



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

LAÍS PRISCILA DE SANTIS

Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos

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

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz
Co-orientadora: Prof. Dra Rosana Rossi Ferreira

**Botucatu
2018**

Laís Priscila De Santis

Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos

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

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz
CO-orientador: Prof. Dra. Rosana Rossi Ferreira

Botucatu
2018

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

Santis, Laís Priscila De.

Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos / Laís Priscila De Santis. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Andrei Moroz

Coorientador: Rosana Rossi Ferreira

Capes: 90194000

1. Anticorpos monoclonais. 2. Antígenos. 3. Grupos sanguíneos. 4. Imunologia. 5. Leucócitos.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Antígenos de grupo sanguíneo; Imunologia; Leucócitos.

Laís Priscila De Santis

Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos

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

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz
Co-orientador: Prof. Dra. Rosana Rossi Ferreira

Comissão examinadora

Prof. Dr. Andrei Moroz
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Prof. Dra. Márjorie de Assis Golim
Faculdade de Medicina de Botucatu
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Prof. Dra. Marina de Oliveira Rodrigues
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Paulista - UNIP

Botucatu, 16 de Julho de 2018.

Dedico este trabalho à minha família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida pelo dom da vida, pelas grandes oportunidades, pela saúde e pela família que tenho.

Agradeço à professora Dra. Elenice Deffune e ao Professor Dr. Andrei Moroz, pela oportunidade que me deram e pelo apoio de todos os dias.

À Professora Dra. Rosana Rossi Ferreira. Mesmo distante, sempre está ao meu lado nos desafios de cada dia.

À equipe do CEVAP, na pessoa da professora. Dra. Lucilene Delazzari dos Santos, pelo apoio a este trabalho, à equipe do Laboratório de Matriz Extracelular do Instituto de Biociências, e à professora. Dra. Márjorie de Assis Golim, pela parceria na pesquisa, pelos ensinamentos e pelo apoio que me deu durante a caminhada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas da Unesp de Bauru, onde construí meu alicerce.

Ao pessoal do Laboratório de Engenharia Celular: Heloísa, Ana Carolina, Mariane, Pâmela, Thays, Juliane, Ana Livia, Helga, Rafael, Alexandre, Ondina, Ednelson e a todos os estagiários. Obrigada pela ajuda em todas as fases da caminhada e pelos momentos alegres que compartilhamos. Também agradeço à minha amiga Karen, por ser sempre estar ao meu lado, desde o primeiro dia da graduação, e à Thaisa, por me acolher no início da minha nova caminhada.

Aos profissionais do Hemocentro de Botucatu, por sempre colaborarem com a pesquisa e com nossa formação profissional. Agradeço também aos Doadores de Sangue: sem eles este trabalho não poderia ter se tornado realidade.

Aos meus pais Laércio e Nilcéia pelo imenso amor, carinho, educação, incentivo e dedicação. Agradeço a minha irmã Larissa e aos meus avós Domingos e Joana, pelos momentos de alegria, carinho e incentivos depositados a mim. Ao meu namorado Mateus pelo seu amor, incentivo e por nunca me deixar desanimar.

Agradeço ao meu avô Alexandre de Santis (*In memoriam*): sua vida me ensinou muito. Somente após sua partida consegui entender certas coisas e hoje tenho a real certeza do quanto vale a pena ser honesto, trabalhador e que nunca se deve “passar por cima” de ninguém para conseguir o que se deseja.

Enfim, a todos que, de alguma forma, puderam contribuir com a realização deste trabalho, seja na parte científica, seja na amizade ou no companheirismo.

SANTIS, L.P. **Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos.** 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

RESUMO

As membranas de hemácias e leucócitos são compostas por centenas de antígenos que desempenham diversas funções relacionadas a homeostase, metabolismo celular e podem estar envolvidos em processos de rejeição de transplantes, doenças hemolíticas e reações transfusionais. Para a detecção desses antígenos são utilizados anticorpos monoclonais e a obtenção destes anticorpos envolve diversas etapas que culminam na caracterização dos produtos obtidos. Esta etapa é crítica e envolve diferentes técnicas, incluindo a Proteômica na descrição da proteína-alvo de cada anticorpo monoclonal. O objetivo deste estudo foi caracterizar anticorpos monoclonais de especificidade anti-eritrocitária e anti-leucocitária produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular (LEC) do Hemocentro de Botucatu. Foram selecionados um clone e um hibridoma produtores de anticorpos anti-eritrocitários, e um clone produtor de anticorpos anti-leucocitários, pertencentes ao banco de células do LEC. As células foram expandidas em cultura, foi realizado *Western Blotting* (WB) e cada banda proteica reconhecida pelos anticorpos (antígenos) foi analisada por Espectrometria de Massas, segundo técnicas proteômicas. Outros testes adicionais foram realizados, como técnicas imuno-hematológicas, citometria de fluxo e imuno-histoquímica. Após expansão, retestagem e verificação de reatividade contra hemácias humanas, e a seleção dos dados de outros estudos até então não explorados, na técnica de WB os anticorpos reconheceram diversas bandas. Após a análise por espectrometria de massas, identificou-se, com bom índice de confiabilidade, que a proteína reconhecida por LAMB 10 (anti-eritrocitário) pode ser ALAD, G3PD ou GPC, presentes na membrana de hemácias humanas. LAMB 11 (anti-eritrocitário) é um possível anti-CD36, Espectrina β 1 eritrocítica ou ADD2, não descartando anti-ALAD e G3PD. LAMB 12 (anti-leucocitário) é um possível anti-Mieloperoxidase. Os anticorpos caracterizados têm ampla aplicabilidade, uma vez que o CD-36 pode ser um marcador para trombose venosa, diferenciando da trombose arterial. Da mesma forma, por ter um importante papel no diagnóstico, o anticorpo anti-mieloperoxidase tem grande aplicação nas rotinas imunofenotípicas e diagnósticas. A proteômica é uma ferramenta de caracterização obrigatória e importante no processo de validação de anticorpos. No entanto, técnicas complementares para validação ainda são valiosas e indispensáveis na confirmação da especificidade dos anticorpos estudados, partindo das possibilidades apresentadas pela proteômica. Os anticorpos aqui caracterizados pelos resultados do conjunto das técnicas, além das aplicabilidades em WB e Citometria de Fluxo, têm a possibilidade de contribuir dentro escopo da biotecnologia, para auxílio diagnóstico e controle de qualidade, de forma prática, rápida e precisa.

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais. Imunologia. Antígenos de grupo sanguíneo. Leucócitos.

SANTIS, L.P. **Proteomic analysis on characterization of monoclonal antibodies directed against human erythrocyte and leukocyte antigens.** 2018. 89 p. Monograph (Master Degree). Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, Botucatu, 2018.

ABSTRACT

Red Blood Cell and leukocyte membranes are composed of hundreds of antigens that perform various functions related to homeostasis, cell metabolism and may be involved in transplant rejection, hemolytic disease and transfusion reactions. Monoclonal antibodies are used to detect these antigens and the obtaining of these antibodies involves several steps that culminate in the characterization of the obtained products. This step is critical and involves different techniques, including Proteomics to describe the target protein of each monoclonal antibody. The aim of this study was to characterize anti-erythrocyte and anti-leukocyte monoclonal antibodies produced by the Laboratory of Cellular Engineering (LEC) of the Blood Center of Botucatu. Anti-erythrocytes clone and hybridoma antibody producers and a clone that produces anti-leukocyte antibodies, belonging to the LEC cell bank were selected. Cells were expanded in culture, it was realized Western Blotting (WB) technique and each protein band recognized by the antibodies (antigens) was analyzed by Mass Spectrometry according to proteomic techniques. Others tests were realized, such as immunohematology techniques, flow cytometry and immunohistochemistry. After expansion, retesting and verification of reactivity against human red blood cells, and selection of data from other studies not exploited, in the WB technique, the antibodies recognized several spots. After analysis by Mass Spectrometry, it was identified, with good reliability, that the protein recognized by LAMB 10 (anti-erythrocytic) may be ALAD or G3PD, present in the membrane protein structure of human red blood cells. LAMB 11 (anti-erythrocytic) is a possible anti-CD36, spectrin β 1 erythrocytic or ADD2, not disregarding anti-ALAD and G3PD. LAMB 12 (anti-leukocytic) is a possible anti-Myeloperoxidase. Characterized antibodies have wide applicability. CD-36, for example, may be a marker for venous thrombosis, differentiating from arterial thrombosis. Similarly, due to its important role in diagnosis, the anti-myeloperoxidase antibody has great application in the immunophenotypic and diagnostic routines. Proteomics is a mandatory and important characterization tool in the antibody validation process. However, complementary techniques for validation are still valuable and indispensable in confirming the specificity of the antibodies, starting from the possibilities presented by the proteomics. The antibodies here characterized by the results of all the techniques, besides the applicability in WB and Flow Cytometry, have the possibility of contributing in biotechnology scope, for diagnostic assistance and quality control, in a practical, fast and precise way.

Keywords: Monoclonal antibodies. Immunology. Blood group antigens. Leukocytes.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	08
1.1. Aspectos da membrana das hemácias	08
1.2. Classificação dos grupos sanguíneos	08
1.3. Antígenos leucocitários humanos.....	10
1.4. Anticorpos monoclonais e suas aplicações	11
1.5. Análise proteômica e sua contribuição na caracterização de anticorpos monoclonais.....	13
1.6. Justificativa	13
2. Objetivo	15
2.1. Objetivo geral	15
1.6. Objetivos específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Identificação e seleção dos anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos.....	16
3.2. Expansão das células de interesse para coleta de sobrenadante de cultura (SNC) e obtenção de líquido ascítico	18
3.3. Confirmação de reatividade dos anticorpos selecionados e determinação da classe das imunoglobulinas.....	19
3.4. Realização de testes imuno-hematológicos para anticorpos anti-eritrocitários...25	
3.5. Preparo dos extratos membranários.....	29
3.6. Realização da técnica de <i>Western blotting</i>	31
3.7. Corrida eletroforética para recorte de bandas reconhecidas pelos anticorpos...33	
3.8. Proteômica: digestão em gel e análise por Espectrometria de Massas.....	33
3.9. Ensaios de Citometria de Fluxo.....	34
3.10. Imuno-histoquímica.....	35
4. Resultados e Discussão	37
5. Conclusões	78
Referências Bibliográficas	80
Anexos	85
7.1. ANEXO A - Comitê de Ética em Pesquisa Animal	85
7.2. ANEXO B - Comitê de ética em pesquisa	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos da membrana das hemácias

A membrana dos glóbulos vermelhos é composta por uma variedade de proteínas que se ancoram ou atravessam a bicamada lipídica. Muitas são polimórficas e definem vários grupos sanguíneos pela diferenciação dos antígenos ligados a elas^{1,2}.

As proteínas de membrana desempenham funções distintas, servindo de transportadoras, receptoras, sinalizadoras, adesão de proteínas envolvidas em interações das hemácias com outras células, reconhecimento imunológico, desencadeamento de respostas químicas, entre outras funções ainda desconhecidas^{1,3}. As glicoforinas tipos A, B, C e D, por exemplo, possuem receptores de membrana e antígenos que participam do reconhecimento célula-célula na face extracelular e auxiliam na estabilização do citoesqueleto através de ligações com outras proteínas na face intracelular⁴.

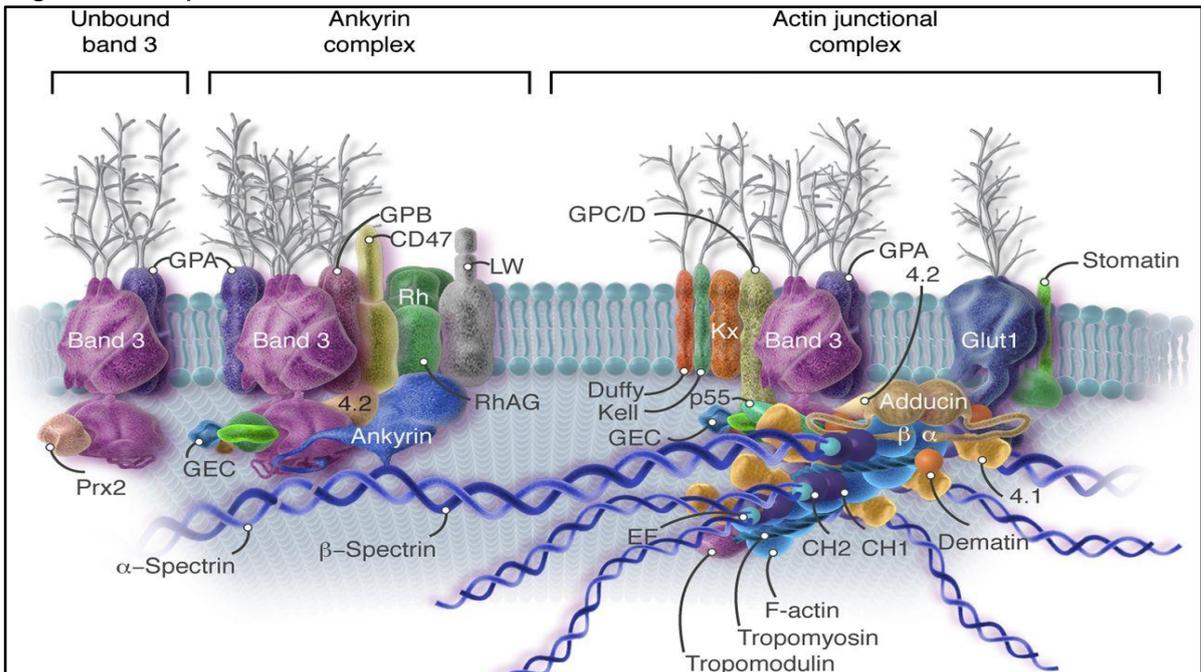
Existem em torno de 300 antígenos eritrocitários já identificados expressos na superfície da membrana das hemácias, e alguns desses antígenos também podem ser encontrados em outros tecidos, como os antígenos do sistema ABO em células do rim e em plaquetas, e do sistema Kidd nas células hepáticas^{3,5,6,7}. A Figura 1 ilustra aspectos estruturais da membrana das hemácias.

1.2. Classificação dos Grupos Sanguíneos

Os antígenos de grupos sanguíneos são determinantes antigênicos presentes na superfície dos glóbulos vermelhos e podem induzir respostas imunes⁹.

A maioria dos antígenos presentes na membrana das hemácias são glicoproteínas e a sua especificidade é determinada, em grande parte, pela sequência de oligossacáridos (no caso do grupo sanguíneo ABO, por exemplo) ou de aminoácidos (grupos sanguíneos MNS, Kell, Duffy, Kidd e Diego, por exemplo)².

Figura 1 - Aspectos estruturais da membrana das hemácias



Fonte: Lux IV SE, 2016⁸.

De acordo com a *International Society of Blood Transfusion (ISBT)*, todos os antígenos que caracterizam os grupos sanguíneos se enquadram em uma das quatro classificações: sistemas, coleções, antígenos de baixa e alta frequência:

- Os **sistemas** consistem em um ou mais antígenos de caráter hereditário, controlados num único *locus* do gene, ou por dois ou mais genes homólogos altamente ligados entre si, com baixa ou ausência de recombinação observável entre eles. Esses antígenos devem ser definidos por um aloanticorpo humano.
- As **coleções (série 200)** consistem em antígenos sorológicos, bioquímicos ou geneticamente relacionados, mas que não se enquadram nos critérios exigidos para serem considerados sistemas.
- **Série 700** ou antígenos de baixa frequência possuem uma incidência na população inferior a 1% e não podem ser incluídos em um sistema ou coleção. Deve ser demonstrada a herança por, pelo menos, duas gerações.
- **Série 901** ou antígenos de alta frequência possuem uma incidência superior a 90% e não podem ser incluídos em um sistema ou coleção, além de ter o fenótipo negativo geneticamente determinado.

Existem, atualmente, 36 sistemas de grupos sanguíneos conhecidos, e 38 antígenos que ainda não foram atribuídos a nenhum sistema, 15 antígenos em 6 coleções, 17 antígenos de baixa frequência e 6 antígenos de alta frequência descritos^{10,11,12,13}.

