

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

FERNANDO APARECIDO DE OLIVEIRA

**VALIDAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL PARA
DETECÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE
PLAQUETAS HUMANAS**

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

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Elenice Deffune

Coorientador: Prof. Dr Andrey Moroz

**Botucatu
2021**

FERNANDO APARECIDO DE OLIVEIRA

VALIDAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL PARA
DETECÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE
PLAQUETAS HUMANAS

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

Orientador(a): Prof^ª Dr^ª Elenice Deffune

Coorientador: Prof. Dr Andrey Moroz

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Fernando Aparecido de.

Validação de anticorpo monoclonal dirigido contra
antígenos plaquetários para detecção de vesículas
extracelulares de plaquetas humanas / Fernando Aparecido
de Oliveira. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Elenice Deffune

Coorientador: Andrei Moros

Capes: 33004064

1. Anticorpos monoclonais. 2. Antígenos de plaquetas
humanas. 3. Plaquetas. 4. Fibrinogênio.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Fibrinogênio;
Plaquetas.

Fernando Aparecido de Oliveira

**VALIDAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA
ANTÍGENOS PLAQUETÁRIOS PARA DETECÇÃO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DE PLAQUETAS HUMANAS.**

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

Orientador: Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune

Comissão examinadora

Prof. Dr Matheus Berthanha

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Prof(a). Dr(a). Helga Caputo Nunes Hoszhausen
Universidade Estadual de Campinas

Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, _____ de _____ de _____

Dedicatória:

A Deus pelas pessoas que colocou em minha vida. A minha família pelo apoio e compreensão em todos os momentos e em especial a minha orientadora Prof^a Dr^a Elenice Deffune por tudo que aprendi e evolui, graças a senhora, toda dedicação e incentivo certamente contribuíram muito para a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas colaboraram para o desenvolvimento do meu trabalho e meu crescimento profissional durante o meu período de mestrado, me sinto muito grato por isto.

Também agradeço imensamente:

Aos doadores de sangue pelo comparecimento e apoio deste trabalho, sem estes, não seria possível.

Ao Prof. Dr Willian Fernando Zambuzzi do IBB/UNESP pelas orientações e colaborações indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

Ao presente de ter ganhado uma amiga antes da super competente profissional que conheci, Thaís Silva Pinto, durante os meus experimentos no IBB/UNESP. Sempre lembrarei da sua dedicação e apoio à mim dedicados.

A minha amiga Pâmela Leite Silva, pela ajuda inenarrável durante os meus experimentos e em todas as vezes que eu precisei, até de madrugada! (Nunca esquecerei).

Ao Programa de Pós-Graduação Pesquisa e Desenvolvimento/Biotecnologia Médica pela oportunidade de crescimento profissional.

Ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu que através do Hemocentro de Botucatu, me proporcionou desenvolver parte deste trabalho em seu parque tecnológico, com todos os profissionais altamente capacitados.

Ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada do HCFMB/UNESP pela disponibilidade de realizar meus experimentos em suas áreas com tecnologias de alta performance e com orientações importantíssimas, em especial ao Laboratório de Citometria de Fluxo na pessoa da Professora Márjorie de Assis Golim.

A minha amiga e incentivadora Rita Alvarado, meu agradecimento especial pelo apoio de sempre, seja como profissional ou amiga nas horas de apoio um ao outro, momentos que só nós passamos e superamos juntos.

A minha amiga, companheira de sempre, Alba Albano que me ajudou e ajuda além das necessidades acadêmicas e profissionais, seguimos juntos!

A minha amiga (irmã que ganhei) Gisela Daroz, pelo apoio de sempre, sou feliz por tê-la por perto.

As minhas amigas Mariane Risso, Ana Livia Bovolato e Juliane Campos pelo apoio desde o início, do então projeto de mestrado, por me mostrarem o caminho a ser seguido, pelas suas experiências acadêmicas.

Por fim, todos aqueles que de alguma forma colaboram e fizeram parte deste trabalho.

RESUMO

RESUMO OLIVEIRA, FA. Validação de Anticorpo Monoclonal para detecção de Vesículas Extracelulares de Plaquetas Humanas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

A terapia transfusional, com o uso de sangue e componentes como o Concentrado de Plaquetas, é uma tecnologia de grande relevância na atualidade, no entanto pode acarretar complicações ao receptor. Estes hemocomponentes precisam de rigoroso controle de qualidade, no entanto requerem tem alto valor agregado de aplicação. **Objetivo:** Estabelecer novo método de controle de qualidade de plaquetas com finalidade transfusional compreendendo: 1) Caracterização e validação de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos plaquetários humanos. 2) Estabelecer padrões de conformidade e não conformidade para a liberação de CP utilizando a tecnologia de monitoramento de VEs por Citometria de Fluxo e 3) Propor depósito de patente para o anticorpo monoclonal caracterizado. **Resultados:** Foram obtidos dos anticorpos monoclonais murinos (AcMm), após a fusão celular, 3.125 híbridos, após a clonagem celular pela técnica de diluição limitante foram selecionados 2 clones. Um destes clones, o PAT1-10 A1 foi o selecionado para os testes de caracterização e eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting* foram realizados. Para a corrida eletroforética foram usadas as proteínas extraídas da membrana plaquetária de 5 diferentes doadores. Da eletroforese 1D, em Gel de Poliacrilamida a 6% coradas com Azul de Coomassie, foi possível identificar o reconhecimento de proteína de alto peso molecular e subsequente as análises de proteômica, seguidas por citometria de fluxo com anticorpos monoclonais de especificidade anti-plaquetária, marcados com fluorocromo: anti-CD41-PE; ANTI-CD61-FITC e anti-CD62P – APC. **Conclusão:** Estabeleceu-se novo método de controle de qualidade de plaquetas com finalidade transfusional, baseado em citometria de fluxo com anticorpo monoclonal com a especificidade anti-fibrinogênio produzido *home made* e um imunossensor deverá ser construído e testado. Foi caracterizado o anticorpo monoclonal PAT1-10 A5, com especificidade anti fibrinogênio humano, molécula total.

Palavras chave: Plaquetas, Vesículas Extra-celulares, Anticorpo Monoclonal

ABSTRACT

OLIVEIRA, FA. **Validation of Monoclonal Antibody for detection of Extracellular Vesicles of Human Platelets. Dissertation (Master)** – Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

Blood transfusion therapy, which uses blood and components, is a great relevant technology nowadays and helps to improve and save the life of the patient. However, like other therapeutic interventions, this therapy may lead to acute or late complications for the blood receptor. Among medical recommendations for blood transfusion, the Platelet Concentration (PC) underlines, it can be obtained through the separation by centrifugation from a whole blood unit (WBU) or by apheresis. These blood components have different volume and amount of platelets depending on the form of their preparation. Regarding to storage, blood components must be stored in an environment of a temperature between 20 to 24°C, under constant agitation, and valid for up to 5 days. The transfusion of PC may be required when thrombocytopenia occurs, whether due to marrow failure and high platelet use or due to platelet consumption or peripheral destruction. It is necessary to have a strict quality control (QC) with a high value when it comes to blood components. This study validated the antibody produced from the blood components in order to contribute not only with cutting-edge technology and low cost but also with the QC of them, consequently, increase the safety of blood transfusions. **Objective:** This study established a new method of QC for platelets under transfusion purposes: 1) Characterization and validation of monoclonal antibodies against human platelet antigens. 2) Compliance and non-compliance standards for CP release using the EVs monitoring technology by Flow Cytometry. 3) Patent purpose for the characterized monoclonal antibody. **Results:** After cell fusion and cell cloning by limiting dilution technique, 3.125 hydrids were obtained from murine monoclonal antibodies (mAbs) and 2 clones were chosen, respectively. PAT1-10 A1 was selected for the characterization tests, polyacrylamide gel electrophoresis and Western Blotting were also performed. Proteins from platelet membrane of 5 different donors were extracted for the electrophoresis performance. Through 1D eletrophoresis method, 6% polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue, was possible to identify the recognition of high molecular weight proteins and subsequently proteomics analysis, followed by Flow Cytometry with labeled anti-platelet specific monoclonal antibodies with fluorochrome: anti-CD41PE, anti-CD61-FITC, and anti-CD62P-APC. **Conclusion:** Our results indicate that a new method of QC of platelets for transfusion purposes was established, based on Flow Cytometry with monoclonal antibody with *in house* specificity of anti-fibrinogen, however, an immunosensor should be constructed and tested. Furthermore, the monoclonal antibody PATI-10 A5 was characterized with specificity agains human fibrinogen, total molecule.

Keywords: Platelets, Extra-cellular Vesicles, Monoclonal Antibody

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plaquetas04
- Figura 2.** Papel multifuncional das plaquetas
- Figura 3.** Identificação das informações obtidas do rótulo de hemocomponentes
- Figura 4.** Eletroforese 1D, SDS-PAGE, de extrato de membrana de plaqueta humana
- Figura 5.** Técnica de *Western blotting* em DSD-PAGE a 10%
- Figura 6.** Técnica de *Western blotting* em DSD-PAGE a 6%
- Figura 7.** Representação esquemática das cadeias do fibrinogênio humano
- Figura 8.** Comparação do gating de plaquetas frescas e conservadas pelo método de Citometria de Fluxo.
- Figura 9.** Comparação do gating de plaquetas frescas e mudança do tamanho das plaquetas conforme o dia de conservação

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Proteins Identified using mass spectrometry with electrospray ionization in *homo sapiens* platelet samples - band 1.
- Tabela 2.** Proteins Identified using mass spectrometry with electrospray ionization in *homo sapiens* platelet samples - band 2.
- Tabela 3.** Proteins Identified using mass spectrometry with electrospray ionization in *homo sapiens* platelet samples - band 3.
- Tabela 4.** Média simples dos valores da média de intensidade de fluorescência para o PAT 2-10A5, CD61-FITC e co-expressão com CD62P(APC) e CD41(PE)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Glicoproteínas da membrana plaquetária e antígenos relacionados

Quadro 2. Glicoproteínas da membrana plaquetária, respectivos ligantes e número de sítios antigênicos

Quadro 3. Genotipagem plaquetária utilizadas como imunógeno

LISTA DE ABREVIações

ACN - Acetonitrila

AcMm - Anticorpo Monoclonal Murino

CPs - Concentrado de Plaquetas

DAMPs - *Damage-associated molecular patterns*

DTT - Dithiothreitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FITC - Isotiocianato de Fluoresceína

FS - Foward Scatter

GPs - Glicoproteínas

HLA - Antígenos Leucocitários Humanos

HPA - Antígenos Plaquetários Humanos

ISEV - Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares

MAIPA - Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen

NET - *Neutrophil Extracellular Traps*

PMSF - Fenilmetilsulfonil

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

PRRs - *Pattern Recognition Receptors*

PVDF - Difluoreto de Polivinilideno

RT - Reações Transfusionais

SNC - Sobrenadante de Cultura

SS - Side Scatter

ST - *Sangue Total*

STS - *Society of Thoracic Surgeons*

SCA - *Society of Cardiovascular Anesthesiologists*

TBS-T - Solução Salina Tris-tamponada

TP - Tempo de Protrombina

TRALI - Lesão Pulmonar Associada à Transfusão

UniProt - *Universal Protein Resource*

VEsP - Vesículas Extracelulares Plaquetárias

VWF - Fator Von Willebrand

SUMÁRIO

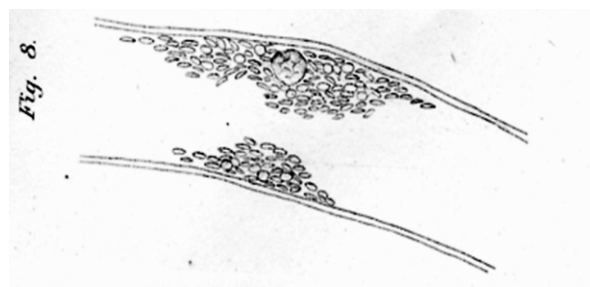
1. INTRODUÇÃO.....	13
2 - OBJETIVOS.....	25
2.1 – Objetivo Geral.....	25
2.2 - Objetivos Específicos:.....	25
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
5 – RESULTADOS ESPERADOS.....	35
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
7 - CRONOGRAMA:.....	54
8- SUPORTE FINANCEIRO.....	54

1. INTRODUÇÃO

As plaquetas sanguíneas são elementos figurados do sangue sendo considerados fragmentos citoplasmáticos anucleados produzidos pelos megacariócitos. Estes denominados elementos figurados do sangue, verdadeiras vesículas extracelulares dos megacariócitos tem um papel fundamental na homeostasia por serem integrantes fundamentais dos processos de coagulação/hemostasia.

