect of storage time and donor sex of transfused red blood cells on 1-year survival in patients undergoing cardiac surgery: An observational study. *Transfusion.* 2016;56(5):1213–22.
 83. Greenfield EA. Collecting and Storing Hybridoma Tissue Culture Supernatants. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020; 2020(10):447-449.
 84. van Schravendijk MR, Handunnetti SM, Barnwell JW, Howard RJ. Normal human erythrocytes express CD36, an adhesion molecule of monocytes, platelets, and endothelial cells. *Blood.* 1992;80(8):2105-14.
 85. Denomme GA. The structure and function of the molecules that carry human red blood cell and platelet antigens. *Transfus Med Rev.* 2004;18(3):203-31.
 86. Ghosh A, Murugesan G, Chen K, Zhang L, Wang Q, Febbraio M, Anselmo RM, Marchant K, Barnard J, Silverstein RL. Platelet CD36 surface expression levels affect functional responses to oxidized LDL and are associated with inheritance of specific genetic polymorphisms. *Blood.* 2011;117(23):6355-66.

87. Chandran J, Wadhwa N, Madhu SV, Kumar R, Sharma S. Monocyte CD36 expression associates with atherosclerotic burden in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020;163:108-15.