1.3. Antígenos leucocitários humanos

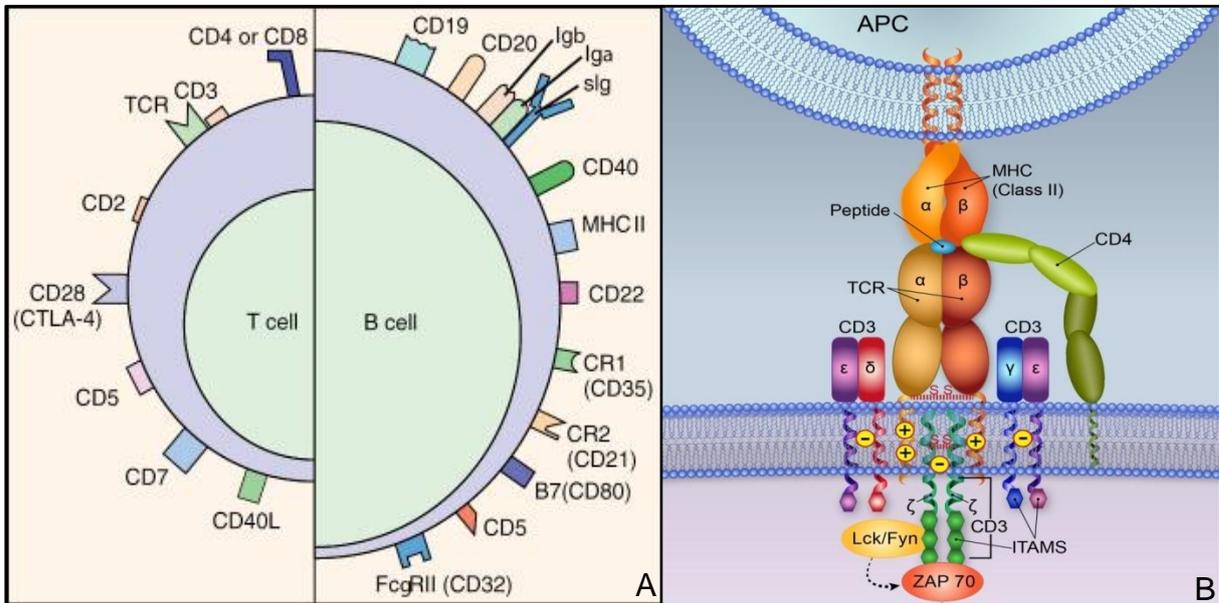
No início das pesquisas com a tecnologia dos anticorpos monoclonais, um grande número de moléculas humanas de superfície celular foram identificadas. A descrição de Kohler e Milstein¹⁴ dos anticorpos monoclonais em 1975 revolucionou a imunologia e, com o advento da tecnologia dos hibridomas, os imunologistas começaram a produzir um número cada vez maior de anticorpos direcionados contra moléculas de superfície celular de leucócitos, descrevendo-as e, inevitavelmente, surgiram repetições nas descrições apresentadas¹⁵.

Visando a padronização, *workshops* sobre Antígenos de Diferenciação de Leucócitos Humanos foram organizados e implementou-se uma nomenclatura padrão para os *clusters* de antígenos identificados por anticorpos específicos^{15,16}. Estas moléculas (antígenos) expressas na superfície de leucócitos e outras células importantes para sistema imune, são chamadas de *Clusters of differentiation* - CD's, os quais identificam as células e podem apresentar diferentes funções celulares¹⁷. Atualmente, 371 CD's já foram descritos, sendo um total de 408 moléculas (algumas agrupadas dentro de um CD), e o banco de dados com os CD's e anticorpos monoclonais que foram aprovados pode ser encontrado no site *Human Cell Differentiation Molecules* (www.hcdm.org)^{16,17}.

A descrição e apresentação de um novo CD exige, pelo menos, dois anticorpos monoclonais que reconhecem a mesma molécula e têm um padrão idêntico de reatividade: provas de reatividade específica são obrigatórias e usam técnicas imuno-bioquímicas (imunoprecipitação, *Western Blotting*) e/ou células transfectadas¹⁵. A reatividade cruzada entre as moléculas é avaliada e esclarecida e os dados coletados são apresentados nas Conferências do *Human Leucocyte Differentiation Antigens* (HLDA) e revisados formalmente pelo Conselho do *Human Cell Differentiation Molecules* (HCDM), para anticorpos monoclonais que atendem aos requisitos para um novo CD a ser descrito¹⁵.

A Figura 2 ilustra algumas estruturas moleculares de alguns CD's clássicos já descritos, e a disposição de alguns deles na membrana de leucócitos.

Figura 2 - Ilustrações de CD's clássicos já descritos, e a disposição de alguns deles na membrana de leucócitos

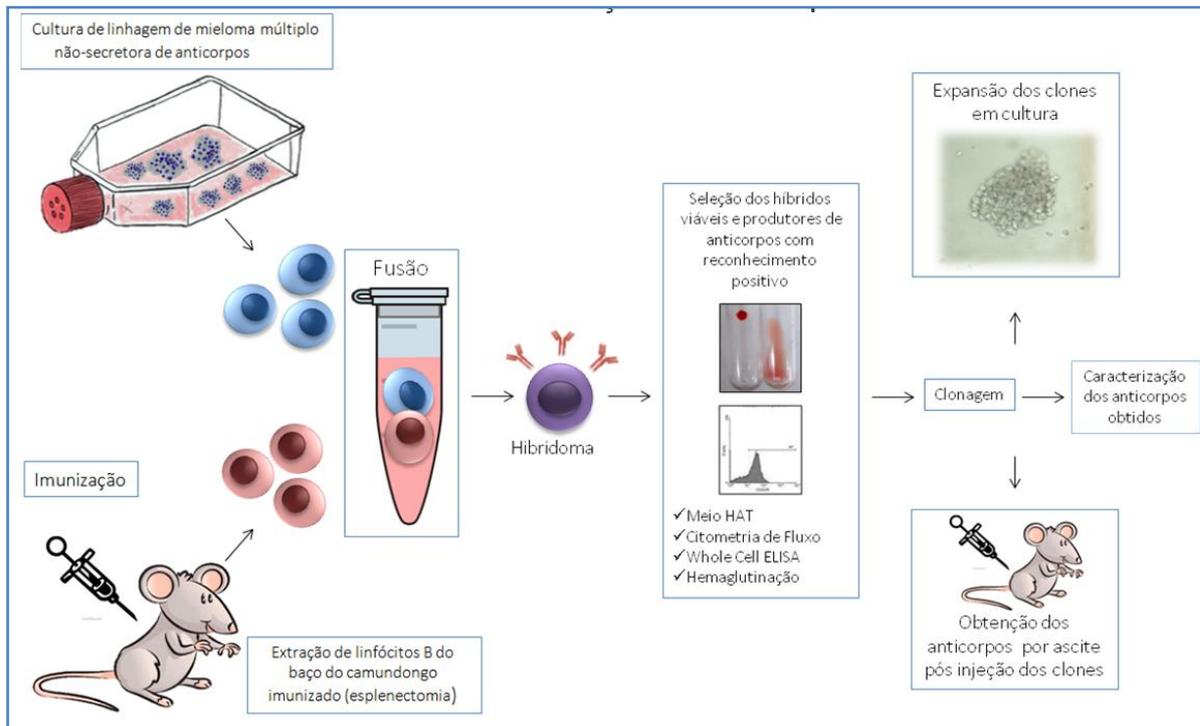


A: Marcadores clássicos de linfócitos T e B; B: Sinalização intracelular mediada por complexo TCR-CD3. Fonte: https://medicine.academic.ru/138978/cell-surface_marker; https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=676.

1.4. Anticorpos monoclonais e suas aplicações

Para a detecção de antígenos e proteínas presentes nas membranas das células, em especial das membranas de hemácias e leucócitos, podem ser utilizados anticorpos do tipo monoclonais. Os anticorpos monoclonais (*mAbs*, do inglês *monoclonal antibodies*) compõem um grupo de bioterapêuticos e reagentes diagnósticos de extensa aplicabilidade em pesquisas básicas e aplicadas, como nas rotinas imuno-hematológicas, testes imunoquímicos (*Western Blotting*, por exemplo), citometria de fluxo, cromatografia de imuno-afinidade, entre outros, além de serem empregados na terapêutica contra o câncer¹⁸. O processo de obtenção desses anticorpos baseia-se na plataforma hibridoma, desenvolvida por Köhler e Milstein em 1975¹⁴. A Figura 3 apresenta o processo de obtenção de anticorpos monoclonais utilizando a plataforma hibridoma descrita pelos pesquisadores anteriormente mencionados.

Figura 3 - Processo de obtenção de anticorpos monoclonais utilizando a plataforma hibridoma



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A caracterização e determinação da especificidade dos anticorpos obtidos é etapa crucial e obrigatória, pois a formação do anticorpo contra o imunógeno ocorre ao acaso e, portanto, os hibridomas e/ou clones, produtores de anticorpos sintetizam imunoglobulinas com especificidade a ser definida. Esse processo de caracterização é realizado por meio de um conjunto de técnicas. As técnicas podem abranger testes imuno-hematológicos para anticorpos com alvos eritrocitários (uso de enzimas, reagentes, soluções e painel de hemácias fenotipadas), e técnicas clássicas para outros alvos antigênicos, como *Western Blotting*, análise proteômica, e citometria de fluxo¹⁹.

Neste sentido, a caracterização de anticorpos monoclonais é tarefa árdua e envolve o uso de múltiplas técnicas com o objetivo de definir a especificidade, eventuais reações cruzadas interespecies e destacar a(s) técnica(s) para a(s) qual(is) o anticorpo desempenha melhor a sua função, validando-o com anticorpos disponíveis no mercado.

1.5. Análise proteômica e sua contribuição na caracterização de anticorpos monoclonais

A biotecnologia fornece, de forma crescente, novos agentes biofarmacêuticos altamente promissores no desenvolvimento de novos produtos e medicamentos e, para isso, são empregados métodos e técnicas bioanalíticas confiáveis²⁰. Depois dos esforços para mapeamento do genoma humano, a proteômica tem mostrado ser um método bioanalítico sensível na separação, identificação e caracterização de proteínas, evidenciando alvos para desenvolvimento de testes diagnósticos, marcadores moleculares, bem como no desenvolvimento de novas drogas e aplicabilidade em controle de qualidade, até mesmo na hemoterapia^{20,21,22,23}.

Desde 2001 foi regulamentado pelo *Food and Drug Administration (FDA)*²⁴ que todo reagente que contenha anticorpos monoclonais deve ser adequadamente caracterizado e sua identidade, pureza e a integridade deve ser avaliada, pois esses fatores são vitais para seu eficiente desempenho. Dentre as técnicas exigidas para a testagem dos anticorpos monoclonais (eletroforese, concentração da proteína, entre outras), está a definição da proteína alvo do anticorpo. Essa pode incluir a análise proteômica para caracterizar qual é a especificidade da imunoglobulina em estudo.

Portanto, a análise proteômica na obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais é uma das ferramentas empregadas dentre as técnicas utilizadas para descrever todo o perfil de reconhecimento de um anticorpo monoclonal produzido e que almeja-se disponibilizá-lo para emprego em rotinas de pesquisa e diagnóstico.

1.6. Justificativa

Diante da heterogeneidade fenotípica das hemácias e leucócitos, que se relaciona com a apresentação dos antígenos sobre a membrana dessas células, é preciso recorrer a insumos laboratoriais que reconheçam, de forma específica, estruturas de membrana, bem como técnicas que eliminem determinadas estruturas, ou que minimizem a expressão de umas e aumentem a expressão de outras. A união dessas técnicas resulta na correta identificação dos anticorpos em exames de rotina imuno-hematológica, ou a identificação de antígenos, raros ou

não, na membrana das hemácias e leucócitos. Dentre estas técnicas, pode-se listar o uso de reagentes do tipo Thiol (ditiotreitól - DTT, por exemplo), enzimas proteolíticas, e os anticorpos monoclonais.

O Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu desenvolve, desde sua criação em 1992, protocolos de pesquisa para obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários, leucocitários, plaquetários, além de outros alvos antigênicos. Já foram obtidos anticorpos de especificidades anti-A, anti-B, anti-AB, anti-c, anti-M, anti-N, anti-Lewis^a, anti-IgG, anti-IgM, anti-CD20, anti-CD45, anti-GPC, anti-CD90, entre outras.

Muitos dos anticorpos obtidos por meio do desenvolvimento dos hibridomas e clones não puderam ser extensamente estudados, em função da restrição de tempo ou por não serem objetos de investigação no momento de sua obtenção. Os hibridomas e clones produtores desses anticorpos não caracterizados foram criopreservados e, com intuito de otimizar a parte laboriosa da pesquisa já iniciada, delineou-se este estudo.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar anticorpos monoclonais murinos de perfil anti-eritrocitário e anti-leucocitário, produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

2.1. Objetivos específicos

1. Caracterização dos anticorpos por métodos e técnicas distintos (imunoquímicas, proteômica e Citometria de Fluxo);
2. Avaliação do uso da Análise Proteômica na contribuição para caracterização de anticorpos monoclonais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Identificação e seleção dos anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos

Para a identificação das células produtoras dos anticorpos monoclonais murinos de interesse, dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos, as quais pertencem ao banco de células do Laboratório de Engenharia Celular (LEC), foram consultados registros formais do Laboratório (livros de bancada, folhas de trabalhos e banco de células).

Após a identificação de todos os protocolos de pesquisa já realizados para obtenção dessas células (hibridomas e/ou clones), cuja especificidade geral é contra hemácias e leucócitos humanos, foram analisadas informações de registros e de estudos anteriores para se identificar o número de hibridomas/clones criopreservados. Um número extenso de células criopreservadas foram descongeladas, expandidas em cultura e aquelas bem viáveis foram selecionadas. Foram selecionadas, então, três células produtoras de anticorpos, os quais almejou-se caracterizar: dois anticorpos anti-eritrocitários (um clone e um hibridoma) com perfil de panaglutinação, e um clone produtor de anticorpos anti-leucocitários. Excluíram-se dessa seleção anticorpos já caracterizados ou aqueles que não possuíam células criopreservadas. A seleção do hibridoma foi aleatória, não sendo um critério escolhê-lo para caracterização dos anticorpos por ele secretados.

As informações sobre o clone e o hibridoma produtores de anticorpos anti-eritrocitários selecionados estão descritas abaixo. Os anticorpos selecionados foram renomeados, segundo o padrão utilizado no Laboratório de Engenharia Celular. Cada anticorpo recebeu uma sigla LAMB (Laboratório de Anticorpos Monoclonais de Botucatu), seguida de um número ainda não utilizado por nenhum outro anticorpo já caracterizado.

- LAMB 10 (Hibridoma)

Protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Engenharia Celular para obtenção de anticorpos anti-hemácias com aplicabilidade nas rotinas imuno-hematológicas (rotinas sorológicas para fenotipagem de hemácias). A imunização dos camundongos ocorreu utilizando-se de hemácias tipo B sem fenótipo definido, não tratadas por enzima, lavadas com solução salina isotônica 0,9% (SSI) e ressuspensas em SSI para injeção. A fusão foi realizada em 10 de Junho de 2003 e obtiveram-se 960 hibridomas. Destes, 271 células foram testadas.

- LAMB 11 (Clone)

Protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Engenharia Celular para obtenção de anticorpos anti-hemácias com aplicabilidade nas rotinas imuno-hematológicas (rotinas sorológicas para fenotipagem de hemácias). A primeira imunização dos camundongos utilizando hemácias tipo AB, RhD negativo, tratadas com enzima proteolítica (papaína) e ressuspensas em SSI para injeção ocorreu em 20 de Abril de 1993 e a fusão foi realizada em 25 de Maio de 1993. Foram obtidos 432 hibridomas e destes, 345 células foram testados. O percentual de eficiência de fusão foi de 79,86%. A clonagem dos hibridomas obtidos foi realizada em 24 de Abril de 2003.

Com relação ao anticorpo anti-leucocitário, foi selecionado um clone que já passou por testes em outros trabalhos para definição da especificidade, porém não concluídos. Excluíram-se dessa seleção anticorpos já caracterizados. As informações sobre esta seleção estão apresentadas abaixo.

- LAMB 12 (Clone)

Protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Engenharia Celular para obtenção de anticorpos anti-leucócitos. Teve envolvimento de alunos de pós-graduação e foi financiado pelo CNPq. A imunização dos camundongos ocorreu no início do ano de 2004 e utilizou-se de leucócitos provenientes de *buffy-coat* (camada leucoplaquetária) de doadora de células-tronco hematopoiéticas do sexo feminino, de 46 anos de idade. Essas células, do tipo linfomononucleares, foram excedentes da

bolsa de coleta de células-tronco hematopoiéticas presentes no sangue periférico, coletadas por aférese após mobilização por 10 dias com Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - GM-CFS). As células foram ressuspensas em SSI para injeção intraperitoneal de camundongos para a etapa de imunização, e a fusão ocorreu em 03 de Fevereiro de 2004. Foram obtidos 576 hibridomas e destes, 102 foram testados, sendo o percentual de eficiência de fusão de 17,7%. A clonagem do hibridoma foi realizada em 26 de Março de 2004, com retenção de 16 clones.