Foi Max Schultze que publicou a primeira descrição precisa e convincente das plaquetas como parte de um estudo dedicado principalmente aos glóbulos brancos em 1865 (1). Em 1881, Giulio Bizzozero demonstrou o valor dessa descoberta observando microscopicamente que as plaquetas estavam no sangue circulante de animais vivos e no sangue coagulado removido dos vasos sanguíneos. Já nesta época ele mostrou que as plaquetas eram o primeiro componente do sangue a aderir às paredes dos vasos sanguíneos danificados *in vivo* e, *in vitro*, e que também aderiam aos fios de sutura que posteriormente ficavam cobertos com fibrina (2). Portanto. Até os dias atuais, Bizzozero é reconhecido como sendo o primeiro autor a descrever o papel das plaquetas na trombose (3).

Figura 1 – Desenho original de Bizzozero provando a presença das plaquetas no trombo



Fonte: Extraído de Bizzozero, 1881.(2)

Apesar da precisão da descrição, durante muito tempo poucas pesquisas destacando seu aspecto multifuncional aconteceram, e as plaquetas ficaram praticamente no “limbo científico”, sem valorização, sendo “redescobertas” em 1960 (4).

A compreensão dos caminhos históricos que conduziram ao estado atual de conhecimento no campo dos estudos das plaquetas pode ser esclarecedora e inspiradora. Embora muito dinâmicas essas células que contêm um denso citoesqueleto permanecem no estado de repouso, mantendo a forma discóide com um diâmetro variável entre 2-4 μ m (5). Quando ativadas evoluem sua forma física apresentando longos prolongamentos dendríticos que tem a função de facilitar sua adesão (6).

Evidências científicas atuais comprovam sua heterogeneidade estrutural, suas alterações em função da idade e propriedades de ativação plaquetária com consequências para uma diversidade de funções que exerce. Os processos de sinalização das populações de plaquetas envolvidas na formação de trombos com coagulação contínua são bem conhecidos. Como células secretoras e altamente responsivas, as plaquetas podem alterar o ambiente por meio da liberação de fatores de crescimento, quimiocinas, fatores coagulantes, espécies de RNA e vesículas extracelulares. Por outro lado, as plaquetas também se adaptam ao seu ambiente. Na parede inflamada do vaso, as plaquetas interagem com os leucócitos e o sistema de coagulação, interações mediando a tromboinflamação.(7) (8)(9)

As plaquetas participam ativamente do processo de hemostasia primária envolvendo 3 etapas subsequentes: adesão, ativação e agregação plaquetária. Estas etapas estão intimamente relacionadas com a lesão do endotélio e o sub-endotélio. Nesta atuação desempenham um papel fundamental na reparação vascular e manutenção de hemostasia, especialmente na hemostasia primária e interagem com os elementos do endotélio danificado, induzindo sua adesão seguida de ativação e, finalmente, agregação, resultando na formação de um trombo constituído por um agregado de plaquetas ligadas por fibrinogênio para ocluir a lesão vascular (10). Mas hemostasia ou coagulação do sangue não é a única função das plaquetas. Sua alta sensibilidade a diferentes doenças atribuiu-lhe o caráter de ser um dos marcadores mais acessíveis. Enquanto mantendo interações com leucócitos e células endoteliais restaura seu comportamento como importante marcador inflamatório.(11)

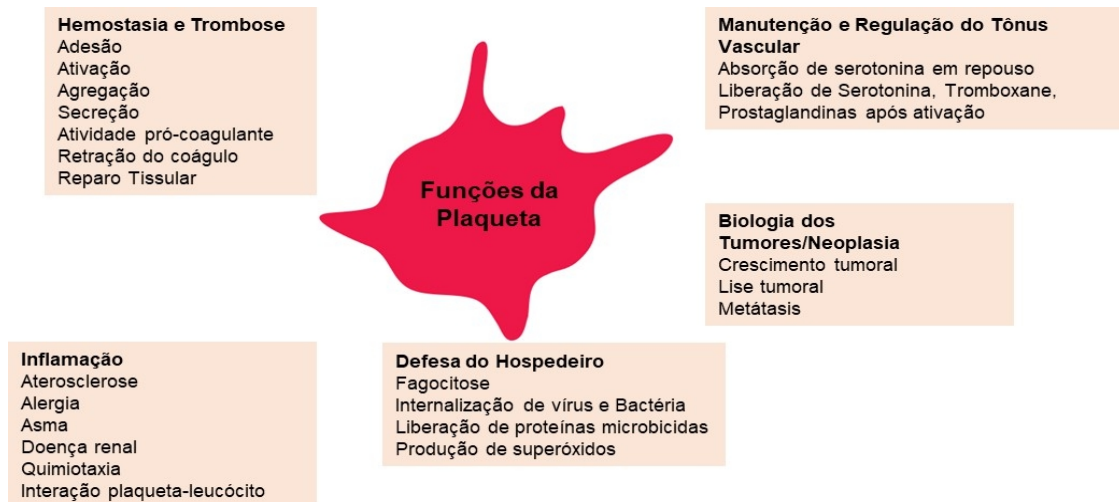
A reatividade plaquetária para diferentes patogenias é amplamente dependente de alguns marcadores biologicamente ativos como CD36, CD41, CD42a, CD42b e CD61. Esses incluem alguns receptores de superfície ativos e produtos secretórios de plaquetas. As plaquetas tendem a alterar a expressão e sinalização desses marcadores em diferentes diagnósticos e prognósticos de doenças constituindo-se um enorme campo para ser explorado (12).

Estruturalmente, as plaquetas podem ser divididas em três zonas principais: (1) - Zona Periférica: contém uma membrana revestida pelo glicocálix, onde estão os antígenos do sistema ABO e plaquetários (HPA), com glicoproteínas (GPs) participantes da função plaquetária: a GPIb e a HP IIbIIIa e fatores V e VIII. (2) - Zona sol-gel: o citoesqueleto da plaqueta. (3) - Zona de organelas responsáveis pelos processos metabólicos e grânulos que funcionam como elementos de depósito. Estas células também desempenham um papel importante na imunidade inata e adquirida, interagindo direta ou indiretamente com outras células sistema imunológico para desencadear ou manter a resposta inflamatória. (13) Além disto participam do processo inflamatório, inclusive por meio de membrana de muitos receptores imunes como receptores de citocinas, quimiocinas e muitos dos fatores solúveis contidos em seus grânulos. (14) (15)

A identificação do envolvimento das plaquetas no processo inflamatório e muitos outros, tem suscitado muitos questionamentos. A maioria deles é baseado na capacidade dessas células anucleadas de responder de maneira controlada a estímulos extremamente complexos. Investigações para responder a essas perguntas estão sendo realizadas no contexto de transfusão sanguínea. Os meios utilizados pelas células para se interagir ou trocar informações ocorrem de mecanismos diferentes. Esta interação pode ocorrer pelos fatores acima descritos: secreção de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e pequenos mediadores celulares (15).

Na figura 2 estão listadas as complexas funções citadas na literatura, com as quais as plaquetas se relacionam.

Figura 2 – Papel Multifuncional das Plaquetas



Fonte: Adaptado de Harrison et al, 2011. *Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function*. British Journal of Haematology, 155, 30–44 (16)

Durante seu curto ciclo de vida de 10 dias as plaquetas sofrem apoptose e na dependência de agressões externas, processos de necrose. Estes processos levam progressivamente as plaquetas à vesiculação. Diante da importância que as micropartículas, microvesículas foram tomando na literatura, estabeleceram-se critérios para nomenclatura, com a constituição da *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV), em 2012. A partir de então, todas estas denominações passaram a ser denominadas vesículas extracelulares (VEs). A diferenciação entre as classes de VEs é notável quanto a biogênese, proteínas marcadoras de membrana, proteínas internas, densidade de flutuação em gradiente de densidade e tamanho (17)

As vesículas extracelulares plaquetárias (VEsP) são moléculas menores que 0,5 µm carregando os antígenos específicos de plaquetas intactos, como GPIIb / IIIa, ou GPIb; elas representam 70 a 90% das antigamente denominadas micropartículas circulantes. Estas moléculas são anticoagulantes, pró-coagulante e pró-inflamatório.

Segmentação em vesículas é um evento terminal de plaquetas apoptóticas, independentemente da etiologia(18).

As VEsP são ricas em receptores de membrana (glicoproteínas, receptores citocinas e quimiocinas e receptores de adesão específicos de plaquetas. O Fator de coagulação V_a possui atividade de protrombinase que contribui para propriedades pró-coagulantes. Clinicamente, a elevação da taxa de VEsP circulante é associada a um maior risco trombótico (19). Além disso, essas moléculas são também capazes de induzir efeitos anticoagulantes, promovendo a capacidade de inativar o fator V_a da proteína C ativada, portanto, a deficiência de VEsP pode levar a distúrbios da hemóstase (20). Contendo moléculas solúveis (como sCD40L, PF4, RANTES) e receptores associados à inflamação (citocinas/quimiocinas), as VEsP podem ser consideradas como biomarcadores e efetoras dos processos inflamatórios. As VEsP contêm uma quantidade suficiente de RANTES que desencadeia uma resposta das células endoteliais ativadas, promovendo o recrutamento de monócitos(21). O papel dos VEsPs tem sido descrito em várias patologias, tais como doenças cardiovasculares, autoimunes e infecciosas(15).

Além disso, estas vesículas contribuem na regulação da resposta imunitária, fornecendo moléculas imuno-moduladoras das plaquetas para outras células do sistema imunológico (módulos de entrega transcelular), assim, a liberação de CD154 solúvel (CD40L) e o comprometimento do CD40 das células B permite a otimização da resposta sistema imunológico e produção de IgG específica. Além disso, a liberação de RANTES pelas plaquetas ativa o endotélio, induzindo o recrutamento de monócitos participantes do estado da doença inflamatória observada durante a aterosclerose (15,19,22). VEsP também podem transferir receptores de membrana plaquetária, como CD41a (GPIIb / IIIa), CD61 (GPIIIa), CD62P, CXCR4 e PAR-1, às células progenitoras hematopoiéticas do tipo CD34 + e aumentar a sua adesão ao endotélio, bem como reduzir o tempo de pega do enxerto de medula óssea em camundongos(23).

As VEsP também são capazes de modular as interações entre as células. A expressão e liberação de ácido araquidônico de VEsP pode aumentar adesão de células alvo inflamatórias, resultando em regulação positiva de integrinas e

moléculas aderentes promovendo a adesão de monócitos e células endoteliais (24). Durante o armazenamento, em resposta ao estresse, as plaquetas podem segregar ligantes endógenos para receptores do tipo *Toll like* (TLR) como HSP90. Portanto, a ativação de TLR, por moléculas endógenas do tipo *High-mobility group box 1* (HMGB1) pode representar uma ligação entre estresse oxidativo das plaquetas e inflamação (25)(26).

Além das VEs, as plaquetas possuem uma vasta lista de fatores solúveis que refletem as funções complexas destas células em hemostasia e imunidade. Durante uma transfusão plaquetária, altos níveis de citocinas/quimiocinas e fatores imunomoduladores, em particular sCD40L, em bolsas de CP parecem participar em diferentes tipos de RTs agudas tais que: alergia, reações não hemolíticas febris ou TRALI que envolvem o prognóstico vital (27).

A concentração de alguns desses fatores solúveis das plaquetas tais como sCD40L e RANTES aumenta significativamente em geral a partir do 3º dia de armazenamento dos CP. Além disso, a liberação desses fatores é relacionada ao status de ativação plaquetária e seu metabolismo. Além disso, esse estado de ativação é determinado, em parte, pelos processos de preparação, dispositivos médicos para uso único utilizados em transfusões sanguíneas (material de venóclise, equipo de transfusão) e, em particular, da qualidade das bolsas, do anticoagulante e da duração do armazenamento (28). Assim, paralelamente ao destaque do papel inflamatório dos fatores plaquetas solúveis e seu valor preditivo para a ocorrência de reações transfusionais adversas busca pela otimização do processo de preparação, para limitar a secreção. A contagem de plaquetas nos CPs entregues é também muito importante para reduzir destas reações transfusionais. As plaquetas transfundidas interagem, como as autólogas, com inúmeras outras células. A interação entre plaquetas, células imunes e células endoteliais desempenha um papel importante na indução de reações transfusionais, incluindo a *Transfusion-related Acute Lung Injury* (TRALI), que é a primeira causa da mortalidade relacionada à transfusão. Alguns estudos mostram que 0,08% dos pacientes transfundido pode desenvolver um TRALI (29).

Durante essas múltiplas interações, o sCD40L se acumula maneira importante durante o armazenamento é um elemento-chave que envolve plaquetas,

responsável por 95% sCD40L na corrente sanguínea e células expressando receptor, CD40, e especialmente neutrófilos, células endoteliais e linfócitos B. Depois da interação de CD40L-CD40, uma resposta inflamatória é induzida. Este último favorece ativação, secreção e destruição de endotélio e parede endotelial facilitando o extravasamento e ativação de neutrófilos sendo um fenômeno chave da indução TRALI. Além disso, a interação plaquetária com neutrófilos no contexto *Neutrophil Extracellular Traps* (NET) é um segundo mecanismo desta patologia. Assim, a interação neutrófilos-plaqueta no contexto do conjunto doador / receptor é um alvo importante para a prevenção da TRALI (30)(22).

Existe interação de plaquetas com patógenos, portanto, uma grande diversidade de patógenos que podem ameaçar o segurança transfusional através da transmissão de agentes infecciosos, incluindo agentes emergentes (ou desconhecidos) que não são detectáveis por testes convencionais. Esta informação é de grande relevância em hemoterapia. (31)

As consequências transfusionais da presença de VEs no plasma e nos hemoderivados devem ser consideradas. Portanto, é necessário realizar estudos sobre os efeitos potencialmente patogênicos das VEs em hemoderivados e na liberação de CPs durante os processos de produção e armazenamento desses produtos. (27)

A terapia transfusional, com o uso de hemocomponentes e hemoderivados é uma modalidade terapêutica reconhecida há mais de 50 anos, no entanto, seu sucesso está na dependência multifatorial que vai desde a qualidade do processamento do sangue às co-morbidades do paciente. Recentemente a *Society of Thoracic Surgeons (STS)/Society of Cardiovascular Anesthesiologists (SCA) Clinical Practice Guideline for Perioperative Blood Transfusion* publicou que nos últimos anos, a indicação de transfusão de sangue, incluindo concentrados de plaquetas aumentou 21%.(32)

No entanto, assim como outras intervenções terapêuticas, pode acarretarem complicações aguda ou tardias ao receptor. (33). Dentre as indicações médicas de transfusão de hemocomponentes, destaca-se o Concentrado de Plaquetas (CP), obtido através de separação, por centrifugação de uma unidade de sangue total - (ST) ou por aférese. Esses hemocomponentes tem volume e quantidade de

plaquetas diferentes dependendo da forma de preparo. Quanto ao armazenamento, devem ser mantidos em ambiente com temperatura de 20°C a 24°C, sob agitação constante e tem validade de 5 dias. (34).

A transfusão de concentrado de plaquetas ocorre diante da recorrência de plaquetopenia seja por falência medular e alto gasto de plaquetas ou por consumo ou destruição periférica. (35).

Para garantia do sucesso da transfusão de concentrado de plaquetas, é indispensável que parâmetros de controle de qualidade sejam sistematicamente consumados como: (1) - continente: integridade de bolsa e rótulo, higiene da bolsa, identificação da cor das plaquetas, presença ou ausência se *Swirling*, presença ou ausência de agregados plaquetários e determinação de volume da bolsa. (2) - Avaliação de conteúdo: determinação de pH, contagem de número de plaquetas e cultura microbiológica (36).

O controle de qualidade dos concentrados de hemácias e dos concentrados de plaquetas deve ser realizado em, pelo menos, 1% da produção ou 10 (dez) unidades por mês, o que for maior e cada item verificado pelo controle de qualidade deve apresentar um percentual de conformidade igual ou superior a 75%. E ainda pelo alto risco de contaminação microbiológica dos concentrados de plaquetas pela sua condição de armazenamento, recomenda-se realização de avaliação de contaminação microbiológica em 100% desta produção, bem como volume, contagem plaquetária e pH (37).

A perda gradual de qualidade nas plaquetas armazenadas, medida coletivamente com vários ensaios *in vitro* metabólicos, funcionais e morfológicos, é conhecida como lesão de armazenamento de plaquetas. Com o advento das tecnologias de redução de patógenos e testes aprimorados que podem reduzir significativamente o risco de contaminação bacteriana, a lesão de armazenamento de plaquetas está emergindo como o principal desafio para aumentar o prazo de validade dos concentrados de plaquetas. Destacam-se as novas tecnologias aplicadas ao controle de qualidade de CPs armazenados, incluindo soluções aditivas de plaquetas e inativação de patógenos (38)

A obtenção do hemocomponente, concentrados de plaquetas (CP) é influenciada pelos processos de preparação e armazenamento e pelo tempo de armazenamento das plaquetas. Além disso, o estresse oxidativo pode levar à liberação *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs), que induz o comprometimento dos receptores plaquetários correspondentes, incluindo *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), que mantêm reações inflamatórias plaquetárias e promovem as reações transfusionais (RTs). Estes dados tem sido atualmente avaliado pela formação das VEs, pelo método de citometria de fluxo (22,39)(40).

Mais recentemente tem se estudado a propagação de plaquetas na matriz de fibrinogênio como um confiável e sensível marcador da atividade funcional das plaquetas durante o armazenamento. Após a ativação das plaquetas, os sinais de dentro para fora induzidos sinergicamente por uma variedade de agonistas e moléculas de adesão podem aumentar a afinidade da integrina principal das plaquetas, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb/IIIa), com seus ligantes. (41)

A GPIIb/IIIa, uma integrina específica das plaquetas, é amplamente proeminente entre os receptores de adesão e é essencial para a agregação plaquetária. Os ligantes para GPIIb/IIIa são as proteínas adesivas multivalentes como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand. Em plaquetas em repouso, GPIIb/IIIa está normalmente em um estado de baixa ativação, incapaz de interagir com o fibrinogênio solúvel. A estimulação das plaquetas com vários agonistas induzirá uma mudança conformacional desta integrina (sinalização do interior da plaqueta, para fora), que é então capaz de se ligar ao fibrinogênio solúvel, resultando no início da agregação plaquetária.(42)

No entanto, a ligação do fibrinogênio ao seu receptor de membrana não é simplesmente um evento passivo que permite a formação de pontes intercelulares entre as plaquetas. De fato, uma via de sinalização complexa desencadeada pela ligação e agrupamento de integrinas (sinalização de fora para dentro) regulará a extensão da agregação plaquetária irreversível e retração do coágulo. Entre as enzimas de sinalização ativadas a jusante do envolvimento GPIIb/IIIa, a fosfatidilinositol-3 quinase desempenha um papel importante no controle da fase irreversível de agregação.(43)

A ligação da integrina com fibrinogênio induz sinais potentes que desenvolvem a função plaquetária, incluindo agregação, liberação e disseminação das mesmas, sendo esta última propriedade considerada como principal consequência inicial da sinalização de fora para dentro pela GPIIb/IIIa. A identificação de moléculas de fibrinogênio é considerado como um marcador de ativação plaquetária durante o armazenamento. Os concentrados de plaquetas de PRP foram submetidos à análise de citometria de fluxo e a os níveis de expressão de P-selectina, CD61, GPIIb e conformação ativa de GPIIb/IIIa (ligação de PAC-1) foram examinados no dia 0, 1, 3 e 5 pós-armazenamento. Simultaneamente adesão plaquetária e disseminação na matriz de fibrinogênio, concentração de glicose e a atividade da DHL também foi determinada nos mesmos intervalos. Os resultados mostraram diminuições significativas na propagação de plaquetas na matriz de fibrinogênio durante o armazenamento. A propagação foi o padrão dominante de adesão até o primeiro dia de armazenamento. Em plaquetas armazenadas em 3 dias, os aspectos filopodial ou a formação lamelipodial foi o evento dominante, enquanto as plaquetas armazenadas em 5 dias simplesmente aderiram ao fibrinogênio com menos formação de protrusão e não se espalhou parcialmente. Tomados em conjunto, introduzimos a propagação de plaquetas na matriz de fibrinogênio como um marcador confiável e sensível de plaquetas funcionais atividade durante o armazenamento. Como um marcador válido que é direta e obviamente relevante para as capacidades funcionais das plaquetas, a rápida redução da propagação de plaquetas durante o armazenamento ofusca outros marcadores de lesão de armazenamento de plaquetas enquanto aumenta questão séria sobre a qualidade das plaquetas armazenadas por 5 dias. (41)

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática solúvel que desempenha um papel fundamental na hemostasia, não sendo apenas um fator essencial para a formação do coágulo, mas também modula a atividade das plaquetas sanguíneas e das células endoteliais. Em suspensão, a ativação das plaquetas resulta em uma alteração da conformação da integrina $\alpha IIb\beta 3$ (GPIIb/IIIa) que suporta a ligação do fibrinogênio, permitindo a formação de ligações interplaquetas, ou seja, agregação plaquetária.(44) Quando imobilizado em uma superfície, o fibrinogênio suporta a fixação de plaquetas em repouso, que é limitada a condições de baixo fluxo

sanguíneo, pois o fibrinogênio não é reconhecido por permitir a adsorção do VWF plasmático. As propriedades adesivas do fibrinogênio em condições hemodinâmicas alteradas permanece completamente inexplorado.(45) Compreender o efeito de tais fluxos na adesão plaquetária ao fibrinogênio ajudará a entender melhor o mecanismo subjacente à trombose, uma vez que esse processo patológico está intimamente ligado a padrões de fluxo sanguíneo severamente perturbados. (41)(46)

Diante do exposto e do fato de que o laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro produziu um anticorpo monoclonal murino contra antígenos plaquetários humanos, o desafio do presente projeto é de caracterizar tal anticorpo e analisar o estado de ativação/agregação bem como as VEs formadas em CPs durante o armazenamento.

Antígenos Plaquetários

Apesar de ser fragmento citoplasmático, as plaquetas expressam um grande número de antígenos que didaticamente podem ser classificados como: antígenos ABO, MNSsP1, antígenos do sistema maior de histocompatibilidade – HLA Classe I e antígenos próprios plaquetários (HPA), hoje com mais de 37 membros na família, onde o alelo **a**, sempre representa o mais frequente e o **b**, o menos frequente. Estes 37 antígenos são sustentados sobre 6 glicoproteínas (GPs):

Quadro 1 – Glicoproteínas da membrana plaquetária e antígenos relacionados

Glicoproteína	Antígenos sustentados
GPIIb/IIIa	CD41, CD61 e receptor de fibrinogênio
GPIb-V-IX	CD42a-d, receptor de fator von Willebrand
GPIa/IIa	CD49,CD29, receptor de colágeno
CD109	atenua a sinalização do TGF- β
GPIIIb	CD36

A integrina alfa-IIb é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene ITGA2B. ITGA2B, também conhecido como CD41, codifica a cadeia 2b da integrina alfa. As integrinas são proteínas de membrana integrais heterodiméricas compostas

por uma cadeia alfa e uma cadeia beta. A cadeia alfa 2b sofre clivagem pós-tradução para produzir cadeias leves e pesadas ligadas por dissulfeto que se unem ao beta 3 para formar um receptor de fibrinogênio expresso em plaquetas que desempenha um papel crucial na coagulação. Mutações que interferem neste papel resultam em trombastenia. (47)

Também chamada de cadeia beta 3 da integrina (ITGB3), combina com CD41 (integrina alfa IIb) para formar a glicoproteína plaquetária IIb / IIIa, um receptor para fibrinogênio, fibronectina, plasminogênio, protrombina, trombospondina, vitronectina e fator de von Willebrand. Ao se combinar com CD51 para formar receptor para citotactina, fibronectina, laminina, metaloproteinase-2 , osteopontina, osteomodulina, protrombina, trombospondina, vitronectina e fator de von Willebrand. CD51-CD61 está presente no endotélio, células endoteliais, músculo liso, algumas células B, monócitos, macrófagos, plaquetas, osteoclastos, mastócitos, fibroblastos e células tumorais. A ativação plaquetária causa uma mudança na conformação em GPIIb / IIIa, permitindo a ligação do fibrinogênio solúvel e formando um tampão plaquetário.(48)

Devemos destacar que as plaquetas exercem sua função através da interação ligante-receptor envolvendo várias glicoproteínas de membrana. O número de epítomos expressos sobre a membrana também é variável (vide quadro 1).

Quadro 1 – Principais glicoproteínas da membrana plaquetária, respectivos ligantes e número de sítios antigênicos expressos.