3.2. Expansão das células de interesse para coleta de sobrenadante de cultura (SNC) e obtenção de líquido ascítico

Os três anticorpos selecionados foram amplificados pela técnica de sobrenadante de cultura (SNC) (também conhecida por *batch* de cultura). As células criopreservadas (clones e hibridoma), obtidas pela plataforma hibridoma de desenvolvimento de anticorpos monoclonais, foram descongeladas, cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado a 20% com soro bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich®), em frascos de cultura celular para células em suspensão, produzidos em material poliestireno, dimensões 25cm² e 75cm², em estufa de cultura celular com 5% de dióxido de carbono (CO²) e atmosfera úmida a 37°C.

Para as células produtoras de anticorpos monoclonais anti-eritrocitários, decorridas semanas de expansão, foi conferida a viabilidade de cada frasco e foi criarmazenada 1/3 de cada cultura para manutenção do banco de células, e 2/3 foram mantido sem cultura por um período de dez dias, sem troca do meio de cultura, para promover maior liberação de anticorpos no SNC e, posteriormente, ocorrer o processo de morte celular natural. As células em apoptose foram separadas por centrifugação e o SNC foi congelado a -30°C em tubos cônicos para posterior retestagem do SNC, no qual os anticorpos produzidos pelas células mantêm-se em suspensão.

Para os anticorpos anti-leucocitários foi obtido o líquido ascítico em camundongos, realizando a reinjeção do clone produtor de anticorpos anti-leucocitários no peritônio destes animais. Este método propicia maior concentração

de anticorpos secretados/mL de líquido ascítico e, neste caso, não ocorre absorção *in vivo*. Foi injetado, previamente às células, 1mL de óleo mineral por via intraperitoneal (IP) em cada um dos cinco camundongos isogênicos adultos machos, do tipo Balb-C, maiores de 2 meses de idade e de peso entre 260 e 280g. Após 30 dias de irritação abdominal, os clones produtores de anticorpos anti-leucocitários foram concentrados na razão de 10^6 células/mL e injetados por via IP em cada camundongo já sensibilizado pelo óleo mineral. Os animais foram mantidos em condições ideais de biotério, 2 animais por gaiola, com ração e água *ad libitum*. O líquido ascítico foi retirado por punção repetidas vezes, centrifugado a 16.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante obtido foi aliquoteado e criopreservado a -80°C .

Os anticorpos contidos nos SNC (anti-eritrocitários) e no líquido ascítico (anti-leucocitário), passaram por procedimentos de retestagem por hemaglutinação em tubo com hemácias humanas (anti-eritrocitários) e testes por *dot-blot* e citometria de fluxo (anti-leucocitário).

3.3. Confirmação de reatividade dos anticorpos selecionados e determinação da classe das imunoglobulinas

3.3.1. Anticorpos anti-eritrocitários

Para a confirmação de reatividade dos anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários humanos, selecionados e expandidos nas etapas anteriores, foi realizada a técnica clássica de hemaglutinação em tubo frente a uma suspensão de hemácias na concentração de 5% em SSI.

Para este teste foram utilizadas amostras de hemácias selecionadas, obtidas no serviço de Imuno-hematologia do Doador de Sangue e Controle de Qualidade do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Essas amostras foram provenientes de doadores de sangue saudáveis, com testes sorológicos não reagentes, maiores de 18 anos e que concederam participar da pesquisa via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Posteriormente à realização dos testes imuno-hematológicos da rotina do referido laboratório, as amostras seriam descartadas, não havendo necessidade de coleta de

sangue somente para este estudo. Os dados imuno-hematológicos dessas amostras são apresentados no Quadro 1.

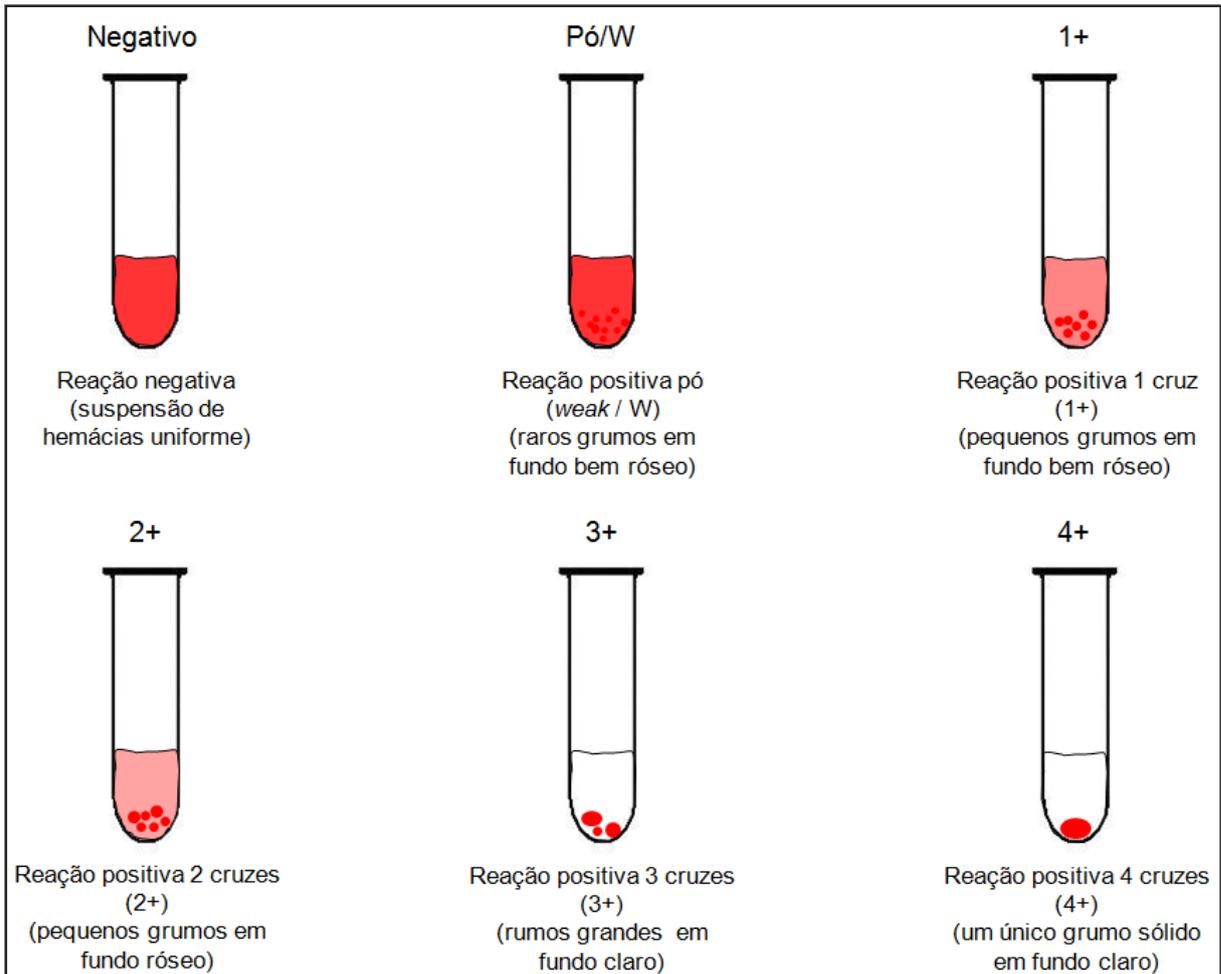
Quadro 1 - Dados das hemácias provenientes das amostras de doação voluntária ao Hemocentro de Botucatu utilizadas na retestagem dos SNC

Tipagem ABO/Rh	Data da coleta da amostra	Fenotipagem Sistema Rh	Fenotipagem Antígeno Kell	Fenotipagem de outros Sistemas
A RhD positivo	03/11/2016	CCee	K -	-
A RhD negativo		ccee	K -	
B RhD positivo		ccEe	K -	
B RhD negativo		ccee	K -	
AB RhD positivo		CcEe	K -	
O RhD positivo		Ccee	K -	MNss; Fy(a-b+); P1+; Le(a-b+); Lu(a-b+); k+; Kp(a-b+); Jk(a+b+)
O RhD negativo		ccee	K-	-

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Foram preparadas as suspensões de hemácias a 5% e, em cada tubo de hemólise, foram pipetados 50µL do SNC de cada anticorpo e 25µL da suspensão de hemácias. Após homogeneização suave, os tubos foram centrifugados a 900g durante 15 segundos, seguidos de leitura visual e registro da intensidade de aglutinação, proposta por Race e Sanger²⁵ e modificada por Marsh²⁶. O critério de classificação das intensidades de aglutinação é apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Critério para determinação das intensidades das reações de hemaglutinação em tubo



Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Para a realização do *screening* da classe dos anticorpos foi preparada uma solução de Ditiotretitol (DTT) a 0,01M em tampão fosfato-salino (PBS) e as alíquotas desta solução foram mantidas a -30°C. Tubos controle (uso de PBS) e tubos tratados (DTT) foram preparadas e foram utilizados os SNC para os testes. Para conferir a reatividade por aglutinação em tubo foi utilizada uma amostra de sangue proveniente do Serviço de Imuno-hematologia do Doador de Sangue, cujas informações imuno-hematológicas seguem no Quadro 2.

Quadro 2 - Informações imuno-hematológicas da amostra de sangue utilizada nos testes com DTT e titulação dos anticorpos

Tipagem ABO/Rh	Data da coleta da amostra	Fenotipagem Sistema Rh	Fenotipagem Antígeno Kell	Fenotipagem de outros Sistemas
O+	05/12/2016	Ccee	K -	MNSs; Fy(a+b+); k+; Kp(a-b+); Jk(a+b+)

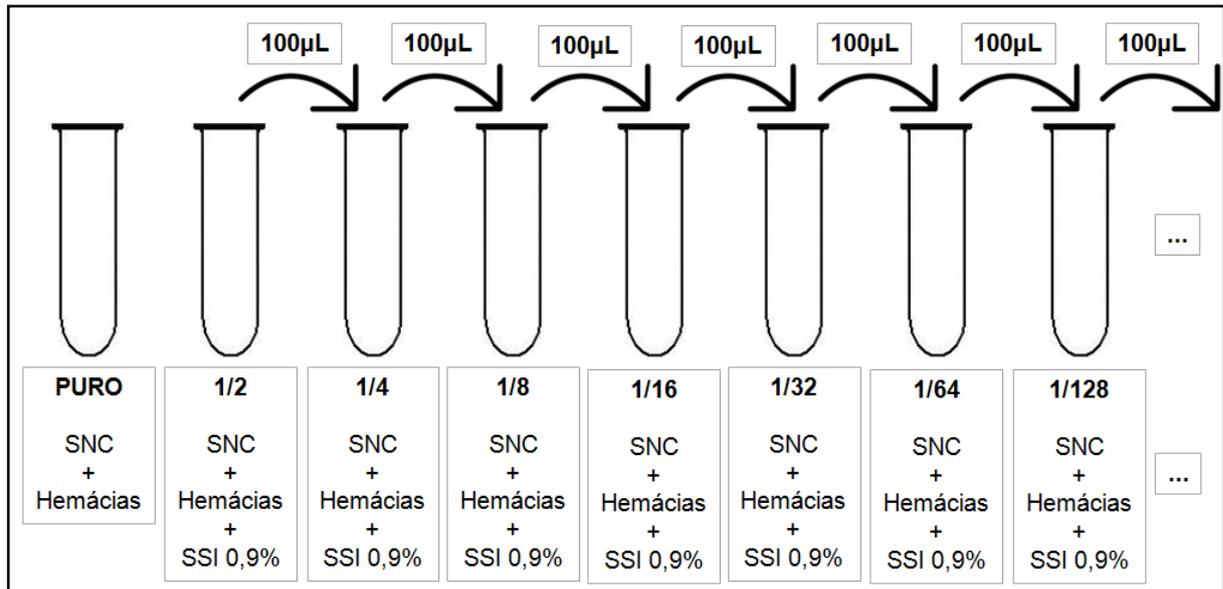
Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Cada SNC foi incubado, na proporção 1:1, com DTT, e os tubos controle foram incubados com PBS na proporção 1:1, ambos por 60 minutos a 37°C e, posteriormente, testados com uma suspensão a 5% da amostra de hemácias selecionada para os testes em tubo. Os tubos foram centrifugados a 900g durante 30 segundos, seguidos de leitura visual e registro da intensidade de aglutinação.

Foi realizada titulação dos anticorpos, utilizando a mesma amostra de hemácias apresentada no Quadro 2. O teste de titulação é baseado em técnicas imuno-hematológicas de rotina, conforme a Figura 5. No tubo de reação "PURO" foi adicionado apenas o anticorpo não diluído. Nos tubos seguintes foi realizada diluição seriada do tipo progressão geométrica de razão dois. Cada tubo continha 100µL de SSI e o SNC contendo os anticorpos anti-eritrocitários.

Em cada tubo contendo os anticorpos já diluídos foram acrescentados 50µL da suspensão de hemácias a 5% em SSI. Os tubos foram centrifugados a 900g por 15 segundos, seguidos de leitura visual segundo os padrões já apresentados na Figura 4.

Figura 5 - Esquematização do teste de titulação dos anticorpos anti-eritrocitários



SNC: Sobrenadante de cultura; SSI: Solução salina isotônica. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

3.3.2. Anticorpo anti-leucocitário

Os testes de reatividade e determinação da classe da imunoglobulina do anticorpo anti-leucocitário foram realizados em outro trabalho, cujos dados não foram objetos de estudo na ocasião, e que foram recuperados para inclusão neste estudo.

Para a testagem da reatividade, utilizando o anticorpo anti-leucocitário, foi realizado o teste Dot-Blot - *Enzyme linked-immunoassay* (Dot-Blot-ELISA) para testar a reatividade do anticorpos e definir, de maneira global, a especificidade contra linfócitos B ou linfócitos T. Foram obtidos extratos membranários de células JURKAT (linfócitos T) e células BJAB (linfócitos B), utilizando tampão de lise e ultracentrifugação (33.000g). Os lisados foram incubados em membrana de nitrocelulose e, pós-incubação, foi utilizada uma solução de bloqueio (leite em pó a 5%) para reduzir reações inespecíficas e, posteriormente, adicionou-se o líquido ascítico nos orifícios da placa de dot-blot, com incubação *overnight*. Utilizou-se como controle positivo um anticorpo monoclonal comercial anti-CD4 para células JURKAT e anti-CD20 para células BJAB. O controle negativo foi um sobrenadante de cultura que não tem especificidade contra antígenos humanos e a solução tampão PBS foi utilizada como *blank*. O anticorpo secundário utilizado no teste, após a incubação da

ascite com os antígenos JURKAT e BJAB, foi um *goat anti-mouse* marcada com peroxidase (INC[®]), na diluição 1:500.

A determinação da classe da imunoglobulina do anticorpo anti-leucocitário foi realizada em etapas anteriores, segundo a técnica de dupla difusão em gel de ágar (Ouchterlony), relatado em 1947 pelo pesquisador cujo teste leva o seu nome. A técnica consistiu-se em aplicar uma camada de agarose 2% sobre uma lâmina de vidro. No ágar foram feitas “rosetas” (orifícios) na forma esférica, de maneira que o ágar cortado pudesse ser, depois, “sugado”, permanecendo os orifícios. No orifício central foi colocada a imunoglobulina obtida por ascite do clone selecionado e nos orifícios ao redor foram colocados anti-soros de coelho ou cabra de várias classes de imunoglobulinas anti-murinas. A leitura da região de precipitação foi feita após 48 horas, mantendo-se a placa em câmara úmida por este período para evitar contaminação.

Após secagem do gel de agarose, as linhas de precipitação ficaram bem evidenciadas na lâmina pós-coloração de azul de *Coomassie* 0,2% dissolvido em uma mistura de metanol 50%, ácido acético 10% e água destilada 40%.

Testes adicionais também foram realizados em pesquisas anteriores, tendo os dados recuperados para este estudo. Foi realizado *screening* por Citometria de Fluxo do anticorpo anti-leucocitário para pesquisa de anticorpos anti-HLA classes I e II no SNC utilizando o kit FlowPRA[™] (ONE LAMBDA INC[™]). Utilizou-se o SNC do clone, o qual foi incubado com as *beads* marcadas com HLA classe I e II e revelados com *goat anti-mouse* IgG conjugado com fluoresceína (FITC) para posterior análise em Citometria de Fluxo.