Glicoproteína	Ligante	Número de Sítios Antigênicos de membrana de cada plaqueta
Gp Ia-IIa ($\alpha \beta 1$ ou VLA)	Colágeno	3.000-5.000
Gp Ib-IX	Fator de von Willebrand	60.000
Gp IIb-IIIa($\alpha \text{IIb} \beta \text{III}$)	Fibrinogênio Vitronectina Fibronectina Fator de von Willebrand	50.000-80.0000

Fonte: Adaptado de Carolina Bonet Bub/Tese de doutorado – Unicamp, 2017. (49)

2 - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Estabelecer novo método de controle de qualidade de plaquetas com finalidade transfusional.

2.2 - Objetivos Específicos:

- Caracterizar e validar anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos plaquetários humanos produzidos pelo Laboratório de Biologia Celular - Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - LBA/HCFMB.
- Estabelecer padrões de conformidade e não conformidade para a liberação de CP utilizando a tecnologia de monitoramento de VEs por Citometria de Fluxo;
- Propor depósito de patente para o anticorpo monoclonal caracterizado.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Após a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa em seres humanos, pela Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), em consonância e com a autorização da alta gestão do Hemocentro de Botucatu foram otimizadas as 10U de CPs mensalmente destinadas para controle de qualidade, com o devido Termo de Consentimento para participação em Pesquisa previamente assinado pelo Doador de Sangue. Este número corresponde a 1% da produção mensal conforme orientação legal (34).

Foi composta uma planilha Excel com dados da etiqueta código de barra do hemocomponente, número da bolsa (NB①), número da amostra (NA②), peso/volume③, data de coleta④, data de análise, tipagem ABO/RhD⑤, leucometria, plaquetometria, pH, teste de Swirling e resultado da microbiologia.

Os dados NB①, NA②, peso/volume③, datas④ e tipagem ABO/RhD ⑤ foram obtidas do rótulo informatizado da bolsa em análise, como pode ser observado na figura 2. Após isto, foram realizadas as alíquotas das amostras para as análises e criopreservadas a -80°C .

Figura 2 – Identificação das informações obtidas do Rótulo do Hemocomponente (concentrado de plaquetas)



Fonte: arquivo pessoal, 2018

Imediatamente após a retirada do CP do agitador, foi realizado o teste de *Swirling*. Para a realização do teste, ao pegar os CP, um a um, do agitador em funcionamento procedeu-se a colocação do mesmo para o alto e contra a luz. Observou-se a presença de uma onda ou “esfumaçamento” conhecido cientificamente como *Swirling*. Para as unidades com a identificação desta onda ou esfumaçamento, considere o teste positivo, para aquelas em que isto não for observado, considere negativo. O teste negativo significa que as plaquetas não estão mais funcionais. Vários parâmetros foram relatados como correlacionados à recuperação ou sobrevivência, como morfologia e turbilhonamento, p-selectina, e lactato. (50)(51)

Logo após a realização do teste de *Swirling*, as unidades são levadas em ambiente de cabine de Segurança Biológica do tipo Classe IIa TROx do Brasil® para a realização das alíquotas e da coleta dos testes microbiológicos.

A leucometria e a plaquetometria foram realizadas por método semiautomatizado utilizando equipamento ABX PENTRA 60 Horiba™. Os dados serão lançados na mesma planilha.

A determinação do pH dos Concentrados de Plaquetas será realizada pelo método rápido em fita papel indicador Merck™.

As análises microbiológicas foram realizadas por inoculação de cinco mL de CPs em frascos do tipo Bactec FX BD™. Este material é encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências, onde a rotina desta etapa de controle de qualidade sempre fora realizada.

3.1 Caracterização do anticorpo monoclonal PAT1-10A5

Este anticorpo monoclonal foi produzido e analisado no Laboratório de Engenharia Celular (LEC) no período de 2002 a 2006, sendo que nos dois últimos anos foi objetivo de dissertação de mestrado de Nádia Ciocca Azevedo.(52)

3.1.1 Caracterização do Imunógeno utilizado para a produção do Anticorpo monoclonal

Foram utilizadas plaquetas frescas, na forma de concentrado de plaquetas, na concentração de 375.000 plaquetas/mm³, lavadas 2 X em tampão PBS e diluídas em solução fisiológica estéril. As características imunológicas/fenotípicas do doador era: sexo feminino, grupo sanguíneo ABO: A fator RhD positivo, MN, P1 positivo. Foi escolhido esta doadora, por ter a fenotipagem extensa eritrocitária e HLA completa, uma vez que se tratava de doadora de medula óssea, ser do corpo de funcionários da UNESO (facilitando a rápida convocação), concordou em participar da pesquisa e teve a genotipagem HPA realizada. O resultado está representado no quadro abaixo. A genotipagem HPA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, sob a coordenação das Profas. Maria Inês de Moura Campos Pardini e Rejane A.T. Grotto. (53)

Quadro 2 – Genotipagem plaquetária das plaquetas usadas como imunógeno

Genótipo	HPA 1 ^a	HPA 1b	HPA 2a	HPA 2b	HPA 3 ^a	HPA 3b	HPA 4a	HPA 4b	HPA 5a	HPA 5b
Plat.ED	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG

Fonte: Dados obtidos dos arquivos do LEC, 2002.

Naquele período, o LEC não conseguiu definir o perfil do anticorpo monoclonal obtido. O clone encontrava-se criopreservado no banco de células do LEC em container de nitrogênio líquido a -196^o C. Da etapa anterior de estudo tinha-se as seguintes informações: 1) o anticorpo funciona bem em citometria de fluxo; é identificado de forma heterogênea em plaquetas, mas não foi detectado em hemácias ou leucócitos; não se trata de especificidade anti-HLA Classe I (afastado por ter sido analisado por citometria de fluxo com Kit FlowPRA Classe I/II tendo sido negativo por 3 vezes consecutivas em 3 diferentes painéis; não se trata de anticorpos anti-HPA dirigido contra antígenos expressos pela doadora do imunógeno. Estas análises foram inicialmente feitas no Laboratório de Citometria de Fluxo, usando um painel de plaquetas genotipadas para se identificar eventualmente o reconhecimento de antígeno HPA. Todos os testes foram negativos. Amostras foram encaminhadas ao Hemocentro da Unicamp, em parceria com Prof. Vagner Castro,

para a identificação do perfil do anticorpo em técnicas como o *Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen (MAIPA test)*, com kit *Standardized Platelet-Antibody Screening and Identification*. Esta técnica é uma técnica qualitativa para detecção e / ou identificação de anticorpos plaquetários. É considerado o método padrão ouro no campo da imunologia plaquetária. Todos os testes realizados por este método, na época, identificavam uma reação de positividade, sem a confirmação de especificidade. (52)

Diante de tantas técnicas com resultado negativo, no período de 2002 a 2006, o clone foi congelado e o protocolo permaneceu em *stand by*.

Tendo em vista o surgimento da análise proteômica, agora como requisito obrigatório para a caracterização de anticorpos monoclonais murinos, optou-se por reiniciar os estudos com o referido clone.(54)

3.2 Identificação do Clone, descongelamento e expansão pelo método de ascite

Foram identificadas 8 ampolas do clone PAT1-10 A5, criopreservadas. Foi escolhido a ampola congelada em 22/março/2002 para descongelamento e expansão em cultura. A ampola foi retirada do nitrogênio líquido e colocada rapidamente em banho-maria a 36°C até o “descolamento” do bloco congelado da parede da ampola. O bloco de gelo foi rapidamente transferido para tubo cônico estéril de 15mL contendo tampão HEPES a 37°C, e o conjunto centrifugado a 900g durante 10 minutos, a 4°C. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por aspiração em bomba de vácuo e o *pellet* ressuspenso em meio de cultura RPMI (Gibco™) aditivado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) da marca Sigma Aldrich (Hybridoma™) na presença de aditivos descritos no Procedimento Operacional Padrão do LEC.(55)

O clone PAT1-10 A5 foi expandido em frascos T de cultura, de 25cm² até a obtenção de confluência de 70%, as células foram mantidas por 48 horas sem troca de meio de cultura, para posteriormente se coletar o sobrenadante de cultura (SNC) para testes de especificidade contra as plaquetas ED (as mesmas usadas no protocolo de imunização dos animais e nos primeiros ensaios).

Tendo sido comprovada a reatividade do anticorpo com as plaquetas específicas, pelo método de citometria de fluxo, as células foram expandidas até se obter 10^7 células. Em paralelo, cinco camundongos Balb C, isogênicos, do Biotério Central, tiveram o preparo do peritônio com a injeção de um mL de pristane(Sigma Aldrich™). Este óleo mineral tem efeito irritante do peritônio do animal, preparando-o para o recebimento das células do clone. Quinze dias depois da injeção do óleo foram injetadas as células do clone PAT1-10 A5, com a finalidade de se obter uma concentração de anticorpos até 100 vezes maior do que no método de batch de cultura, conforme literatura especializada.(56) Transcorrido outros quinze dias da injeção e sob monitoramento clínico diário, a punção para a retirada do líquido ascítico foi procedida.(48)(57)

3.3 Purificação do Anticorpo por Cromatografia de Afinidade

Sabendo-se de que o anticorpo PAT1- 10 A5 havia tido sua classe e Sub-classe determinada no período anterior, por Citometria de Fluxo, como sendo uma IgG1 κ , foram adquiridas as colunas de afinidade HiTrap™ de proteínas G HP, pré-embaladas com 1 ou 5 ml de Proteína G Sepharose™ *High Performance* para a purificação e isolamento de IgG monoclonal do líquido ascético utilizando equipamento Aktä-Prime-GE™.(58)

3.4 Determinação da Concentração Protéica

A determinação da concentração de anticorpo purificado foi realizada pelo método espectrofotométrico utilizando equipamento NanoDrop™.

3.5. Preparo do Extrato Membranário de Plaquetas Humanas

Para o preparo dos extratos membranários de plaquetas humanas, foram utilizadas amostras de plaquetas de quatro doadores do grupo sanguíneo O, RhD positivo e a quinta amostra foi a mesma usada como imunógeno (A fator RhD positivo). O tampão utilizado foi composto por 5mM de fosfato de sódio, 1mM de

ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,2mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). A suspensão do concentrado de plaquetas foi lavada e tampão adicionado, na proporção de 100µL de CP a cada 1 mL de tampão de lise, foi ultracentrifugada por 5 vezes a 4°C durante 30 minutos cada, a uma velocidade de 33.000g em rotor tipo *Swing Out* utilizando equipamento Sorval™. O material obtido foi congelado a -80°C, para uso posterior. (55)

3.6 Eletroforese de proteínas SDS-PAGE e Imunoeleto transferência Elétrica/ *Western Blotting*

A amostra do anticorpo purificado foi submetida à técnica de Western blotting, ou seja, uma imunoeleto transferência para membrana de PVDF cujo antígeno corresponderá ao lisado plaquetário de *pool* de 4 amostras de concentrados de plaquetas de doadores do grupo “O” Fator RhD positivo e uma amostra do grupo A fator RhD positivo. Após a lise das plaquetas por congelamento e descongelamento, as amostras proteicas serão fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) contendo SDS (SDS-PAGE), utilizando tampão de corrida (50mM Tris; 0,38M Glicina; 1,8mM EDTA; 0,1%SDS) a 120V. Em seguida, as proteínas serão transferidas para membrana de nitrocelulose sob diferença de potencial de 12 V por uma hora, utilizando tampão de transferência (24,8mM Tris; 192mM Glicina; 10%Metanol). A membrana será bloqueada a temperatura ambiente por 40 minutos em tampão TBS-T (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl e 0,02%Tween-20), contendo 5% leite desnatado. Em seguida, a membrana será incubada a temperatura ambiente por 4 horas com diluições adequadas de anticorpos policlonais diluídos em TBS-T contendo 5% leite desnatado. Após esse período, a membrana será lavada quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e incubada a temperatura ambiente por uma hora com anticorpos policlonais anti-IgG conjugados à peroxidase diluídos em TBS-T contendo 5% leite desnatado. Após quatro novas lavagens de 5 minutos com TBS-T, a membrana será tratada com reagentes quimioluminescentes e utilizada na exposição de filmes de raios-x por períodos variáveis de tempo. Os filmes serão revelados de forma convencional. As intensidades das bandas das auto-radiografias serão quantificadas por densitometria óptica, utilizando o programa *ScionImage*. Os

resultados comparados para a identificação de reconhecimento de mesma banda proteica.

A extração de proteínas foi obtida usando tampão de lise [50mM Tris [tris(hidroximetil) aminometano]–HCl [pH 7,4], Tween-20 a 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, ácido etilenoglicol tetraacético 1 mM (EGTA), O-Vanadato 1mM, NaF 1 mM, e inibidor de protease [aprotinina 1 mg/mL, leupeptina 10 mg/mL, e 1 mM 4-(2-amino-etil)-benzolsulfonil-fluoreto-cloridrato] (59).

A concentração de proteínas foi determinada usando o método de Lowry (60) depois de clarificar por centrifugação e permanecerem por 2h no gelo.(61) A concentração das amostras foram normalizadas adicionando um determinado volume de tampão de amostra de 2-Dodecil Sulfato de Sódio (SDS 2%), 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 5% de β -Mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol, e 10% de glicerol, foi adicionado às amostras e fervidas por 5 minutos a 95°C.

Alíquotas das amostras (75-100 μ g/poço) foram aplicadas no gel SDS-PAGE (10%) para realizar a corrida de Eletroforese e então corar o gel com *Comassie Blue* (para identificar o fracionamento das proteínas baseado no peso molecular e fazer análise proteômica) ou então transferir as proteínas para membranas de PVDF (Millipore, USA), para realizar o Western Blotting, tais membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio 5% (leite desnatado dissolvido em Tampão Salina Tris [TBS] com Tween-20 [0,05%]) e encubada overnight com anticorpo primário a diluição de 1:1000 a 4°C. Depois de lavadas três vezes em TBS-Tween-20 (0,05%), as membranas foram encubadas com seu respectivo anticorpo secundário, diluição 1:2000 (em ensaios de *immunoblotting*), diluídos em tampão bloqueio, durante 1h. As proteínas imunorreativas foram detectadas por quimiluminescência (ECL).(62)

3.7 Proteômica - Análise de Proteínas por LC-MS/MS

Análise das bandas de proteínas por LC-MS/MS foi realizada para determinar o conjunto de proteínas envolvidas nas diferentes forças de tensão propostas nesse estudo. As proteínas foram extraídas dos géis utilizando uma lâmina de bisturi cortando em segmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidas para tubos de

2,0 mL contendo 200 µL de ácido acético a 5% (v/v) e armazenados a -4°C até o passo seguinte. Posteriormente, os segmentos de gel foram lavados no mínimo por três vezes, em uma solução contendo acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e bicarbonato de amônio (AmBic) 25mM por 30 min. Depois, eles foram desidratados duas vezes em ACN 100% por 10 min. Ao final da segunda desidratação, a ACN foi removida e o resíduo remanescente deixado evaporar em temperatura ambiente. Depois de desidratados, os spots foram submetidos à redução com DTT 20 mM em AmBic 50 mM incubados por 40 min a 56°C. O excesso de líquido foi removido e substituído por IAA (Iodoacetamida) 55 mM em AmBic 50 mM. Após 30 min no escuro, em temperatura ambiente, o líquido foi removido, os fragmentos foram lavados em AmBic 25 mM e em seguida desidratados em ACN 100%. A ACN foi descartada e o resíduo remanescente no gel foi deixado evaporar em temperatura ambiente. Para a digestão das proteínas, os fragmentos de gel foram reidratados em 15 µL de solução contendo 150 ng de tripsina (Trypsin Gold Mass Spectrometry, Promega, Madison, WI, EUA) em AmBic 25 mM por 15 min para que a tripsina pudesse penetrar no gel. Em seguida, adicionaram-se 50 µL de AmBic 25 mM para total cobertura dos spots e incubou-se a 37°C por 14h. Ao fim de 14h, a ação da tripsina foi interrompida pela adição de 15 µL de solução bloqueadora (ACN 50% v/v e ácido fórmico 5% v/v). Os peptídeos foram eluídos da acrilamida com duas lavagens de 15 min com solução de eluição A (ACN 50% v/v e ácido fórmico 1% v/v), uma lavagem de 15 min com solução de eluição B (metanol 60% v/v e ácido fórmico 1% v/v) e mais duas lavagens com ACN 100%, a 45°C sob sonicação em banho (Ultracleaner® 1600^a, Unique, Brasil) com 40Khz de frequência fixa e potência de 30 W. A solução contendo os peptídeos extraídos foi submetida a secagem em concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em temperatura ambiente, por 2-3h e armazenada a -20°C até a realização do sequenciamento como descrito por Shevchenko et al. (63). A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters™, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters™, Milliford, USA), etapa feita em colaboração.(64)

As proteínas foram identificadas por sua homologia com proteínas no banco de dados UniProt (*Universal Protein Resource*); a espécie utilizada foi a série "Homo sapiens" (UniProt, 2017) (Universal Protein Resource [UniProt]).

3.8 Análise do anticorpo identificado como Anti-Fibrinogênio humano, molécula total pelo método de citometria de fluxo

Após a análise dos resultados por Western blotting e a análise proteômica confirmando a especificidade do anticorpo como anti-fibrinogênio humano, molécula total, foram realizadas as análises por citometria de fluxo. Destaca-se de que para as técnicas de *Western Blotting* e Proteômica foram necessárias parcerias com dois diferentes serviços:

A citometria de fluxo é um procedimento claro, exato, rápido e visível, onde a superfície da célula é analisada em um citômetro capaz de detectar fluorescência de células individuais. A fluorescência ocorre devido à presença de sondas (anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo) que se ligam aos antígenos presentes na superfície celular ou em outros anticorpos (22).

Foram utilizados anticorpos monoclonais de especificidade anti-plaquetária, marcados com fluorocromo: anti-CD41-PE; ANTI-CD61-FITC e anti-CD62P – APC. de amostra na mesma concentração + 1µL de controle isotópico comercial, seguido de incubação de 15 a 20 minutos no escuro, ajuste com 400 µL de Isoton, homogeneização em vórtex e leitura. No tubo teste serão adicionados os mesmos volume e concentração mencionados e colocado o anticorpo comercial anti-CD61-FITC. Todos os testes serão realizados em duplicata com anticorpo monoclonal *home made* PAT 2 -15A2 marcado com FITC e o procedimento será idêntico.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas preliminarmente análises descritivas. Após o término dos ensaios por citometria de fluxo foi procedido o teste de regressão linear.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

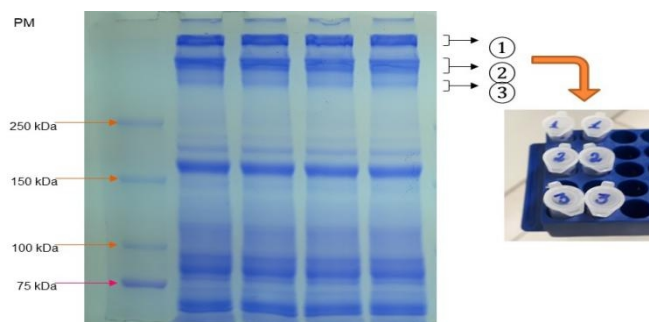
Na etapa de obtenção dos anticorpos monoclonais murinos (AcMm), após a fusão celular foram construídos 3.125 híbridos. O *screening* dos sobrenadantes de cultura destes híbridos foram feitos por Citometria de Fluxo usando as mesmas plaquetas usadas no protocolo de imunização, pelo método de Coombs Indireto Plaquetário usando como anticorpo secundários um *reagente goat anti-mouse Ig-FITC BD™*. Foram identificadas 3 células cujos SNC reagiram com as plaquetas teste com uma média de intensidade de fluorescência de 27%. Este perfil de reatividade se manteve nos testes realizados após o descongelamento das ampolas. Dos 3 híbridos retidos, dois evoluíram sem problemas e um deles perdeu a especificidade.

Dos dois híbridos, após a clonagem celular pela técnica de diluição limitante foram selecionados 2 clones. Um destes clones, o PAT2-15 A2 foi o selecionado para os testes de caracterização.

O clone descongelado foi amplificado e produziu-se líquido ascítico, que após a purificação por cromatografia de afinidade gerou anticorpo puro (IgG1 κ) na concentração de 1,25mg/mL. O material foi aliquoteado em microtubos e preservado a -80°C até o momento do uso.

Os procedimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida e *Western Blotting* foram realizados no Laboratório do Prof. William Zambuzzi. Para a corrida eletroforética foram usadas as proteínas extraídas da membrana plaquetária de 5 diferentes doadores. A figura abaixo registra o resultado. Da eletroforese 1D, em Gel de Poliacrilamida a 6% coradas com Azul de Coomassie.

Figura 3 Eletroforese 1 D, SDS-PAGE, de extrato de membrana plaquetária humana com separação das respectivas bandas reconhecidas pela técnica *Western blotting*



Fonte: Arquivo pessoal, 2020. Legenda: PM = marcadores de peso molecular; ① ② ③ bandas proteicas recortadas para posterior análise proteômica.

Como pode ser observado, o preparo do extrato membranário de plaqueta humana teve excelente qualidade, cujo gel de poliacrilamida, tanto a 10% como a 6% conseguiu promover a individualização das bandas mais expressivas.

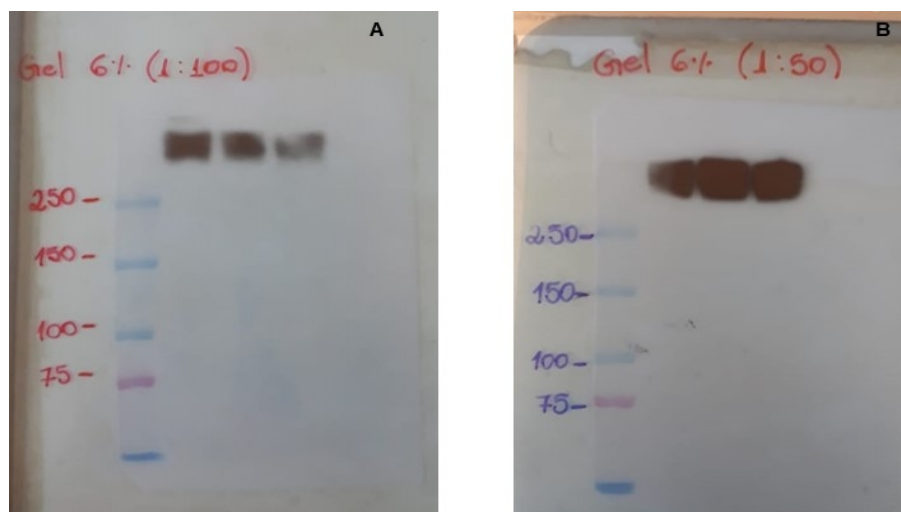
Foram realizados vários procedimentos de *Western blotting* (n=3) com 5 extrato membranários preparados. Apesar dos primeiros ensaios não terem tido uma boa resolução (vide exemplo na figura 4), observou-se que o gel de poliacrilamida a 10% não era adequado para a análise, pois o anticorpo produzido *home made* reconhecia em qualquer extrato membranário, independentemente do grupo ABO, proteína de alto peso molecular, que não havia corrido adequadamente (retângulo branco). Naquele momento da análise supôs-se que a banda de interesse estivesse no retângulo vermelho. No entanto, chamava a atenção o fato de se tratar de um anticorpo monoclonal purificado, cuja representatividade na técnica de *blotting* deveria ser mais expressiva. Frente a estes resultados e dúvidas levantadas foram realizadas novas eletroforeses SDS-PAGE com 6% de poliacrilamida com intuito de promover a migração das bandas que se encontravam na região correspondente ao retângulo branco.

Figura 4 – Técnica de *Western blotting* em SDS-PAGE a 10%



Fonte: Arquivo pessoal, 2020. Legenda, em azul, marcadores de peso molecular (kaleidoscope™).

Figura 5 - Técnica de *Western blotting* em SDS-PAGE a 6% e anticorpo primário em duas diferentes concentrações



Fonte: Arquivo pessoal, 2020. Em A e B , Blotting com SDS-PAGE a 6% de poliacrilamida. Em A, anticorpo primário diluído 1:100 e em B a diluição foi de 1:50.