Também realizou-se teste de competição por Citometria de Fluxo na pesquisa de especificidade para antígenos CD3, CD4 e CD8. Foram utilizadas, na ocasião, cinco amostras de leucócitos de doadores e incubadas com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e o anticorpo LAMB 12. Após a verificação da intensidade da positividade, as amostras incubadas com o anticorpo LAMB 1 foram reincubadas com os anticorpos comerciais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, e a média de intensidade de fluorescência de cada reação secundária foi comparada com os valores da primeira reação. Caso houvesse redução significativa nas médias de intensidade de fluorescência entre o primeiro e o segundo ensaio, o anticorpo em questão indicaria ter uma especificidade para o antígeno envolvido.

3.4. Realização de testes imuno-hematológicos para anticorpos anti-eritrocitários

Foram realizados testes para investigar o perfil de aglutinação, utilizando técnicas imuno-hematológicas, a partir de reações entre hemácias fenotipadas e os anticorpos anti-eritrocitários. Para estes testes constituiu-se um painel formado por oito amostras provenientes de manguito de bolsas de concentrado de hemácias para transfusão, oriundas de doação voluntária anônima, cujo fenótipo por extenso foi definido em testes imuno-hematológicos da rotina do Hemocentro de Botucatu. Optou-se por priorizar para esta seleção de hemácias aquelas cujo fenótipo era heterozigoto para o Sistema MNS e Duffy em função das características destes sistemas (possibilidade de apresentar efeito-dose e sofrerem alteração da expressão pós-tratamento enzimático). A Figura 6 a seguir apresenta o diagrama contendo as informações antigênicas das hemácias utilizadas para a montagem do painel.

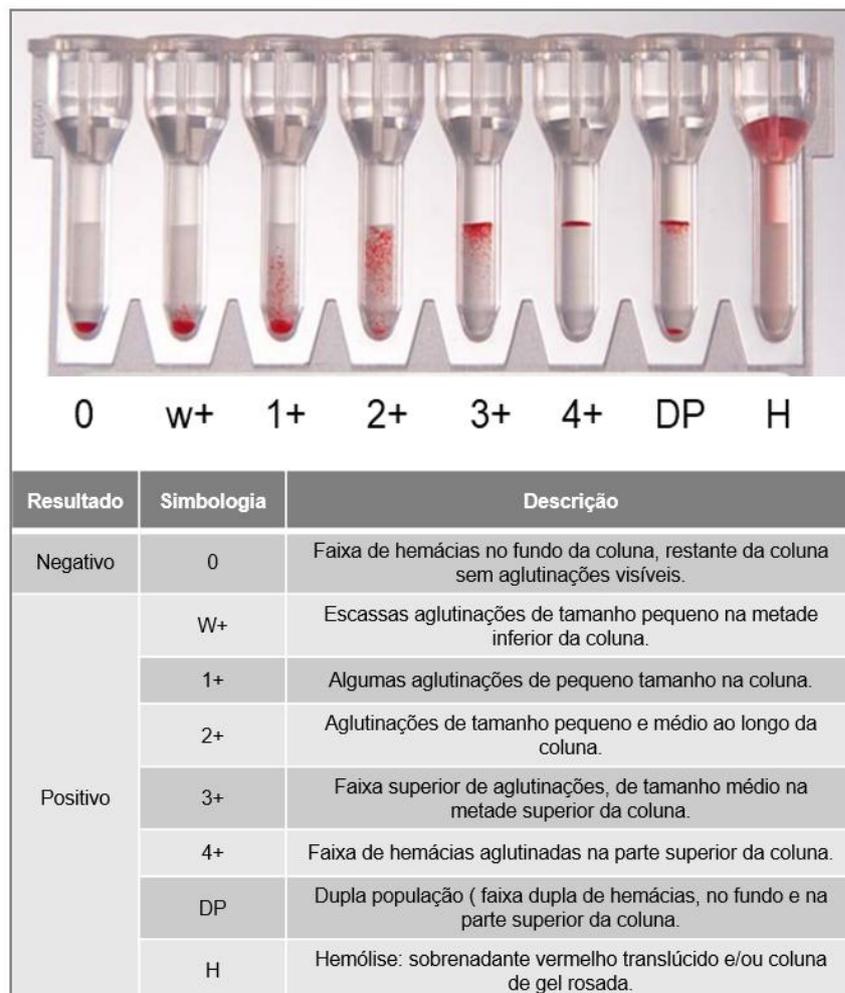
Figura 6 - Perfil fenotípico das hemácias utilizadas para montagem do painel

PAINEL DE HEMÁCIAS FENOTIPADAS																								
	ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS																							
	D	C	E	c	e	C ^w	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Lu ^a	Lu ^b	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Le ^a	Le ^b	P1	M	N	S	s	
Hemácia 1 (Bolsa 3110557-1) (PF 24922)	+	+	+	+	+	NT	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+
Hemácia 2 (Bolsa 3111045-1) (PF 158861)	+	+	0	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+
Hemácia 3 (Bolsa 3111334-5) (PF 105861)	+	+	0	+	+	NT	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+
Hemácia 4 (Bolsa 311287-0) (PF 291919)	+	+	0	0	+	NT	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	0
Hemácia 5 (Bolsa 310392-7) (PF 107051)	+	0	0	+	+	0	+	NT	NT	NT	0	+	NT	NT	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0
Hemácia 6 (Bolsa 310923-2) (PF 279846)	+	+	+	+	+	NT	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0
Hemácia 7 (Bolsa 3111063-0) (PF 292311)	+	+	0	+	+	NT	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+	0	0	+
Hemácia 8 (Bolsa 310803-1) (PF 269371)	+	+	0	0	+	NT	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	0	0	0	+

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Foram utilizados cartões de aglutinação em coluna DG Gel Neutral[®] (Grifols[™]) (gel-teste) e em cada microtubo foram pipetados 50µL da suspensão a 1% das hemácias fenotipadas sem tratamento enzimático, e 25µL de cada SNC, em cada microtubo. Foram realizados dois ensaios de incubação: um grupo a 37°C (denominação “37°C”), e outro a temperatura ambiente (denominação “TA”), ambos por 15 minutos seguidos de centrifugação a 1030 rpm durante 10 minutos, como determina o protocolo padrão de aglutinação em coluna. Foram realizadas leituras e análises dos resultados obtidos, para comparar, posteriormente, com as reações obtidas com hemácias tratadas enzimaticamente. O padrão adotado para classificar a intensidade de aglutinação no gel-teste está apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Padrão adotado para classificação da intensidade de aglutinação no gel-teste Grifols[™]



Fonte: Adaptado de:

<https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/BloodDonorScreening/BloodGroupingReagent/UCM362182.pdf>.

A imuno-hematologia utiliza-se de diversas técnicas e reagentes que auxiliam na definição da especificidade de anticorpos irregulares e determinação de antígenos raros que possam estar presentes em pacientes receptores e doadores de sangue, bem como na resolução de complexos casos imuno-hematológicos. Cada enzima proteolítica (papaína, bromelina, ficina, tripsina, entre outras), e diferentes soluções, agem de forma distinta sobre a membrana das hemácias, retirando alguns antígenos e/ou expondo outros.

Apropriando-se deste conhecimento, utilizou-se neste trabalho algumas enzimas proteolíticas e soluções para tratar hemácias e verificar se há alguma alteração no padrão de positividade pós-incubação com os anticorpos anti-eritrocitários.

3.4.1. Papainização das hemácias

Cada hemácia do painel foi tratada com enzima comercial Bio-Rad, realizando uma suspensão de cada hemácia a 5% em volume de 500µL, e adicionados 500µL solução de papaína em tubos de hemólise, incubados por cinco minutos a temperatura ambiente, lavados três vezes com SSI e realizada uma suspensão a 1% para pipetagem de 50µL nos microtubos dos cartões de gel-teste Neutral (Grifols™). Foram acrescentados 25µL de cada SNC em cada microtubo e realizadas duas incubações diferentes: 37°C e temperatura ambiente, ambos por 15 minutos seguidos de centrifugação a 1030 rpm durante 10 minutos, como determina o protocolo padrão de aglutinação em coluna.

3.4.2. Tratamento das hemácias com as soluções de bromelina e testes de imuno-hemaglutinação em coluna

As hemácias fenotipadas foram tratadas com uma solução de bromelina comercial ID-Diluent 1[®] (Bio-Rad™), segundo as recomendações do fabricante (pipetagem de 50µL de uma suspensão a 1% das hemácias + 25µL do SNC + 25µL do ID-Diluent 1[®] (Bio-Rad™) a temperatura ambiente (18-25°C) em cada microtubo. Foram realizadas duas incubações diferentes: 37°C e temperatura ambiente, ambos por 15 minutos seguidos de centrifugação a 1030 rpm durante 10 minutos.

3.4.3. Tratamento das hemácias com *low ionic strength solution* (solução de baixa força iônica - LISS) e testes de hemaglutinação em coluna

As hemácias fenotipadas do painel foram tratadas com uma solução de baixa força iônica comercial DG Sol[®] (Grifols[™]), segundo as recomendações do fabricante (pipetagem de 50µL de uma suspensão a 1% das hemácias em DG Sol[®] a temperatura ambiente (18-25°C) + 25µL do SNC) em cada microtubo. Foram realizadas duas incubações diferentes: 37°C e temperatura ambiente, ambos por 15 minutos seguidos de centrifugação a 1030 rpm durante 10 minutos.

3.5. Preparo dos extratos membranários

Após a realização de testes confirmatórios da positividade dos SNC dos clone/hibridoma anti-hemácias, testes imuno-hematológicos, e da seleção do clone e compilamento de dados já obtidos em estudos anteriores do anticorpo anti-leucócito, foram preparados extratos membranários de hemácias e leucócitos para realização do ensaio imuno-químico *Western Blotting*.

Para o preparo dos extratos membranários de hemácias humanas, foi utilizada uma amostra de hemácias de grupo sanguíneo O, RhD positivo, proveniente de doador cujo perfil fenotópico encontra-se no Quadro 3.

Quadro 3 - Fenótipo extendido de amostra de hemácias utilizada no preparo de extrato membranário para teste de *Western Blotting*

PERFIL FENOTÍPICO DAS HEMÁCIAS												
Antígenos Eritrocitários	D	C	E	c	e	Cw	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Lu ^a	Lu ^b
Hemácias Doador	+	+	0	0	+	NT	0	+	0	+	0	+
Antígenos Eritrocitários	Jk ^a	Jk ^b	Fy ^a	Fy ^b	Le ^a	Le ^b	P ₁	M	N	S	s	
Hemácias Doador	+	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Foi selecionada apenas uma amostra para *Western Blotting* pois os dois anticorpos reconhecem, confirmadamente, qualquer fenótipo de hemácia. O doador aceitou fazer parte da pesquisa via assinatura do TCLE. 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 de concentrado de hemácias lavado e tampão, na proporção de 1:11, foi ultracentrifugada por 5 vezes a 4°C durante 30 minutos cada, a uma velocidade de 33.000g em rotor tipo *Swing Out*.

Para o preparo dos extratos membranários de leucócitos humanos, foram utilizadas três amostras de leucócitos distintas, obtidas de bolsas de procedimentos de leucoférese realizadas pelo Hemocentro de Botucatu. As bolsas contendo um alto número de leucócitos, recuperados de dois pacientes submetidos à aférese, seriam descartadas ao término do procedimento, não havendo, portanto, a necessidade de se coletar amostras somente para esta etapa do projeto. Os três pacientes, na ocasião do procedimento (ano de 2002, 2008 e início de 2017), autorizaram o armazenamento e utilização de seus leucócitos para pesquisa e essas amostras encontram-se armazenadas em *freezer* a -80°C. As amostras, então, utilizadas foram as seguintes:

- **Amostra 1:** Leucócitos, denominados daqui em diante de TJAS, de paciente do sexo feminino com leucemia mieloide aguda de células dendríticas plasmocitoides, cuja amostra foi recuperada de leucoaférese terapêutica realizada no ano de 2017 no pré-tratamento quimioterápico.
- **Amostra 2:** Deste ponto em diante denominada EZE, tratou-se de leucócitos de paciente com leucemia mieloide aguda, cuja amostra foi recuperada de leucoaférese terapêutica realizada em 20018 no pré-tratamento quimioterápico.
- **Amostra 3:** Leucócitos de doador do sexo feminino que, no início do protocolo de imunização, foram utilizados como imunógenos (células de *buffy coat* de bolsa de coleta de células-tronco hematopoiéticas periféricas - CTH do ano de 2002), daqui em diante denominadas ED.

As três amostras foram descongeladas, o número de células/mL foi determinado e procedeu-se à lise e preparo dos extratos membranários. O tampão utilizado foi RIPA (Pierce[®], IL, EUA), adicionado de coquetel inibidor de protease (Sigma CO[®], Saint Louis, MO, USA), na proporção de 10^7 células a cada 100µL de tampão de lise. As células foram resuspensas no tampão e as membranas celulares foram lisadas com a auxílio de um sonificador (dois ciclos de 1 segundo). Após 30 minutos de incubação a 4°C com o tampão de lise, as amostras foram ultracentrifugadas por uma vez a 4°C durante 30 minutos, a uma velocidade de 33.000g em rotor tipo *Swing Out*.

O *pellet* de membranas tanto de leucócitos quanto de hemácias, pós-ultracentrifugação, foi ressuspenso em 100µL de tampão PBS e a concentração proteica foi dosada em equipamento NanoDrop[®], em comprimento de onda de 280nm. Pequenos grumos dos preparados de extrato membranário de leucócitos não foram totalmente dissolvidos. Possivelmente trataram-se de material genético. Por isso, foi dosada a concentração proteica somente da suspensão totalmente homogênea. Os tubos contendo as amostras de extrato de membrana foram armazenados a -80°C.

Ao volume contendo cada extrato membranário foi adicionado tampão de corrida eletroforética contendo 2-mercaptoetanol (1M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol e 50% glicerol). Os tubos contendo os extratos com tampão foram aquecidos a 95°C por 5 minutos para linearização das proteínas e, posteriormente, iniciou-se a técnica de *Western Blotting*.

3.6. Realização da técnica de *Western Blotting*

Uma vez obtidos os extratos membranários e a eles adicionado tampão de corrida, o *Western Blotting* iniciou-se pela separação das proteínas de membrana em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (gel SDS-PAGE) de 9cm x 8cm e 1,0mm de espessura, com gel de separação de gradiente 10%, e gel de empilhamento de 5%¹⁷, em tampão Tris/Glicina. A eletroforese SDS-PAGE é uma técnica versátil, pois pode ser usada para separar todos os tipos de proteínas, especialmente proteínas de membrana.

Foram realizados os cálculos, de acordo com cada concentração proteica das amostras de extratos membranários (leucócitos e hemácias), e foram aplicados 30µg

de extrato membranário por pista do gel. A corrida foi efetuada em voltagem constante de 120V. Nas pistas externas correram os padrões de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 500µL (Bio-Rad®), 5µL por pista. As proteínas separadas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF em amperagem constante (350mA) por 90 minutos e, após transferência, a mesma foi bloqueada com solução de albumina de soro fetal bovino (BFA) a 1% por uma hora, lavada e incubada separadamente com cada anticorpo monoclonal, na diluição de 1:1000 para todos os anticorpos, em agitação, *overnight* a 4°C^{27,28}. Para os anti-eritrocitários foram utilizados seus SNC, com corridas em triplicata. Para o anti-leucocitário foi utilizado o líquido ascítico, com corrida única para cada amostra de extrato membranário.

Também foram realizadas incubações com anticorpos monoclonais primários para controle da técnica, que reconhecem 100% de tipos de leucócitos e 100% de tipos de hemácias. Esses anticorpos-controle comerciais foram utilizados na proporção de 1:4000. O anticorpo anti-CD45, controle dos testes com antígenos leucocitários, foi incubado com o lisado de ED. O anticorpo anti-CD235a, controle dos testes com antígenos eritrocitários, foi incubado com o lisado de hemácias.

Após a retirada dos anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução basal e incubadas com anticorpos secundários por uma hora e meia em agitação. O anticorpo secundário era do tipo anti-*mouse*, na proporção de 1:4000, marcados com peroxidase.

A reação antígeno-anticorpo na membrana de nitrocelulose foi detectada utilizando-se solução reveladora ECL™ Select Western Blotting Reagent (GE Healthcare™). A revelação foi realizada por duas técnicas diferentes. A primeira revelação utilizou-se de filme fotográfico, sendo esta etapa realizada no Laboratório de Bioquímica (LaBio) do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu (IBB-UNESP). A segunda técnica utilizou-se de equipamento revelador G-Box A Series™ e *software* captura de imagens Genesys™, liberando imagens do WB digitalizadas. As imagens das membranas reveladas digitalmente foram salvas em dois modelos, quando possível: marcação em cor branca das bandas, em fundo preto, e marcação em cor preta das bandas, em fundo branco. Esta etapa foi realizada no Departamento de Fisiologia do IBB-UNESP.