Nestas imagens pode-se identificar o reconhecimento de proteína de alto peso molecular, podendo corresponder ao Fator Von Willebrand ou ao Fibrinogênio. Foram descartadas outras especificidades cujas proteínas eram de menor peso molecular (CD31, CD36, CD41, CD61, CD62-P).. Diante do impasse existente foram realizados ensaios de pesquisa de inibidor da coagulação pelo método clássico descrito como teste da mistura.. Sabe-se que o teste denominado Tem.po de Protrombina ou TP é pouco sensível a pequenas variações de fibrinogênio. Entretanto, na hipofibrinogenemia grave (abaixo de 100 mg/dl de fibrinogênio) e na afibrinogenemia (ausência de fibrinogênio), o TP encontra-se alargado e incoagulável, respectivamente. . O teste da mistura (com *pool* de plasma normal na proporção 1:2) deve ser realizado para identificar se o prolongamento ocorre por deficiência de fator ou presença de inibidor. Se houver correção do TP, deve-se levantar a hipótese de deficiência de fator VII , V, II ou X sequencialmente. Não havendo correção do TP no teste da mistura, comprovou-se a presença de um inibidor da coagulação, que

deverá ser identificado. Foram selecionados 10 doadores de sangue sem história de discrasia sanguínea e realizado o tempo de atividade da protrombina em todos eles. O valor médio foi de 10.9% com mínimo de 9% e máximo de 15%. Este resultado é considerado dentro da faixa de normalidade. Após a realização de um pool de plasma destes indivíduos, foi realizada o teste da mistura, sendo que nos 10 ensaios realizados com o anticorpo *home made* nas concentrações que variaram de 1 a 50%, todos foram igualmente incoaguláveis. Ainda assim, as dúvidas permaneciam: inibidor do fibrinogênio ou do Fator Von Willebrand. Ensaios suplementares evidenciaram que a inibição ocorria por completa neutralização da molécula do fibrinogênio.

Apesar das dificuldades imposta por uma pandemia que determinaram dificuldades de aquisição/importação de materiais e dificuldade na manutenção das parcerias externas realizadas para esta pesquisa, em março de 2021 foi possível processar as análises de proteômica no Laboratório da Faculdade de Odontologia da USP de Bauru (equipamentos multiusuários da FAPESP), sob a responsabilidade da Profa. Marília Afonso Rabelo Buzalaf.

A análise dos peptídeos tripticos foi realizada no sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo Q-TOF G2 (Waters, Milliford, USA). As proteínas foram identificadas por sua homologia com proteínas no banco de dados UniProt (Universal Protein Resource); a espécie utilizada foi a série "Homo sapiens" (UniProt, 2017).

O *Software* do equipamento gerou 3 tabelas mantidas originalmente em inglês (Table 1, 2 e 3). Foram analisadas as 3 bandas de maior peso molecular (aproximadamente 340.000 daltons, pelo *Western blotting*). Nas 3 tabelas pode ser observado que a primeira identificação é da molécula de fibrinogênio, cadeia γ , principal cadeia reconhecida pelo receptor da plaqueta. O score é o mais elevado

Table 1. Proteins identified using mass spectrometry with electrospray ionization in *homo sapiens* platelet samples.

Gel <i>Band</i> 1	Proteins	Entry	Score	pI/MM theoretical (kDa)	Molecular function
Band 1	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	10795.97	5.80/49.15	Together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen beta (FGB), polymerizes to form an insoluble fibrin matrix. The gamma-chain carries the main binding site for the platelet receptor.
	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	6689.31	7.95/ 50.76	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix.
	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	3261.569	5.79/ 91.35	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen beta (FGB) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix.
	Thrombospondin-1	TSP1_HUMAN	1857.976	4.71/129.01	Adhesive glycoprotein that mediates cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. Binds heparin.
	Myosin-9	MYH9_HUMAN	1197.598	5.52/ 222.79	Cellular myosin appears to play a role in cytokinesis and cell shape. During cell spreading, plays an important role in cytoskeleton reorganization.

Band 1 = *band* of platelets from *Homo sapiens*; pI= Isoelectric point; MM = molecular mass.

Table 2. Proteins identified using mass spectrometry with electrospray ionization in *homo sapiens* platelet samples.

Gel band 2	Proteins	Entry	Score	pI/MM theoretical (kDa)	Molecular function
Band 2	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	11570.61	5.80/49.15	Together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen beta (FGB), polymerizes to form an insoluble fibrin matrix. The gamma-chain carries the main binding site for the platelet receptor.
	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	8458.75	7.95/ 50.76	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix.
	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	3331.706	5.79/ 91.35	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen beta (FGB) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix.
	Myosin-9	MYH9_HUMAN	2795.177	5.52/ 222.79	Cellular myosin appears to play a role in cytokinesis and cell shape. During cell spreading, plays an important role in cytoskeleton reorganization.

Band 2 = *band* of platelets from *Homo sapiens*; pI= Isoelectric point; MM = molecular mass.

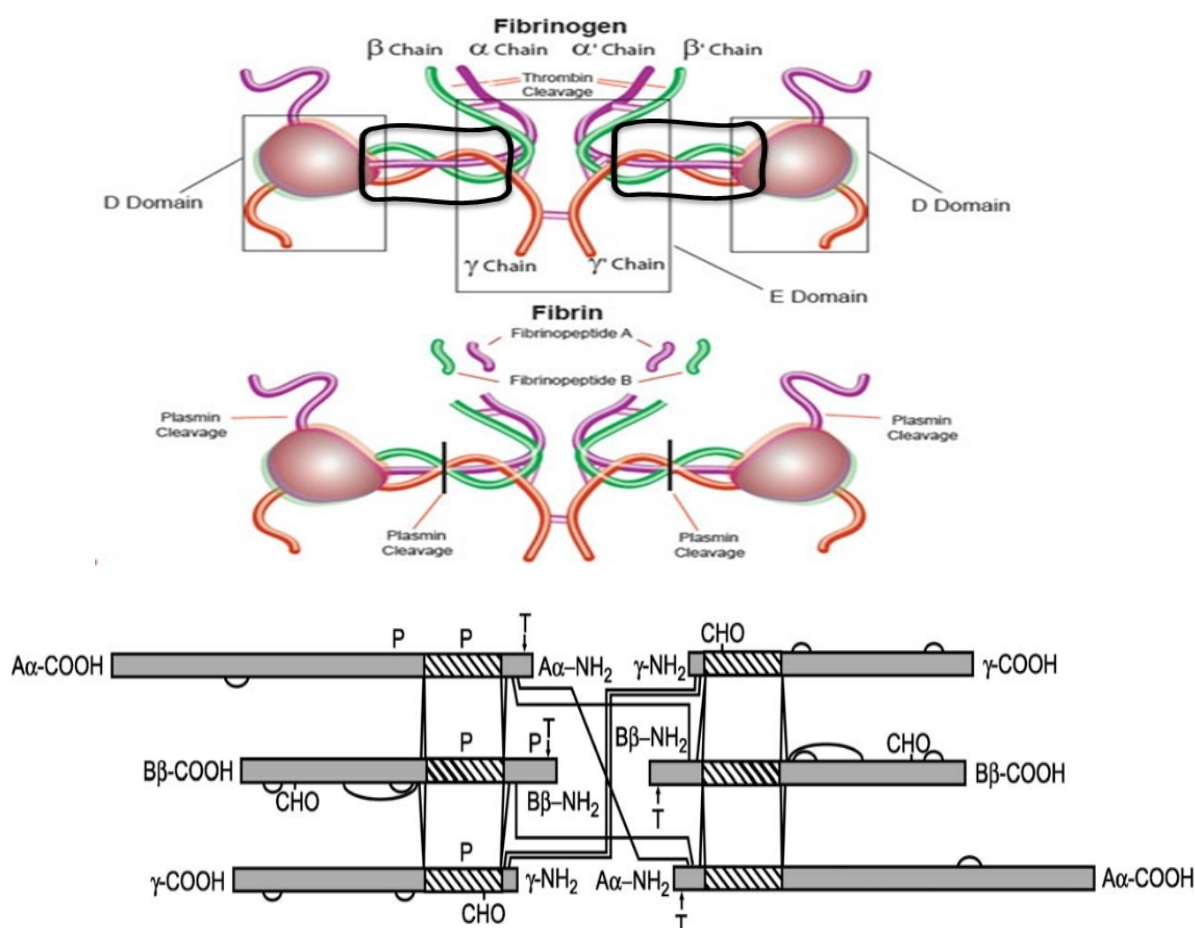
Table 3. Proteins identified using mass spectrometry with electrospray ionization in *homo sapiens* platelet samples.

Gel <i>band</i> 3	Proteins	Entry	Score	pl/MM theoretical (kDa)	Molecular function
Band 3	Fibrinogen gamma chain	FIBG_HUMAN	6055.729	5.80/49.15	Together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen beta (FGB), polymerizes to form an insoluble fibrin matrix. The gamma-chain carries the main binding site for the platelet receptor.
	Fibrinogen beta chain	FIBB_HUMAN	3344.187	7.95/ 50.76	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen alpha (FGA) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix.
	Fibrinogen alpha chain	FIBA_HUMAN	1585.546	5.79/ 91.35	Cleaved by the protease thrombin to yield monomers which, together with fibrinogen beta (FGB) and fibrinogen gamma (FGG), polymerize to form an insoluble fibrin matrix.
	Albumin	ALBU_HUMAN	1297.271	5.92/69.08	Its main function is the regulation of the colloidal osmotic pressure of blood.

Band 3 = *band* of platelets from *Homo sapiens*; pl= Isoelectric point; MM = molecular mass.

O fibrinogênio consiste em dois pares de três cadeias polipeptídicas, heterotrímeros ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) com três tipos diferentes, mas evolutivamente relacionados, de subunidades. Trata-se de uma proteína solúvel do plasma sanguíneo, consistindo em dois complexos de subunidades α , β e γ ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$). O anticorpo PAT2- 15 A2 reconhece as cadeias gama desta proteína, com a hipótese de que este reconhecimento se dê na região destacada pelo retângulo preto na figura abaixo. Esta hipótese é sustentada pelo alto escore obtido na análise proteômica das cadeias α e β também.

Figura 6 – Representação esquemática das cadeias do Fibrinogênio humano



Fonte: extraído de <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/fibrinogen-and-fibrin.html>. Legenda: retângulos em preto correspondem a provável área de reconhecimento do anticorpo.

Tendo confirmada a especificidade do anticorpo produzido como anti-fibrinogênio total, foram realizadas as análises por Citometria de Fluxo com o painel de anticorpos monoclonais marcados por diferentes fluorocromos (tabela 4).

Tabela 4 - Média simples dos valores da Média de Intensidade de Fluorescência para PAT2-10 A5(*home made*), CD61-FITC e co-expressão com CD62P(APC) e CD41(PE)

	Controles		PAT1-10A5	CD61-FITC	PAT1 -/CD62P(APC)-	PAT1+/CD62P-	PAT1-/CD62P+	PAT1+/CD62P+	PAT1 -/CD41P-	PAT1+/CD41PE-	PAT1-/CD41PE+	PAT1+/CD41PE+
	Auto	2ário	Valores médios da Média de Intensidade de Fluorencência em %									
Fresca	0	98,85	17,91	97,16	56,44	3,69	258,43	14,45	5,09	1,29	77,08	7,60
D1	0	1,57	24,88	95,53	28,25	1,85	58,67	11,33	19,79	0,67	68,82	10,72
D2	0,02	1,61	15,81	94,69	47,05	2,39	45,62	4,93	47,05	0,97	73,02	6,40
D3	0	1,25	10,35	96,08	28,92	1,17	66,79	3,12	30,72	1,22	62,30	5,76
D4	0,01	1,25	22,98	92,89	45,63	4,65	39,42	15,28	24,96	1,91	62,35	10,78
D5	0	0,97	30,20	93,11	53,59	5,76	23,45	17,21	3,55	1,44	67,08	27,93

Fonte: Arquivo pessoal. Legenda: Plaqueta fresca (foram usadas 3 amostras de doadores diferentes); Plaquetas conservadas no primeiro (D1), segundo(D2),terceiro (D3), quarto (D4) e quinto dia de conservação (D5). Foram analisadas 3 diferentes amostras analisadas nos cinco dias de armazenamento.