3.7. Corrida eletroforética para recorte de bandas reconhecidas pelos anticorpos

Após a realização da técnica de *Western Blotting* e da identificação das bandas proteicas reconhecidas por cada anticorpo, foi realizada nova eletroforese em gel de poliacrilamida, sob mesmas condições eletroforéticas, porém sem a transferência para a membrana de nitrocelulose. Após a corrida, o gel foi corado com Azul de *Coomassie*, para que pudesse serem visualizadas as bandas proteicas e recortar o *spot* da proteína correspondente àquela que cada anticorpo reconhece e, por fim, proceder-se à análise proteômica.

Para uma melhor visualização das bandas proteicas nos geis, a concentração proteica de extratos membranários aplicadas nas pistas foi triplicada (90µg/amostra/pista). Após a aplicação de 90µg de proteína por extrato e a corrida ser realizada em voltagem constante de 120v por aproximadamente 120 minutos, os geis foram incubados com solução corante *Coomassie Blue* por 30 minutos e, posteriormente, lavados com solução descorante (10% de etanol e 7% de ácido acético) por 5 minutos cada lavagem até que a coloração do fundo fosse clareada e as bandas ficassem evidentes.

As técnicas de *Western Blotting* e corrida eletroforética foram realizadas no Laboratório de Bioquímica (LaBio) e também no Laboratório de Matriz Extracelular (LabMEC) do IBB - UNESP.

3.8. Proteômica: digestão em gel e análise por Espectrometria de Massas

Esta etapa do estudo foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Espectrometria de Massas do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), da Faculdade de Medicina de Botucatu. As 19 bandas/bandas/*spots* separadas por eletroforese, recortadas em tamanho 2x2mm, passaram por ciclos de descoloração e desidratação dos geis utilizando *Destain* e Acetonitrila, respectivamente. Também foram realizadas as etapas de redução de pontes de dissulfeto e alquilação. Os geis passaram por processos digestão proteica utilizando tripsina, e extração das proteínas utilizando ácido fórmico. Cada solução

proteica foi liofilizada em equipamento SpeedVac e armazenada a -20°C até o momento da análise dos digestos tríplico sem espectrometria de massas.

Os digestos tríplicos liofilizados foram solubilizados em tampão contendo Acetonitrila e acomodados em *vials* próprios do equipamento. A análise das proteínas digeridas foi realizada por Espectrometria de Massas (MS), do tipo MS/ToF, em espectrômetro MICROTOF – QIII – Bruker®, acoplado a um equipamento HPLC. A ionização das amostras foi via *Electrospray*, protonada e analisadas por sistema quadrupolo-quadrupolo-ToF, aplicando nitrogênio como gás inerte. O *Range* de tamanho dos peptídeos analisados foi de 50 a 3000 m/z e o calibrante utilizado foi Tulimix (118 a 2 721 Da).

Os dados gerados pela espectrometria de massas foram analisados pelos softwares *Compass Date Analysis* e *Compass Hystar*, resultando em gráficos de intensidade de cada peptídeo (espectros de massas), bem como no sequenciamento dos aminoácidos dos peptídeos. A partir desses dados, o conjunto de informações obtido foi confrontado com banco de dados de bioinformática, utilizando a ferramenta *Mascot Server*. Valores de score foram definidos pelos softwares para cada amostra, para serem determinados os índices de confiabilidade.

Os dados proteicos de cada banda para cada anticorpo está apresentado em forma de quadros. a descrição da disposição das informações está apresentada no tópico "Resultados e Discussão" deste trabalho. Optou-se por apresentar esta descrição posteriormente para que a leitura e compreensão fossem facilitadas.

3.9. Ensaios de Citometria de Fluxo

Os testes em Citometria de Fluxo para os anticorpos seguiram protocolo padrão do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu, onde foram realizadas as leituras e análises. Três amostras sanguíneas (sangue total colhidas em EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético) foram obtidas de doadores saudáveis que aceitaram participar da pesquisa via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A partir dessas amostras foram realizados testes em hemácias e leucócitos. Outras células, pertencentes ao banco de células do Laboratório de Engenharia Celular, compuseram os ensaios, que serão descritas a seguir. Todas as reações foram realizadas em citômetro BD FACS Calibur™ utilizando o software de análise BD CellQuest™.

Para os anticorpos anti-eritrocitários, as três amostras de hemácias foram lavadas duas vezes em tampão PBS-EDTA 1% e foi ajustada a concentração em 20.000 hemácias/mm³. Também foram preparados reações entre células-tronco hematopoiéticas (CTH) + anticorpos e células-tronco mesenquimais humanas de tecido adiposo (CTM-TA) + anticorpos, para verificar a positividade ou negatividade das reações entre estes anticorpos e os diferentes tipos celulares, ajustando-se a concentração final de células para 10⁶ células/mL.

Os tubos contendo as reações entre as hemácias I, II, III, CTH e CTM-TA os 10 μ L de SNC puro dos anticorpos foram preparados seguindo protocolo de incubação por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, 15 minutos de incubação com anticorpos secundários, lavagem com tampão PBS-EDTA 1% e ressuspensão em 400 μ L de solução tampão PBS-EDTA 1% + 100 μ L de paraformaldeído 1%.

Para o anticorpo anti-leucocitário foram utilizadas as mesmas amostras dos doadores, porém foi realizado um protocolo diferente para análise nos leucócitos de cada amostra. Foram utilizados, em cada tubo, 100 μ L de sangue total e incubou-se com 50 μ L de líquido ascítico (diluição 1:3) por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, seguido de incubação por 15 minutos com 5 μ L de anticorpo secundário anti-IgG diluído 1:200. Em cada tubo foi adicionado 1mL de solução de lise de hemácias (própria para análise de leucócitos em citometria de fluxo), seguido de incubação no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente. Cada tubo foi centrifugado e preservado o *pellet* de leucócitos, o qual foi ressuspensão em 400 μ L de solução salina para citometria Isoton[®] + 100 μ L de paraformaldeído 1%.

Foram adquiridos 20.000 eventos para os ensaios de leucócitos e hemácias, e 10.000 eventos para CTH e CTM-TA, e as análises dos leucócitos levou em consideração as diferenças de tamanho e granulosidade das células (separação dos *gates* de leucócitos, monócitos e granulócitos na etapa de análise da citometria).

Para todos os testes foram preparados os controles de auto-fluorescência, isotípicos e controles dos anticorpos secundários.

3.10. Imuno-histoquímica

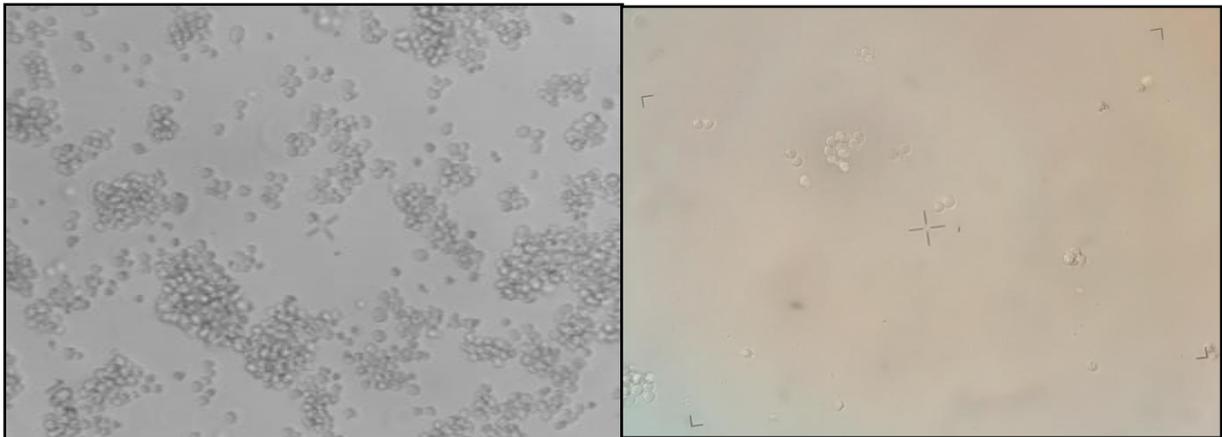
Foi proposta a realização de ensaios utilizando técnicas de imuno-histoquímica com os anticorpos. O objetivo inicial foi de avaliar o comportamento de cada

anticorpo (se era reativo ou não na técnica de imuno-histoquímica) e, a partir das hipóteses de especificidade dadas pelos testes já realizados e pela proteômica, foram selecionados cortes histológicos de diversos tecidos os quais poderiam expressar as proteínas candidatas a serem o antígeno que cada anticorpo reconhece. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, de forma automatizada no aparelho Autostainer Link 48 (DAKO™). Para as revelações foi utilizado anticorpo secundário marcado com peroxidase. As leituras/interpretação das lâminas foram realizadas conjuntamente com patologista experiente na técnica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 8 apresenta o registro da etapa de expansão em cultura celular dos clones e do hibridoma produtores dos anticorpos selecionados para este estudo. Foi possível obter, aproximadamente, um volume de 100mL de SNC de cada anticorpo, os quais foram aliquotados e armazenados a -30°C. O clone do anticorpo anti-leucocitário possuía líquido ascítico armazenados a -80°C, em torno de 20 mL cada.

Figura 8 - Fotomicrografia da expansão em cultura dos clones e hibridoma produtores dos anticorpos monoclonais



Aumento de 400x. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

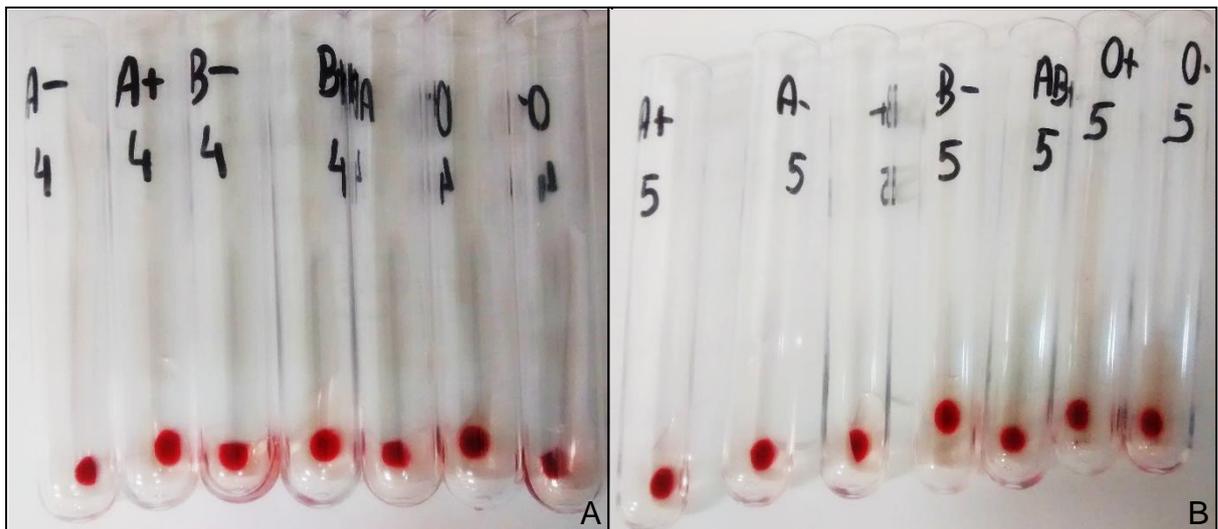
Após a coleta do SNC em cada troca de meio de cultura (duas vezes por semana) e armazenamento em *freezer* -30°C foram realizados os testes para a confirmação de reatividade dos anticorpos anti-eritrocitários, e as intensidades de aglutinação com hemácias que foram observadas estão apresentadas no Quadro 4, bem como na Figura 9. Observou-se que os anticorpos estavam reativos, viabilizando a inclusão dos mesmos nos testes posteriores. Observa-se também que os dois anticorpos selecionados apresentam um perfil de pan-aglutinação, reconhecendo hemácias de qualquer tipagem ABO-RhD.

Quadro 4 - Intensidade das aglutações observadas nos ensaios de testagem da reatividade dos anticorpos obtidos por expansão em cultura do hibridoma e clone

Hemácias de doadores	Sobrenadantes de cultura contendo anticorpos anti-hemácias		Inferência da especificidade
	LAMB 10	LAMB 11	
A+	4+	4+	Perfil anti-público
A-	4+	4+	
B+	4+	4+	
B-	4+	4+	
AB+	4+	4+	
O+	4+	4+	
O-	4+	4+	
O-	4+	4+	

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Figura 9 - Testagem em tubo da reatividade dos anticorpos selecionados utilizando hemácias humanas provenientes da doação voluntária ao Hemocentro de Botucatu



A: LAMB 10; B: LAMB 11. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

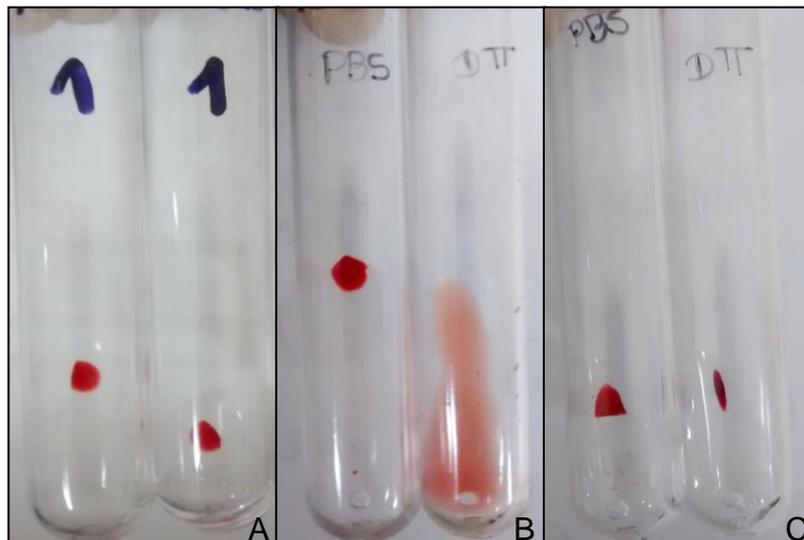
A determinação da classe dos anticorpos utilizando uma solução de DTT resultou nos dados dispostos no Quadro 5, e as reações observadas são apresentadas na Figura 10. Como o DTT destrói pontes dissulfetos das imunoglobulinas do tipo M, as reações de hemaglutinação causadas por IgM passam a ser negativas. O anticorpo LAMB 10 continuou reativo após a incubação com o DTT, sugerindo que seja da classe IgG. Já o anticorpo LAMB 11, após o tratamento com o DTT, não apresentou mais reatividade, sugerindo que seja da classe IgM.

Quadro 5 - Resultados dos testes dos SNC dos anticorpos anti-eritrocitários utilizando DTT para determinação da classe da imunoglobulina

Anticorpos/Tratamento	LAMB 10	LAMB 11
Teste em Tubo		
Suspensão em SSI	4+	4+
PBS (controle)	4+	4+
DTT	4+	Negativo
Classe da Imunoglobulina	IgG	IgM

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Figura 10 - Teste com DTT para determinação da classe dos anticorpos

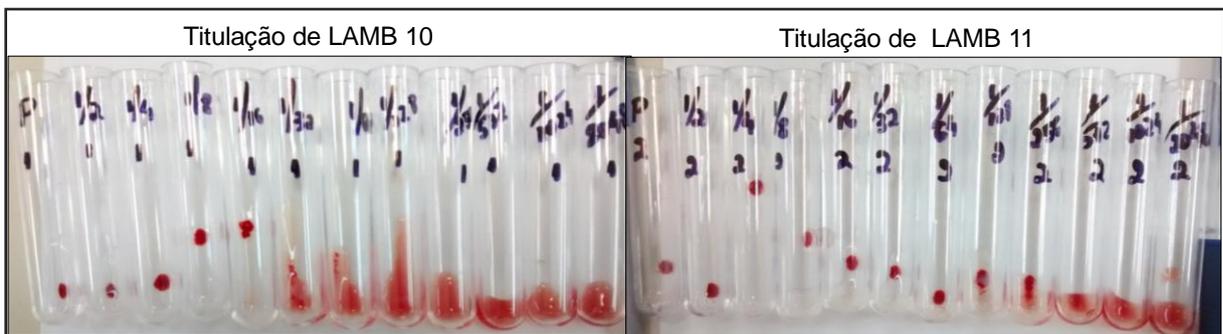


A: Teste dos SNC com hemácia antes da realização do protocolo (à direita: LAMB 10; à esquerda: LAMB 11); **B:** SNC LAMB 11: PBS+SNC 1:2 e tubo com SNC tratado com DTT; **C:** SNC LAMB 10: Tubo controle (PBS+SNC 1:2) e tubo com SNC tratado com DTT. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

No teste de titulação por aglutinação o anticorpo LAMB 10 apresentou um título de 1:128, e o anticorpo LAMB 11 apresentou um título de 1:1024. A Figura 11 ilustra os testes de titulação realizados com os anticorpos LAMB 10 e LAMB 11. A titulação dos anticorpos anti-eritrocitários, seguindo o método de rotina da imunohematologia, tem relevância no que tange ao título válido para um anticorpo aplicável à imunohematologia. A Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de Setembro de 2017⁵⁸, traz em seu Anexo 7 do Anexo IV os parâmetros recomendados para Controle de Qualidade dos reagentes utilizados em Imuno-Hematologia e existem,

para alguns anticorpos, como os antissoros Anti-A, -B, -AB e -RhD, títulos mínimos aceitáveis. LAMB 10 não atinge um título mínimo determinado para os anticorpos Anti-A, -B, -AB, que seria 256, mas supera o que é determinado para o antissoro anti-RhD (32). LAMB 11 apresentou um título maior do que os estipulados para os dois grupos de antissoros citados.