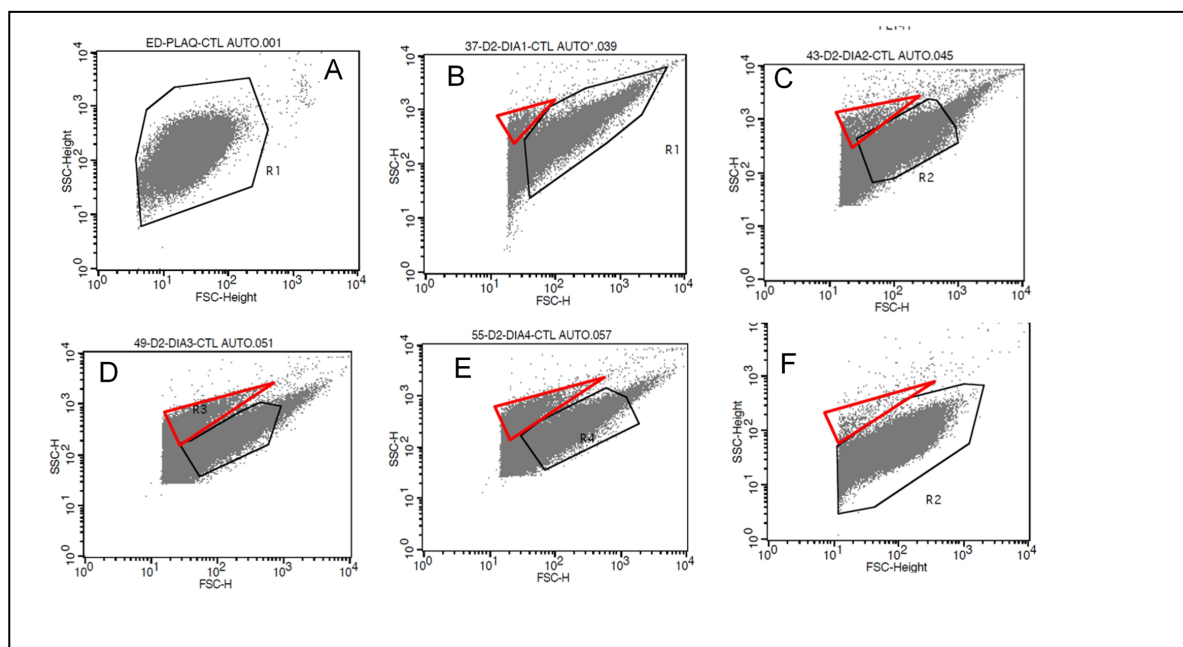
Esta tabela reúne os valores médios da média de intensidade de fluorescência para cada um dos marcadores. Como pode ser observado os valores do controle auto e do secundário estão dentro do esperado. Foram analisadas 3 amostras de Concentrado de Plaquetas, frescas, ou seja, analisadas logo após o seu preparo, sem conservação. O anticorpo PAT1- 10 A 5, teve um reconhecimento de 17,95% das plaquetas analisadas em cada amostra. Sabe-se que a coleta da amostra por si só é um mecanismo de ativação plaquetária. Para salvaguardar a qualidade dos testes em hemostasia há que se controlar as variáveis pré-analíticas que se referem a todos os fatores que afetam a qualidade da amostra antes do início do teste. A observação das variáveis pré-analíticas nos testes de coagulação é extremamente importante para que se obtenha confiabilidade e qualidade em todos os resultados dos testes de hemostasia.(66)

Ao se analisar os gráficos de dispersão dos testes realizados, outras informações podem ser obtidas. Na figura sete estão registrados os *plots* de A -F da citometria de fluxo, no momento de se fazer o autocontrole, ou seja, analisar, sem a presença de nenhum anticorpo a autofluorescência natural da célula em análise. Em A observa-se a dispersão de plaquetas colhidas pouco antes da análise (plaquetas frescas). Esta amostra corresponde às plaquetas usadas como imunógeno para se obter o anticorpo monoclonal murino. Embora possa ser um processo complexo e envolver vários *gates* ou regiões de interesse, o processo de *gating* é simplesmente selecionar uma área no gráfico de dispersão gerado durante o experimento de citometria de fluxo (leitura) que decide quais células você continua a analisar e quais células não. A maioria dos instrumentos mede a luz espalhada pelas células em ângulos retos com o feixe de laser no espalhamento lateral, *side scatter* (SS) e a luz espalhada na direção para frente ou espalhamento para frente, *forward scatter* (FS). A literatura aponta cinco estratégias para a interpretação do *gating*: 1) Controle de estabilidade de fluxo - para capturar eventos depois que o fluxo se estabilizou, eliminando efeitos de entupimento, contrapressão e outros problemas do instrumento; análise da geometria do *gating* eliminando artefatos; FS e SS para remover detritos e outros eventos sem interesse enquanto preserva as células com

base no tamanho e / ou complexidade, que foi usado neste trabalho;estalecimento de subconjuntos de células para análise e *backgating* que é uma estratégia que permite analisar células no final do *gating*. (67)

Nos plots B a F, correspondendo aos CP analisados em dias sequenciais de seu armazenamento, se observa uma distribuição das células diferentes daquela observadas com a amostra fresca (A), cuja distribuição é mais ovalada, e o tamanho e a granulosidade das células mais homogêneo. De B-F foram observadas uma segunda população de célula diferenciada pelo triângulo vermelho, que em primeira instância poderia se tratar de *debris*, mas dados recentes da literatura apontam para a identificação de plaquetas com forma alterada, alongada, podendo estar ativas e emitindo pseudópodes. Este aspecto em “rabo de cometa” foi identificado em todas as análises de CP conservados, sendo que as maiores concentrações de células neste segundo *gating* (triângulo vermelho) são mais significativas no terceiro e quarto dia de conservação.

Figura 7 Comparação do *gating* de plaquetas frescas, conservadas em D1, D2, D3, D4 e D5 pelo método de Citometria de Fluxo

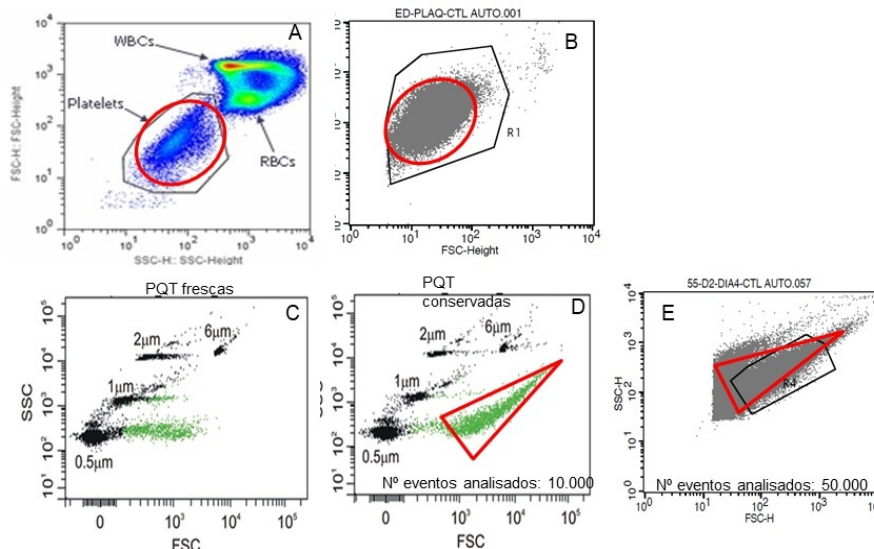


Fonte: Arquivo pessoal 2021. Legenda: A = determinação da autofluorescência sobre plaquetas ED, usadas como imunógenos, colhidas no momento da análise (sem preservação), correspondendo ao *gating* do autocontrole. As figuras identificadas de B a F correspondem a cada dia de conservação: D1, D2, D3, D4 e D5. A

delimitação em preto corresponde ao *gating* das plaquetas e o triângulo vermelho, a subpopulação a ser considerada.

Corroborando os achados de Dusan Vusetic, publicados em 2018, os autores delimitam o *gating* das plaquetas frescas, que se assemelha ou mesmo podemos dizer que é superponível a aquele que tivemos em nosso trabalho. (68) Os autores ainda, estudaram a mudança de tamanho das plaquetas, comparando com *beads* de tamanho previamente conhecido indo de meio micrometro a 6 micrometros e relacionaram o aumento do tamanho da plaqueta com a ativação e agregação plaquetária. Na figura 8, os *plots* A, C e D são do artigo citado. B e E são *gatings* do presente trabalho. Pode ser facilmente observado a semelhança do gráfico de dispersão do trabalho (A), circulado em vermelho e do presente estudo em B. No *plot* C, foi realizado pelo autor análise das plaquetas em repouso e após estímulo de ativação e uso de *beads* de tamanho conhecido. Em D, análise após uso de agonista, onde percebe-se uma nítida mudança do tamanho e da granulosidade das plaquetas (triangulo vermelho). Em E, gráfico de dispersão das plaquetas do presente estudo, analisadas no quarto dia de conservação. A distribuição é muito semelhante àquela obtida pelos autores, apontando para que em D4, as plaquetas já se encontrem ativadas e se transfundidas não determinarão o efeito terapêutico desejado.

Figura 8 - Comparação do *gating* de plaquetas frescas e mudança do tamanho das plaquetas conforme o dia de conservação



Fonte: Arquivo pessoal 2021. Legenda: A = determinação do *gating* de plaquetas frescas (círculo vermelho; em B *gating* das plaquetas frescas no presente trabalho.) C e D dados da publicação, com destaque na forma do *gating* de plaquetas ativadas pelo autor, e marcado com triângulo vermelho. Em E a distribuição do *gating* no quarto dia de conservação (presente estudo).

Neste trabalho, os autores identificaram o maior percentual de plaquetas ativadas no dia 3. Nos nossos dados, esta ativação foi identificada nos dias 4 e cinco de armazenamento, quer pelo anticorpo *home made* de especificidade anti-fibrinogênio, quer pelo reagente comercial CD62-P, o que sugere ser bem consistente este resultado. (68)

A identificação da ativação de plaquetas deve ser considerada um parâmetro a ser usado pelos centros de transfusão de sangue para avaliar a viabilidade e lesão de estocagem de concentrado de plaquetas. Seria útil para o paciente se fosse considerado o índice de plaquetas já ativadas, e que, portanto, não resultariam em eficácia transfusional para se calcular o incremento plaquetário, a recuperação e sobrevivência de plaquetas.

Shin e colaboradores publicaram em 2017 um modelo matemático e inteligente para analisar as plaquetas em repouso (discóides) daquelas com mudança de forma, por ativação e agregação. Este fenômeno é dinâmico no nosso organismo e se dá pela intrincada malha proteica e de proteínas adesivas que compõe a membrana plaquetária. Após a sinalização por quimiocinas, e lesão de vaso, inicia-se o processo de adesão e ativação plaquetária. A integrina $\alpha IIb\beta 3$, conhecido como GpIIb/IIIa sofre drásticas mudanças conformacionais por meio de sinalização de dentro da plaqueta para fora e se liga ao Fibrinogênio. (69)

Após a exposição a estímulos físicos ou bioquímicos, notável formato das plaquetas as mudanças precedem a agregação ou adesão. As mudanças na forma das plaquetas facilitam a formação e adesão de agregados plaquetários, mas são prontamente reversíveis em contraste com as características irrevogáveis de agregação e adesão. Neste fenômeno dinâmico, vias de sinalização molecular complexas e uma série de várias proteínas do citoesqueleto estão envolvidas.

Podemos afirmar com segurança, que o anticorpo monoclonal produzido é da classe /subclasse IgG1 κ , cuja especificidade confirmada e validada é dirigida contra a molécula total do fibrinogênio.

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática hexamérica de 340 kDa sintetizada pelo fígado e é o principal componente estrutural do coágulo. O tipo de distúrbio de fibrinogênio que requer terapia de reposição pode ser congênito ou adquirido. Pode haver uma anormalidade na quantidade ou função do fibrinogênio circulante.(70)

Diante dos resultados encontrados pode-se prospectar o uso do anticorpo anti-fibrinogênio para análises em geral, para construção de imunossensor e determinação rápida de fibrinogênio quantitativamente, o que teria tido grande impacto na pandemia de COVID 19, tendo em vista sua importância como proteína de fase aguda, seu monitoramento corroboraria com a diminuição e normalização dos níveis de fibrinogênio na fase de recuperação da doença. Além do uso já projetado, para o controle de qualidade de plaquetas, e com certeza, do Plasma Fresco Congelado e do Crioprecipitado.

As condições adversas determinadas para os pesquisadores em função da pandemia não permitiram a construção do imunossensor, tendo em vista as dificuldades em deslocamentos para laboratórios de outras Universidades, como seria o caso, para o Instituto de Química de Araraquara, para a Unifesp de São José dos Campos, destacando que nem mesmo nos Laboratórios de Imunossensor da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Campus de Botucatu, foi possível.

O pedido de análise de depósito de patente foi realizado junto a AUIN e aguarda o posicionamento da Agência. Mesmo após a apresentação/defesa deste trabalho, ensaios adicionais continuarão a ser realizados com a finalidade de consubstanciar o depósito de patente junto ao INPI.