Figura 11 - Titulação por técnica imuno-hematológica de diluição seriada com os anticorpos LAMB 10 e LAMB 11



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

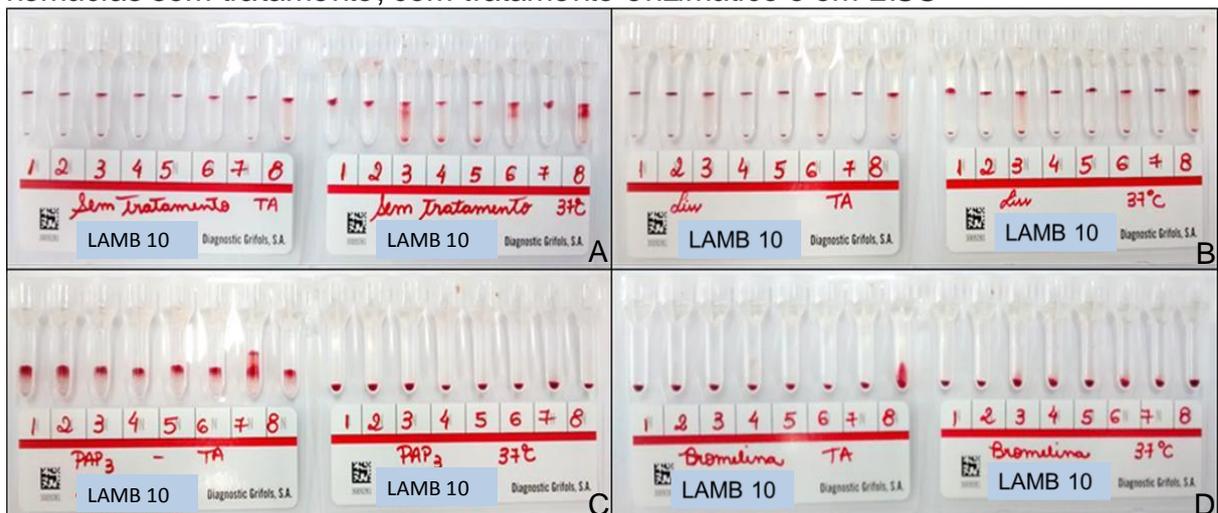
O anticorpo LAMB 10, após os tratamentos com as enzimas e a solução de baixa força iônica das hemácias, resultaram em padrões de aglutinação distintos, como pode ser observado no Quadro 6, que traz as leituras das aglutinações observadas em cada tratamento, bem como na Figura 12. As reações de aglutinação observadas frente ao painel de hemácias não tratadas resultaram em reações 4 cruces. Nos diferentes ensaios enzimáticos resultou em uma diminuição na intensidade de aglutinação, gerando até reações negativas. Apenas o tratamento com a solução de baixa força iônica (LISS), com incubação a temperatura ambiente e a 37°C, manteve a intensidade de aglutinação em 4 cruces na maioria das hemácias.

Quadro 6 - Leitura das aglutinações observadas na reação controle e nos tratamentos com bromelina, suspensão em LISS e papaína com LAMB 10

Tratamento das hemácias nas reações com PAB 1 – 189								
Hemácias	Controle (sem tratamento)		Tratamento com Bromelina		Suspensão em LISS		Tratamento com Papaína	
	TA	37°C	TA	37°C	TA	37°C	TA	37°C
1	4+ DP	4+	Neg	Neg	4+ DP	4+ DP	2+	Neg
2	4+ DP	4+	Neg	Neg	4+ DP	4+ DP	2+	Neg
3	4+ DP	2+	Neg	W	4+ DP	3+ DP	2+	Neg
4	4+ DP	4+ DP	Neg	W	4+ DP	4+ DP	2+	Neg
5	4+	4+ DP	Neg	Neg	4+ DP	4+ DP	2+	Neg
6	4+	3+	Neg	W	4+ DP	3+ DP	2+	Neg
7	4+ DP	4+	Neg	W	4+	4+ DP	3+	Neg
8	4+ DP	2+	1+	Neg	4+ DP	3+ DP	2+	Neg

DP: dupla população; LISS: Solução de baixa força iônica; Neg: reação negativa; TA: temperatura ambiente; W: reação *weak* (fraca). Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Figura 12 - Resultados dos testes de aglutinação em coluna com LAMB 10 com hemácias sem tratamento, com tratamento enzimático e em LISS



A: Reações controle em TA e a 37°C; **B:** Reações em LISS em TA e a 37°C; **C:** Reações com papaína em TA e a 37°C; **D:** Reações com Bromelina em TA e a 37°C; LISS: Solução de baixa força iônica; PAP 3: Papaína comercial Bio-Rad; TA: temperatura ambiente. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Frente aos resultados obtidos, pode-se inferir que LAMB 10 tenha uma especificidade contra um antígeno que sofre diminuição ou é negativado pós-tratamento com papaína e bromelina, podendo ser um antígeno que compõe o grupo sanguíneo MNS, ou uma porção do mesmo. A suposta especificidade de LAMB 10 é ser PAP anti-N. O que intensifica essa hipótese é o fato de que, na hemácia 7 do painel, na qual o antígeno N está presente em dose dupla (sem a presença do antígeno M) uma parcela das reações de aglutinação são mais intensas, como pode ser observado nas reações “Controle – 37°C” e “Papaína – TA”. Nas hemácias que

apresentam fenótipo MN, pode haver um efeito de dose entre M e N, dificultando a identificação da especificidade do antígeno.

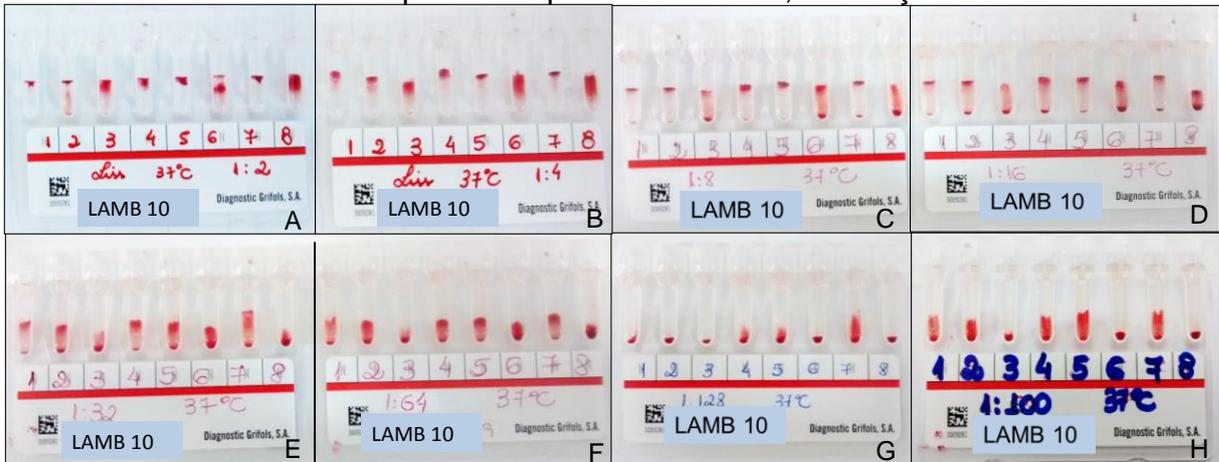
Para o esclarecimento da provável especificidade anti-N e, devido ao fato de um alto título de um anticorpo poder promover uma reação inespecífica com outros antígenos, foram realizadas diluições do anticorpo LAMB 10 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128), seguido de incubação a 37°C com as hemácias do painel em suspensão a 1% em LISS. O objetivo desta etapa foi o de favorecer uma reação de aglutinação ideal com as hemácias de fenótipo MN (mais fraca, porém positiva), ausência de aglutinação nas hemácias MM e uma aglutinação forte em hemácias com fenótipo NN. As intensidades de aglutinação observadas em cada diluição são apresentadas no Quadro 7 e Figura 13.

Quadro 7 - Intensidades de aglutinação observadas em cada diluição do anticorpo LAMB 10 com hemácias de painel suspensas em LISS, incubação a 37°C

Diluição do anticorpo LAMB 10								
Hemácias	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:100
1	4+	3+	4+ DP	3+ DP	2+ DP	2+	W	1+
2	3+	3+	4+ DP	3+ DP	2+ DP	2+	Neg	1+
3	3+	2+	2+	1+	1+	1+	Neg	Neg
4	3+	3+	4+ DP	2+	2+ DP	2+	1+	1+
5	4+	3+	4+ DP	3+	2+ DP	2+	1+	2+
6	3+	2+	2+	1+	1+	1+	Neg	Neg
7	4+	3+	4+ DP	3+	2+ DP	2+	2+	2+
8	3+	2+	2+	1+	1+	1+	Neg	Neg

DP = dupla população; **Neg** = reação negativa; **W** = reação weak (fraca); Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Figura 13 - Reações de aglutinação observadas em cada diluição do anticorpo LAMB 10 com hemácias de painel suspensas em LISS, incubação a 37°C



A: diluição 1:2; **B:** diluição 1:4; **C:** diluição 1:8; **D:** diluição 1:16; **E:** diluição 1:32; **F:** diluição 1:64; **G:** diluição 1:128; **H:** diluição 1:100. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Devido ao padrão de aglutinação negativo em todas as hemácias, encontrado na diluição 1:128, e padrão positivo em todas as hemácias, ainda que em algumas mais fraco, na diluição 1:64, foi realizada uma diluição 1:100 do SNC de LAMB 10, em SSI suplementada a 5% com albumina humana. As reações observadas são apresentadas na Figura 13 - H. Reações com hemácias do painel cujo fenótipo foi MN (hemácias 1,2,4 e 5), resultaram em aglutinações menos intensas, porém positivas. Nas hemácias de fenótipo MM (hemácias 3, 6 e 8), observou-se ausência de aglutinação, e uma aglutinação mais forte foi observada na hemácia com fenótipo NN (hemácia 7).

À partir dos resultados imuno-hematológicos, confirma-se o perfil de anti-N de LAMB 10, na diluição 1:100.

Os tratamentos com as enzimas e a solução de baixa força iônica das hemácias, incubadas com o anticorpo LAMB 11 resultaram em padrões de aglutinação semelhantes, como pode ser observado no Quadro 8, bem como na Figura 14. De maneira geral, as reações de aglutinação observadas com LAMB 11 frente ao painel de hemácias não resultaram em alterações nos diferentes ensaios enzimáticos (grande parte dos ensaios resultou em aglutinação 4 cruces). Apenas o tratamento com a solução de baixa força iônica (LISS) com incubação a 37°C diminuiu a intensidade de aglutinação nas hemácias 1 a 6.

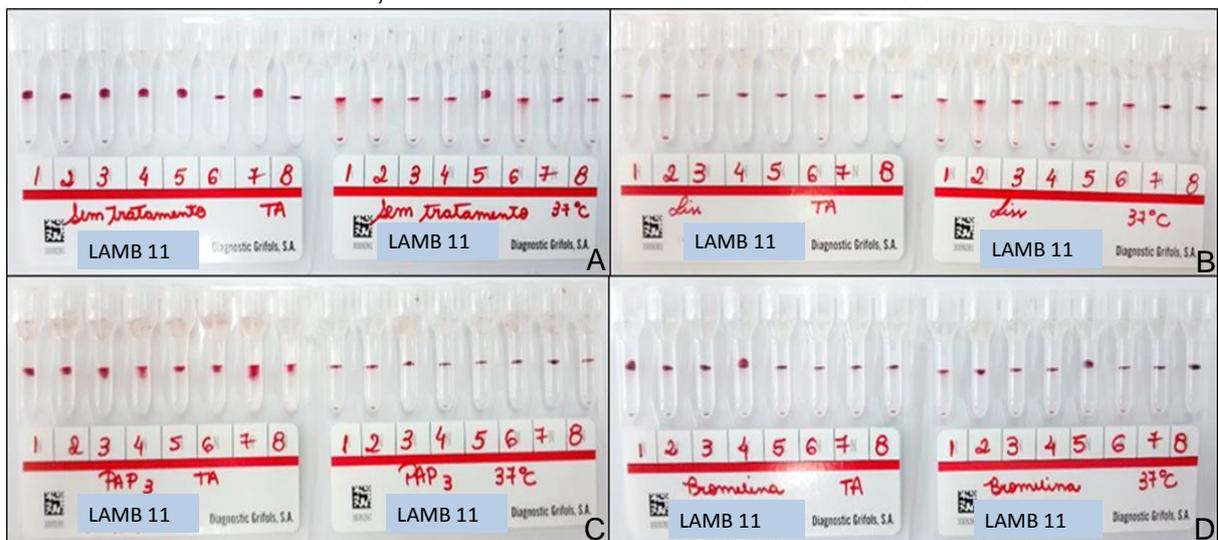
Quadro 8 - Leitura das aglutinações observadas na reação controle e nos tratamentos com bromelina, suspensão em LISS e papaína com LAMB 11

Tratamento das hemácias nas reações com LAMB 11								
Hemácias	Controle (sem tratamento)		Tratamento com Bromelina		Suspensão em LISS		Tratamento Papaína	
	TA	37°C	TA	37°C	TA	37°C	TA	37°C
1	4+ DP	3+ DP	4+ DP	4+ DP	4+	3+ DP	4+	4+ DP
2	4+ DP	3+ DP	4+ DP	4+	4+ DP	3+ DP	4+	4+ DP
3	4+ DP	4+ DP	4+ DP	4+ DP	4+	3+ DP	4+	4+
4	4+	4+ DP	4+ DP	4+ DP	4+	3+ DP	3+	4+
5	4+	4+ DP	4+ DP	4+ DP	4+	3+ DP	4+	4+
6	4+	3+ DP	4+ DP	4+ DP	4+ DP	3+ DP	4+	4+
7	4+	4+	4+ DP	4+ DP	4+	4+	3+	4+
8	4+	4+ DP	4+ DP	4+	4+	4+	4+	4+

DP: dupla população; LISS: Solução de baixa força iônica; TA: temperatura ambiente. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Os resultados mostraram que LAMB 11 possivelmente reconhece um antígeno da membrana da hemácia que não é afetado pelo tratamento enzimático, e não sofre grandes efeitos na presença de LISS.

Figura 14 - Resultados dos testes de aglutinação em coluna de LAMB 11 com hemácias sem tratamento, com tratamento enzimático e em LISS



A: Reações controle em TA e a 37°C; **B:** Reações em LISS em TA e a 37°C; **C:** Reações com papaína em TA e a 37°C; **D:** Reações com Bromelina em TA e a 37°C; LISS: Solução de baixa força iônica; PAP 3: Papaína comercial Bio-Rad; TA: temperatura ambiente. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Foram realizadas diluições de 1:256 e 1:350 do anticorpo LAMB 11 em SSI acrescida com 5% de albumina, para tentar encontrar algum padrão de aglutinação.

Utilizou-se hemácias do painel, ressuspensas em LISS a 1%, e as reações observadas mostraram, na diluição 1/256, ainda que com intensidades diferentes, que o anticorpo reconhece todas as hemácias. Já em 1/350 existem hemácias que

não aglutinaram na presença do anticorpo diluído, porém não foi possível definir nenhum padrão de especificidade através do painel. A Figura 15 traz as reações observadas.