5 – CONCLUSÕES

Estabeleceu-se novo método de controle de qualidade de plaquetas com finalidade transfusional, baseado em citometria de fluxo usando anticorpo monoclonal de especificidade anti-fibrinogênio produzido *home made*. A partir deste modelo, um imunossensor deve ser construído e testado assim que as condições de pesquisa e normalidade de trabalho forem reestabelecidas.

Foi possível caracterizar o anticorpo monoclonal PAT1-10 A 5 dirigido contra antígenos plaquetários humanos produzidos pelo Laboratório de Biologia Celular - Laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - LBA/HCFMB, como sendo de especificidade anti fibrinogênio humano, molécula total.

Não foi possível estabelecer padrões de conformidade e não conformidade para a liberação de CP utilizando a tecnologia de monitoramento de VEs por Citometria de Fluxo em função das dificuldades mercadológicas em aquisição de materiais de pesquisa em função da alta do dólar, consequente ao período da pandemia.

Aguarda-se a análise de patenteabilidade, junto à AUIN, do anticorpo monoclonal caracterizado.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol*. 2006;133(3):251–8.
2. Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi e sulla sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *Oss Gazzetta delle Clin*. 1881;17:785–7.
3. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res*. 2007;31(10):1339–41.
4. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Ski Appendage Disord*. 2018;4(1):18–24.
5. van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2019;16(3):166–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>
6. Nishat S, Wuescher LM, Worth RG. Platelets enhance dendritic cell responses against *Staphylococcus aureus* through CD40-CD40L. *Infect Immun*. 2018;86(9):1–12.
7. Franco AT, Corken A, Ware J. Review Article Platelets at the interface of thrombosis , in fl ammation , and cancer. *Blood*. 2015;126(5):582–9.
8. Cognasse F, Nguyen KA, Damien P, McNicol A, Pozzetto B, Hamzeh-Cognasse H, et al. The inflammatory role of platelets via their TLRs and Siglec receptors. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. 2015.
9. Estevez B, Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology*. 2017;32(2).
10. Periyah MH, Halim AS, Saad AZM. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Stem Cell Res*. 2017;11(4):319–27.
11. Samuelson Bannow BT, Konkle BA. Laboratory biomarkers for venous thromboembolism risk in patients with hematologic malignancies: A review. *Thromb Res* [Internet]. 2018;163(October 2017):138–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2018.01.037>
12. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *Sci World J*. 2014;2014.
13. Al-Hamed FS, Mahri M, Al-Waeli H, Torres J, Badran Z, Tamimi F. Regenerative Effect of Platelet Concentrates in Oral and Craniofacial Regeneration. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6(August):1–14.
14. Morrell CN, Aggrey AA, Chapman LM, Modjeski KL. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*. 2014;123(18):2759–67.
15. Kim T, Peyre A. Rôle inflammatoire des plaquettes sanguines : application en transfusion To cite this version : RÔLE INFLAMMATOIRE DES PLAQUETTES SANGUINES : APPLICATION EN TRANSFUSION. 2014;
16. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol*. 2011;155(1):30–44.
17. 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).
18. van der Pol E, Sturk A, van Leeuwen T, Nieuwland R, Coumans F, Mobarrez F, et al. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J Thromb Haemost*. 2018;16(6):1236–45.
 19. Parsons MEM, Szklanna PB, Guerrero JA, Wynne K, Dervin F, O'Connell K, et al. Platelet Release Proteome Profiling Reveals a Core Set of Proteins with Low Variance between Healthy Adults. *Proteomics*. 2018;18(15):1–20.
 20. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014;12(5):614–27.
 21. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: As diverse as the granules... or not? *J Thromb Haemost*. 2015;13(12):2141–51.
 22. Ng MSY, Tung JP, Fraser JF, Wei H, Malcor JDM, Harper MT, et al. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J Thromb Haemost* [Internet]. 2018;546(5):2184–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.04.002>
 23. de Paoli SH, Tegegn TZ, Elhelu OK, Strader MB, Patel M, Diduch LL, et al. Dissecting the biochemical architecture and morphological release pathways of the human platelet extracellular vesiculome. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018;(0123456789):1–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2771-6>
 24. Magron A, Laugier J, Provost P, Boillard E. Pathogen reduction technologies: The pros and cons for platelet transfusion. *Platelets* [Internet]. 2018;29(1):2–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1306046>
 25. Ng MSY, Tung JP, Fraser JF. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? *Transfus Med Rev* [Internet]. 2018;32(3):144–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2018.04.001>
 26. Dovizio M, Bruno A, Contursi A, Grande R, Patrignani P. Platelets and extracellular vesicles in cancer : diagnostic and therapeutic implications. 2018;
 27. Black A, Pienimaeki-Roemer A, Kenyon O, Orsö E, Schmitz G. Platelet-derived extracellular vesicles in plateletpheresis concentrates as a quality control approach. *Transfusion*. 2015;55(9):2184–96.
 28. Kailashiya J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal Biochem* [Internet]. 2018;546:78–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.030>
 29. Millar D, Murphy L, Labrie A, Maurer-Spurej E. Routine screening method for microparticles in platelet transfusions. *J Vis Exp*. 2018;2018(131):1–10.
 30. Meziani F, Delabranche X, Mortaza S, Asfar P. Les microparticules circulantes : un nouvel acteur dans le sepsis ? *Reanimation*. 2008;17(2):120–5.
 31. Lu W, Fung M. Platelets treated with pathogen reduction technology: Current status and future direction. *F1000Research*. 2020;9:1–8.
 32. Mazzeffi MA, Patel PA, Bolliger D, Erdoes G, Tanaka K. The Year in Coagulation: Selected Highlights From 2019. 2020 [cited 2021 May 13]; Available from: <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2020.01.045>

33. Hatayama Y, Matsumoto S, Hamada E, Kojima N, Hara A, Hino N, et al. Analysis of acute transfusion reactions and their occurrence times. *Yonago Acta Med.* 2018;61(1):87–90.
34. BRASIL M da S. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. <http://portalms.saude.gov.br/>. 2017. p. 360.
35. Alcaína PS. Platelet transfusion: And update on challenges and outcomes. *J Blood Med.* 2020;11:19–26.
36. Garg S, Pradeep ARAR, Robinson M, Sun L, Sun S, Cheng A, et al. Parameters of Neoplastic and Nonneoplastic Lymphocytes Using. *J Periodontol.* 2018;5(1):85–8.
37. Brasil. Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Ministério da Saúde. 2017;926.
38. Gubensek J, Strobl K, Harm S, Weiss R, Eichhorn T, Buturovic-Ponikvar J, et al. Influence of citrate concentration on the activation of blood cells in an in vitro dialysis setup. *PLoS One.* 2018;13(6):2–13.
39. Wei H, Malcor JDM, Harper MT. Lipid rafts are essential for release of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles from platelets. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–11.
40. Burnouf T, Goubran HA, Chou ML, Devos D, Radosevic M. Platelet microparticles: Detection and assessment of their paradoxical functional roles in disease and regenerative medicine. *Blood Rev [Internet].* 2014;28(4):155–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2014.04.002>
41. Hosseini E, Ghasemzadeh M, Azizvakili E, Beshkar P. Platelet spreading on fibrinogen matrix, a reliable and sensitive marker of platelet functional activity during storage. *J Thromb Thrombolysis [Internet].* 2019;48(3):430–8. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11239-019-01916-8>
42. Gomes MEW, Fabris C, Filho JLB, Dreher R, Rosito GA. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. Vol. 46, *Rev Ass Med Brasil.* 2000.
43. Selvadurai M V., Brazilek RJ, Moon MJ, Rinckel JY, Eckly A, Gachet C, et al. The PI 3-kinase PI3KC2 α regulates mouse platelet membrane structure and function independently of membrane lipid composition. *FEBS Lett.* 2019;593(1):88–96.
44. Bennett JS. Platelet-fibrinogen interactions. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:340–54.
45. Mangin PH, Onselaer MB, Receveur N, Le Lay N, Hardy AT, Wilson C, et al. Immobilized fibrinogen activates human platelets through glycoprotein VI. *Haematologica.* 2018;103(5):898–907.
46. Xu R-G, Gauer JS, Baker SR, Slater A, Martin EM, Mcpherson HR, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at www.ahajournals.org/journal/atvb. *Arter Thromb Vasc Biol [Internet].* 1092;41:1092–104. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.120.315030>.
47. Mosele S, Stratopoulou CA, Camboni A, Donnez J, Dolmans MM. Investigation of the role of platelets in the aetiopathogenesis of adenomyosis. *Reprod Biomed Online [Internet].* 2021;42(4):826–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.01.009>
48. Haybar H, Maleki Behzad M, Shahrabi S, Ansari N, Saki N. Expression of Blood Cells Associated CD Markers and Cardiovascular Diseases: Clinical

- Applications in Prognosis. *Lab Med*. 2020;51(2):122–42.
49. Carolina Bonet Bub. ESTUDO CLÍNICO-LABORATORIAL DE PACIENTES HEMATOLÓGICOS COM REFRATARIEDADE PLAQUETÁRIA - AVALIAÇÃO DE CROSSMATCH VIRTUAL PELA FERRAMENTA EPVIX PARA SELEÇÃO DE DOADORES HLA COMPATÍVEIS. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP; 2017.
 50. Buchignani M. Avaliações de parâmetros que conferem qualidade ao concentrado de plaquetas. Universidade Estadual Paulista - UNESP;
 51. Prudent M. What about Platelet Function in Platelet Concentrates? *Hamostaseologie*. 2020;40(4):500–8.
 52. Azevedo NC de. Validação de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos plaquetários para aplicação em citometria de fluxo. Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina; 2006.
 53. Toralles-Pereira C, Pardini MIDMC, Deffunet E, Machadot PEA. The first report of the human platelet alloantigen 4b allele in a Brazilian. *Int J Immunogenet*. 2005;32(3):165–6.
 54. Valente KN, Levy NE, Lee KH, Lenhoff AM. Applications of proteomic methods for CHO host cell protein characterization in biopharmaceutical manufacturing. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2018;53:144–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.004>
 55. Deffune E, Moroz A, Bertanha M. Procedimento Operacional Padrão do Laboratório de Engenharia Celular de Botucatu. Botucatu,SP; 2019.
 56. Hoogenraad N, Helman T, Hoogenraad J. The effect of pre-injection of mice with pristane on ascites tumour formation and monoclonal antibody production. *J Immunol Methods*. 1983;61(3):317–20.
 57. Celebi ARC, Ulusoy C, Mirza GE. The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye syndrome: A randomized double-blind crossover study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252(4):619–26.
 58. Arora S, Saxena V, Ayyar BV. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods* [Internet]. 2017;116:84–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.12.010>
 59. de Souza Queiroz KC, Zambuzzi WF, Santos de Souza AC, da Silva RA, Machado D, Justo GZ, et al. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett*. 2007 Dec;258(1):126–34.
 60. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*. 1972 Aug;48(2):422–7.
 61. Dulley JR, Grieve PA. A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Anal Biochem*. 1975;64(1):136–41.
 62. Towbin H, Staehelint T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). Vol. 76, *Biochemistry*. 1979.
 63. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J V, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856–60.
 64. J Tackett A. The Role of Mass Spectrometry in Chromatin Biology. *J*

- Proteomics Bioinform. 2013;01(S2):2891–905.
65. Universal Protein Resource (UniProt) (2017). p. Web page. Available at: www.uniprot.org.
 66. Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(6):576–85.
 67. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*. 2001;45(3):194–205.
 68. Vucetic D, Ilic V, Vojvodic D, Subota V, Todorovic M, Balint B. Flow cytometry analysis of platelet populations: Usefulness for monitoring the storage lesion in pooled buffy-coat platelet concentrates. *Blood Transfus*. 2018;16(1):83–92.
 69. Shin EK, Park H, Noh JY, Lim KM, Chung JH. Platelet shape changes and cytoskeleton dynamics as novel therapeutic targets for anti-thrombotic drugs. *Biomol Ther*. 2017;25(3):223–30.
 70. Kaur J, Jain A. Fibrinogen [Internet]. Perals S, editor. StatPearls Publishing; 2021. 173 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537184/>

8- SUPORTE FINANCEIRO

O projeto contou com suporte financeiro relacionado com convênio já existente com HC-UNESP, SICONV nº**34933/2011** e FAPESP nº**2016-25281-0**.