Figura 15 - Reações com hemácias do painel em LISS e anticorpo LAMB 11 diluído



TA: Temperatura ambiente. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Unindo dados do efeito de cada enzima/solução sobre os antígenos eritrocitários, os dados fenotípicos e de tipagem das hemácias utilizadas na retestagem do SNC, onde havia a presença de hemácias RhD negativo, além dos dados fenotípicos das hemácias do painel, podemos inferir que este anticorpo possa ter uma especificidade contra um antígeno presente em todas as hemácias já testadas, podendo ser o antígeno Cellano (k) ou Kp^b, que compõem o Sistema Kell, por exemplo. Também pode ser contra algum antígeno eritrocitário de alta frequência, mas que não foi testado nas hemácias do painel, como o antígeno Vel.

O Quadro 9 traz os resultados obtidos nos testes de Ouchterlony e Dot-blot ELISA (ambos os testes realizados em outras etapas da obtenção do anticorpo LAMB 12) para o anticorpo anti-leucocitário. LAMB 12 é da classe IgG e reconhece somente células Jurkat (linfócitos T), não reconhecendo antígenos de linfócitos B.

Quadro 09 - Classe da imunoglobulina e Dot-blot ELISA para os anticorpos anti-leucocitários

NOME DO CLONE	CLASSE DA IMUNOGLOBULINA (Teste Ouchterlony)	Dot-Blot ELISA com células JURKAT (Linfócitos T) e BJAB (Linfócitos B)
		Reconhece células Jurkat
		Não reconheceu

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A linhagem de células denominada Jurkat é derivada de leucemia de linfócitos T obtida do sangue periférico de um paciente de 14 anos de idade⁵¹. Estas células são CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD6+, CD7+, CD8-, CD13-, CD19-, CD34+, TCR alfa/beta+ e TCR gama/delta-, amplamente usadas como modelo de linfócitos T humanos⁵². As células denominadas BJAB é uma linhagem de linfoma de Burkitt que expressa marcadores de linfócitos tipo B⁵³.

O *screening* por Citometria de Fluxo do clone para pesquisa de anticorpos anti-HLA classes I e II no SNC revelou que o clone produtor de anticorpos anti-leucocitários foi negativo para antígenos HLA classes I ou II, como mostra o Quadro 10.

Quadro 10 - *Screening* por Citometria de Fluxo dos clones para pesquisa de anticorpos anti-HLA classes I e II

DENOMINAÇÃO	Controles	FlowPRA I	FlowPRA II
	Controle Negativo	0,08	1,07
	Controle Positivo	51,44	99,07
LAMB 12		5,65	7,64

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

O teste de competição por Citometria de Fluxo, realizado também em estudos anteriores, revelou que as reações com LAMB 12 não foram inibidas para os antígenos CD3, CD4 e CD8. Estes resultados não permitem excluir a possibilidade do anticorpo reconhecer um epítipo diferente daquele que os anticorpos comerciais utilizados reconhecem, uma vez que a média de intensidade de fluorescência, que

indica positividade, não foi reduzida em nenhuma das cinco amostras para nenhum dos antígenos (Quadro 11).

Quadro 11 - Teste de competição por Citometria de Fluxo dos clones para os antígenos CD3, CD4 e CD8 em leucócitos

	Doador 1			Doador 2			Doador 3			Doador 4			Doador 5		
	CD3	CD4	CD8												
Controle Negativo	0,00	0,00	0,00	1,20			0,12			0,01			0,00		
CD3	27,2			67,65			66,92			73,41			63,56		
CD4	18,50			48,95			49,89			55,04			44,30		
CD8	9,04			11,64			13,88			16,32			15,82		
LAMB 12	31,21	20,06	10,27	63,99	47,52	12,67	68,59	40,07	20,77	73,53	55,66	16,21	62,46	44,80	15,52

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A concentração proteica de cada extrato membranário preparado, utilizado na técnica de *Western Blotting*, encontra-se no Quadro 12 a seguir.

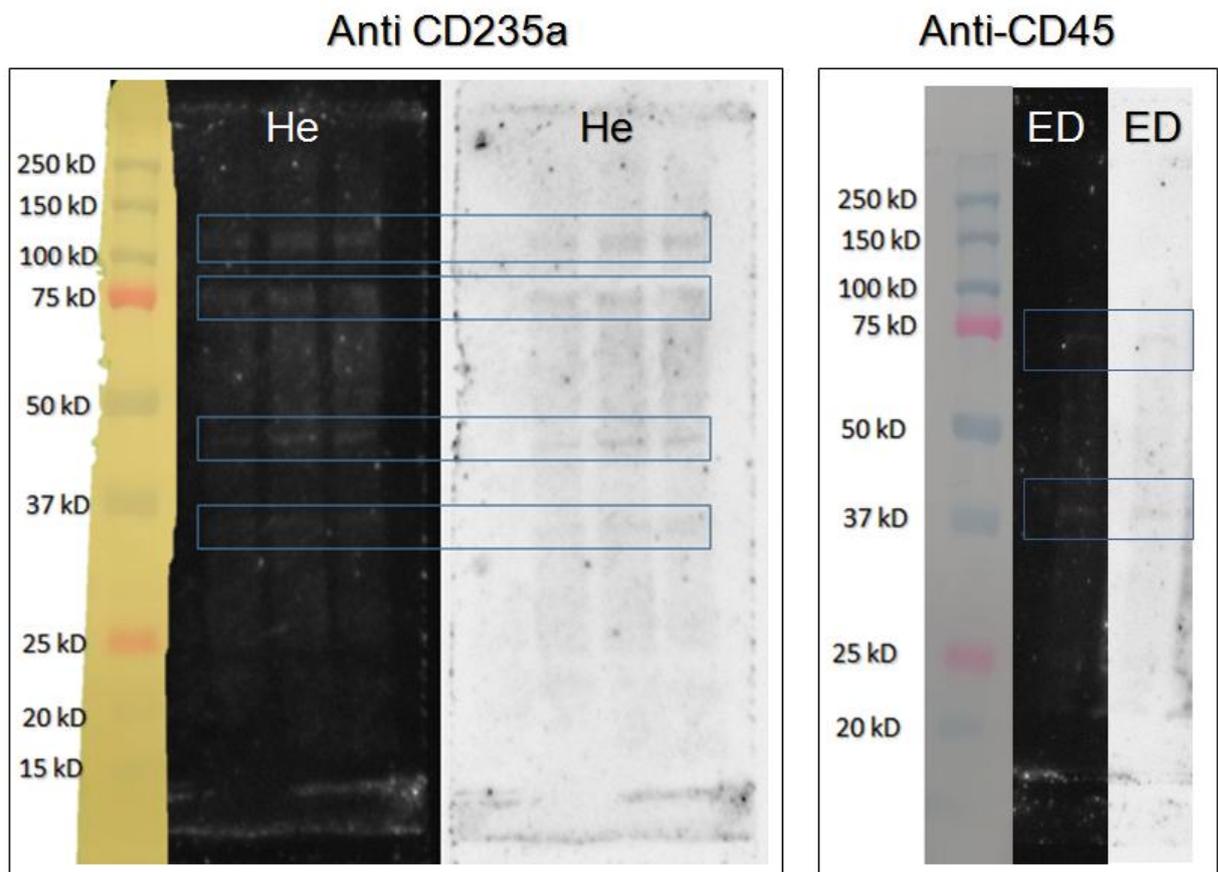
Quadro 12 - Concentração proteica dos extratos membranários

Extrato Membranário	Dosagem proteica em Nanodrop™ – 280nm
Amostra TJAS	4,5562 mg/mL
Amostra EZE	3,8425 mg/mL
Amostra ED	5,3935 mg/mL
Amostra Hemácias	12,6807 mg/mL

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Após o preparo dos extratos membranários, realizou-se a técnica de *Western Blotting* com os três anticorpos e os extratos de membrana de leucócitos e hemácias. Foi realizado o controle dos extratos membranários realizando um Blotting com anticorpos comerciais, cuja Figura 16 apresenta as reações observadas. Devido à marcação positiva para a amostra de hemácias com o anti-CD235a, e o lisado de ED com o anti-CD45, confirma-se a viabilidade dos extratos membranários preparados para esta etapa do trabalho, ou seja, os lisados estavam com as proteínas em estado de conformação que possibilitasse o reconhecimento por anticorpos

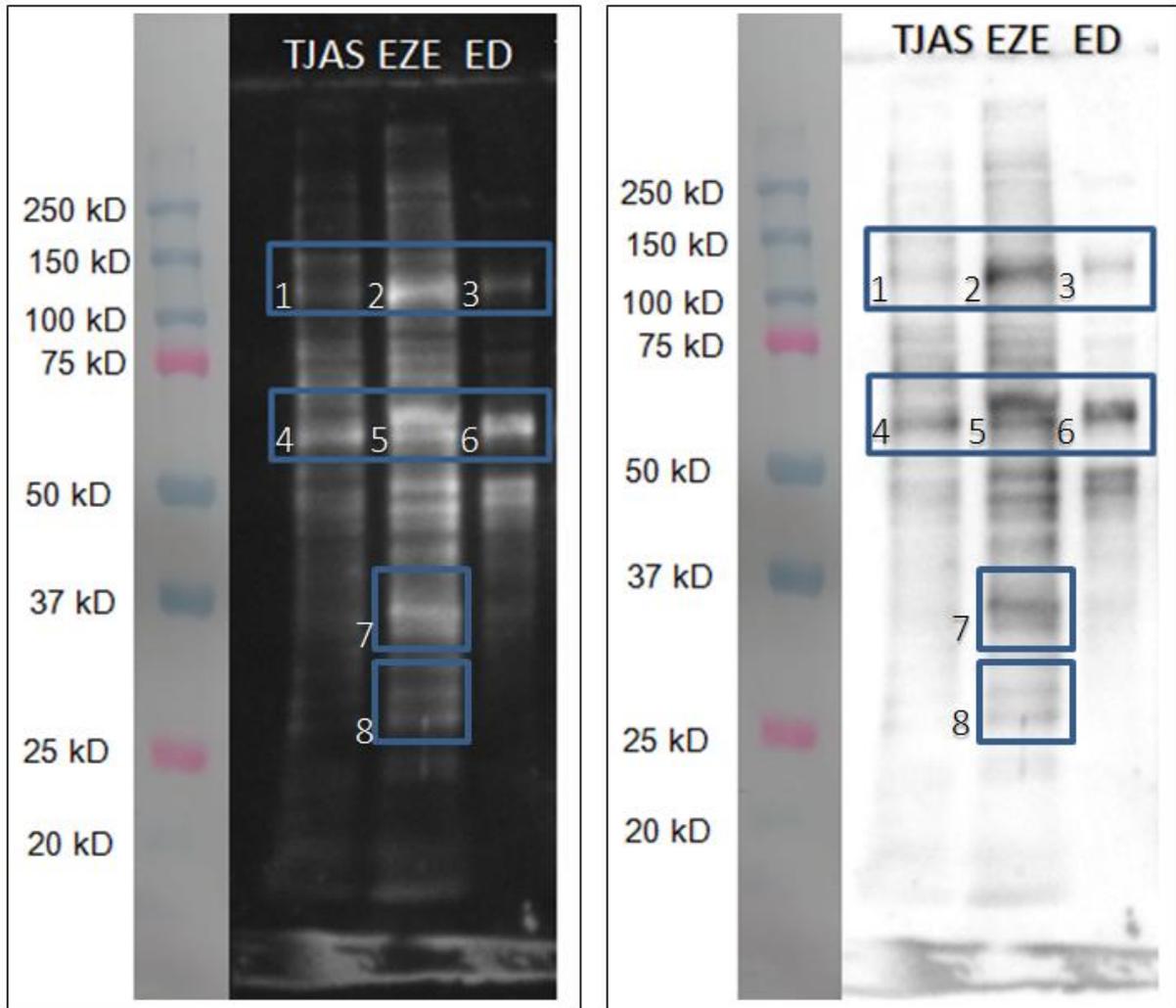
Figura 16 - Membranas incubadas com anticorpos comerciais



kD: Kilodalton; He: extrato membranário de hemácias; ED: amostra de extrato membranário de ED.
 Fonte: arquivo pessoal, 2018.

A Figura 17 traz o *Western Blotting* do anticorpo LAMB 12. As marcações mais intensas aparecem no extrato EZE, entre 50 e 75kD e entre 100 e 150kD, sugerindo especificidade para um antígeno que está expresso nas três amostras, porém com maior expressão em EZE.

Figura 17 - *Western Blotting* do anticorpo anti-leucocitário LAMB 12



kD: Kilodalton; ED: amostra de extrato membranário de ED; EZE: amostra de extrato membranário de EZE; TJAS: amostra de extrato membranário de TJAS; 1: Banda nos três lisados entre 100 e 150 kD; 2: Banda nos três lisados entre 100 e 150 kD; 3: Banda nos três lisados entre 100 e 150 kD; 4: Banda nos três lisados entre 50 e 75 kD – Mais forte; 5: Banda nos três lisados entre 50 e 75 kD – Mais forte; 6: Banda nos três lisados entre 50 e 75 kD – Mais forte; 7: Banda no lisado EZE entre 25 e 37 kD; 8: Duas bandas no lisado EZE entre 25 e 37 kD (mais próximo de 25kD). Fonte: arquivo pessoal, 2018.

A seguir é apresentado o Quadro 13, que contém informações sobre as proteínas identificadas na análise proteômica por meio da consulta à plataforma de bioinformática *Mascot*. Cada banda identificada por *Western Blotting* foi recortada e analisada separadamente. O anticorpo LAMB 12 reconhece oito bandas (enumeradas de 1 a 8), como já descrito na Figura 18. Na primeira linha do quadro é possível identificar o número de cada banda, sua descrição no gel (localização de peso molecular e, no caso do LAMB 12, a amostra de extrato membranário que foi reconhecida e recortada), valor de *score* de confiabilidade das proteínas analisadas e quantas proteínas foram identificadas em cada banda. Algumas bandas chegaram

a ter 20 proteínas identificadas. Para sintetizar os resultados, optou-se por apresentar, no quadro, apenas 5 proteínas identificadas por banda.

As cores alaranjadas nos quadros da identificação proteica destacam as proteínas que estão dentro do valor de *score* de confiabilidade, sendo estas as que foram consideradas para as análises. Não é considerado confiável estudar as proteínas que ficaram fora desses valores estabelecidos pelo *software*. O valor numérico apresentado no início da descrição de cada proteína é o valor de *score* fornecido pelo *software*, que é informado baseado na homologia da sequência de peptídeos detectada pela espectrofotometria de massas e a sequência peptídica que encontra-se depositada na base de dados do *Mascot*. Em cada quadro também são apresentados os pesos moleculares, em Dalton, para cada identificação proteica.

As análises dos resultados da proteômica realizada sugeriram que LAMB 12 reconhece, provavelmente, a proteína Mieloperoxidase (MPO), uma vez que esta é identificada em dois momentos na proteômica: Banda 5, com alto *score* de confiabilidade, cuja marcação foi intensa no lisado de EZE, e na banda 6, mesmo que esta última tenha um *score* menor que o ideal.

É possível excluir que LAMB 12 possa ter uma especificidade contra a proteína *Dolichyl-difosfoligossacarídeo - glicosiltransferase* (DDOST) devido à sua localização: membrana de retículo endoplasmático (proteína intracelular)²⁹. Esta proteína aparece na identificação das bandas 4 e 5, com alto índice de *score* de confiabilidade.

Exclui-se das análises a proteína Integrina Alfa II-B, que aparece na identificação das bandas 3 e 6 dentro do *score* de confiabilidade. Essa proteína, também conhecida como CD41, é expressa em plaquetas e megacariócitos (a Integrina Alfa IIb é uma glicoproteína de membrana plaquetária que funciona como receptor de fibrinogênio necessário para a agregação plaquetária³⁰).

Algumas proteínas que foram identificadas na análise proteômica foram excluídas das hipóteses possíveis, devido à localização celular (proteínas que se expressam intracelularmente foram excluídas dentre as possíveis candidatas). Proteínas com pesos moleculares incompatíveis com os observados no *Blotting* também foram retiradas das análises.

Quadro 13 - Análise proteômica das bandas reconhecidas pelo anticorpo LAMB 12

Banda 1 - Entre 100 e 150 kD (1 T JAS) Score > 38	Banda 2 - Entre 100 e 150 kD (1 EZE) Score > 38	Banda 3 - Entre 100 e 150 kD (1 ED) Score > 38	Banda 4 - Entre 50 e 75 kD – Mais forte (2 T JAS) Score > 38	Banda 5 - Entre 50 e 75 kD – Mais forte (2 EZE) Score > 38 20 proteínas detectadas	Banda 6 - Entre 50 e 75 kD – Mais forte (2 ED) Score > 38	Banda 7 - Entre 25 e 37 kD (3 EZE) Score > 38 17 proteínas detectadas	Banda 8 - Entre 25 e 37 kD (mais próximo de 25kD) (4 EZE) Score > 38 10 proteínas detectadas
27 - Family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member A, isoform CRA_a Massa: 124.439D	56 - Family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member A, isoform CRA_a Massa: 124.439D	585 – Integrin Alpha IIb Massa: 114.446D	203 - Dolichyl-diphosphooligosacchari de--protein glycosyltransferase subunit 1 Massa: 68.678D	399 – Myeloperoxidase Massa: 84.784D	38 - Integrin alpha-IIb variant (Fragment) Massa: 58.818D	92 - Prohibitin-2 Massa: 33.219D	113 - PHB protein (Fragment) Massa: 29.871D
25 - Lysosomal-associated membrane protein 1, isoform CRA_a Massa: 45.367 D	36 - Lysosomal-associated membrane protein 1, isoform CRA_a Massa: 45.367D	60 - THBS1 protein (Fragment) Massa: 44.885D	100 - Lamin-B1 Massa: 66.653D	132 - cDNA FLJ53009, highly similar to Calreticulin Massa: 24.443D	32 – Myeloperoxidase Massa: 84.784D	76 – Annexin Massa: 38.808D	68 - SLC25A5 protein (Fragment) Massa: 35.499D 61 - ADP/ATP translocase 3 Massa: 33.073D
22 - Alternative protein CSF2RB Massa: 11.752D	28 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220D	46 - Integrin beta (Fragment) Massa: 90.173	94 - Albumin (Fragment) Massa: 68.484D	117 - Dolichyl-diphosphooligosacchari de--protein glycosyltransferase subunit 1 Massa: 68.678D	26 - Annexin (Fragment) Massa: 76.168D	69 - Leucine-rich repeat-containing protein 59 Massa: 35.308D	44 - Ribosomal protein L7, isoform CRA_a Massa: 30.476D
21 - ATP-dependent RNA helicase A Massa: 142.181D	24 - cDNA FLJ58780, highly similar to Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), transcript variant LAMP2B, mRNA Massa: 40.186D	18 - CDC42 binding protein kinase beta (DMPK-like), isoform CRA_a Massa: 196.189D	20 - Epididymis secretory sperm binding protein Li 89n Massa: 72.402D	76 - Epididymis secretory sperm binding protein Li 89n – Massa: 72.402D 62 - cDNA FLJ38781 fis, clone LIVER2000216, highly similar to HEAT SHOCK COGNATE 71 kDa PROTEIN Massa: 68.166D	22 - Dolichyl-diphosphooligosacchari de--protein glycosyltransferase subunit 1 Massa: 65.968D	68 - Sperm binding protein 1 ^a Massa: 30.868D	41 - Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase Massa: 30.456D
21 - DNA topoisomerase II, beta isozyme variant (Fragment) Massa: 114.163D	19 - cDNA FLJ61177, highly similar to Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinasetype-1 gamma (EC 2.7.1.68) Massa: 70.427D		19 - Calreticulin, isoform CRA_b Massa: 48.283D	67 - cDNA, FLJ95666, highly similar to Homo sapiens albumin (ALB), mRNA Massa: 71.343D	20 - cDNA, FLJ95666, highly similar to Homo sapiens albumin (ALB), mRNA Massa: 71.343D	46 - HCG15971, isoform CRA_a Massa: 42.052D	29 - Sperm binding protein 1 ^a Massa: 30.868D

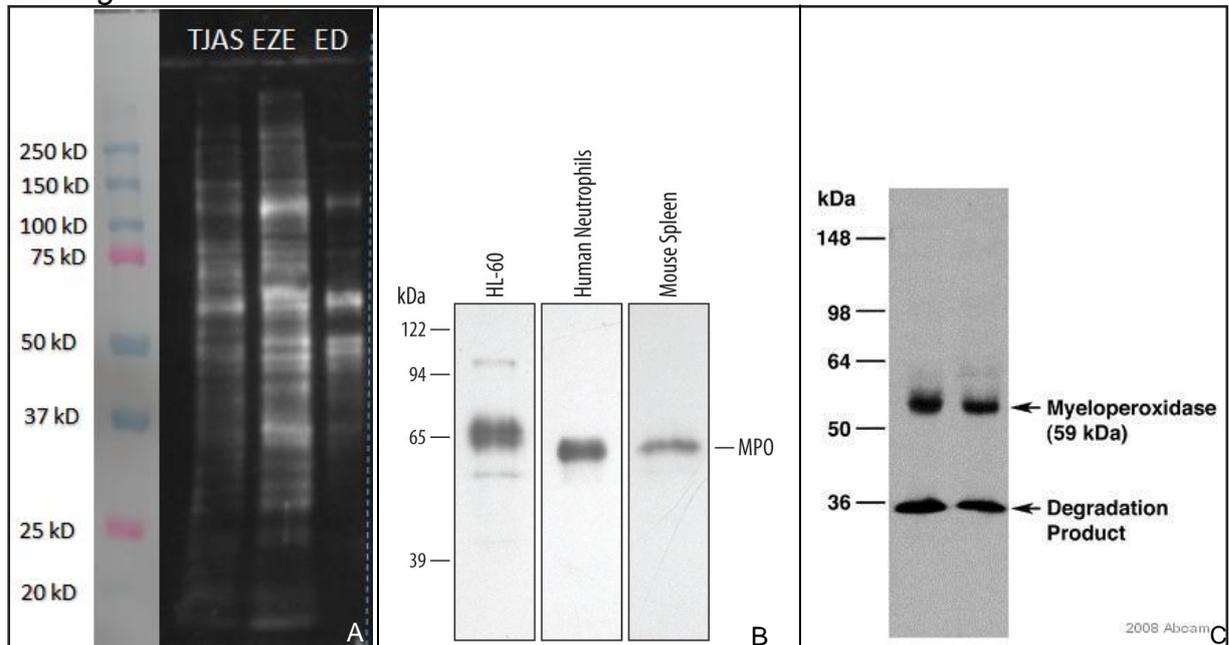
Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Partindo-se dos resultados dos estudos anteriores para LAMB 12 (reconhecimento de linfócitos T, não reconhecimento de CD3, CD4, CD8, HLA-I e HLA-II), e unido-os aos resultados da técnica de *Western Blotting* e da proteômica, assumiu-se que LAMB 12 possa ter uma especificidade contra MPO. Será apresentada a seguir uma breve revisão sobre esta proteína, e realizou-se um levantamento de *Blottings* de anticorpos monoclonais comerciais anti-MPO para comparar com o *Blotting* de LAMB 12, cuja discussão está apresentada na sequência.

A mieloperoxidase (MPO) é uma proteína expressa principalmente em neutrófilos, monócitos e macrófagos e participa do sistema de defesa do hospedeiro de leucócitos polimorfonucleares, como na atividade antimicrobiana^{31,32}. Nestas células estimuladas, a MPO catalisa a produção de ácido hipocloroso, além de outros intermediários tóxicos, que aumentam a atividade antimicrobiana de leucócitos polimorfonucleares^{33,34}. Um transtorno caracterizado pela diminuição da atividade da mieloperoxidase em neutrófilos e monócitos resulta em candidíase disseminada e outras complicações infecciosas^{31,32,33,34}.

Em *Blottings* de anticorpos comerciais anti-MPO é possível observar uma semelhança com o *Blotting* de LAMB 12 realizado neste estudo. A comparação entre os diferentes *Blottings* está apresentada na Figura 18.

Figura 18 - Comparativo entre *Blottings* de anticorpos anti-Mieloperoxidase e o *Blotting* de LAMB 12



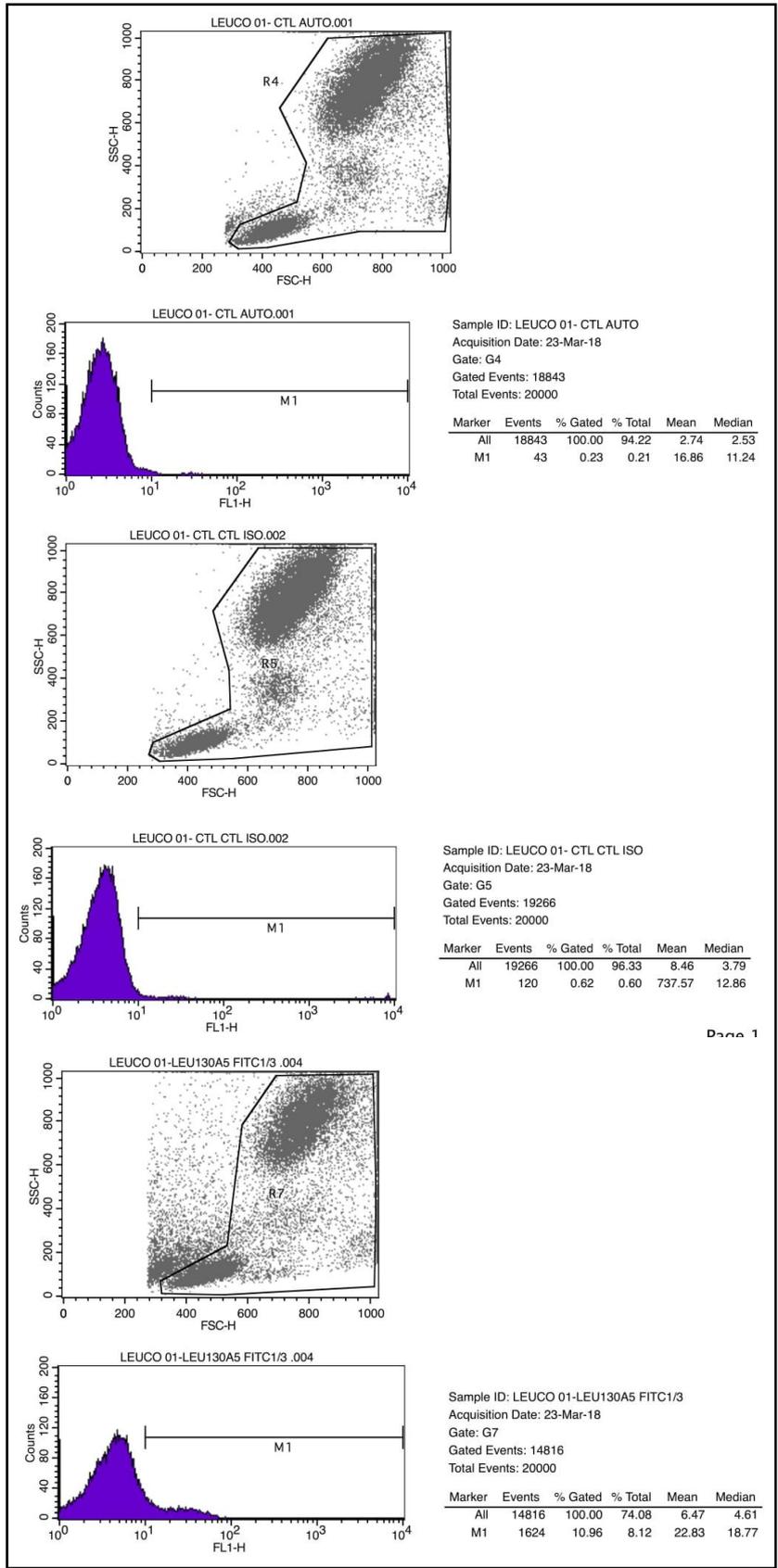
A: *Blotting* de LAMB 12; **B:** *Blotting* de anti-MPO da empresa Novus Biologicals®; **C:** *Blotting* de anti-MPO da empresa Abcam®. Fonte: https://www.novusbio.com/products/myeloperoxidase-mpo-antibody_af3667; http://a.abcam.com/ps/products/25/ab25989/reviews/images/ab25989_9687.jpg.

É possível observar, na Figura 18-B, que na primeira pista do *Blotting* foi corrido um lisado de uma linhagem de células de leucemia promielocítica aguda (HL-60 - ATCC) incubado com o anticorpo comercial anti-MPO da Novus®, o que é comparável à corrida do lisado de TJAS e EZE, ambas leucemias mielóides agudas. As bandas marcadas da Figura 18-B, portanto, são semelhantes às bandas de LAMB 12 em EZE e TJAS, especialmente as bandas entre 50 e 75kD, e a banda de maior peso molecular (entre 100 e 150kD), que é comparável à banda acima de 94kD do lisado de HL-60.

No lisado ED incubado com LAMB 12, onde estão presentes antígenos de leucócitos normais, pode-se considerar a banda entre 50 e 75kD semelhante às bandas observadas nas Figuras 18-B e 18-C, que apresentam peso molecular próximo de 50 kDa.

Na sequência dos ensaios foram realizados testes em Citometria de Fluxo, que são apresentados a seguir. A Figura 19 apresenta um dos controles realizados para o teste em Citometria de Fluxo (Amostra 1 de leucócitos). Não houve reação inespecífica do anticorpo secundário utilizado anti-IgG FITC. Os controles para as Amostras 2 e 3 se apresentaram semelhantes à Amostra 1.

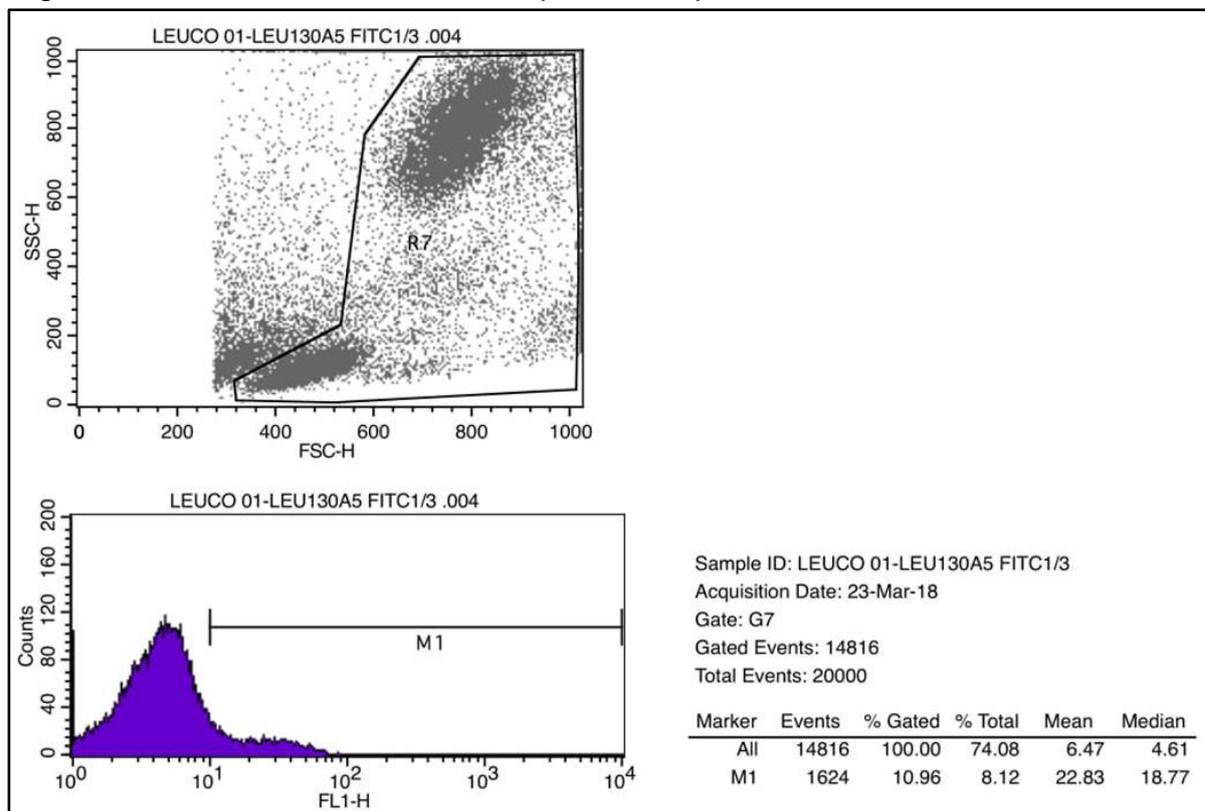
Figura 19 - Controles dos ensaios de Citometria de Fluxo utilizando Amostra 1 de leucócitos



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A Figura 20 traz o perfil do teste em citometria de fluxo na Amostra 1 de leucócitos e o padrão de positividade nos leucócitos totais. Os testes com a Amostra 1 revelaram que o anticorpo LAMB 12 apresenta 10,96% de positividade para leucócitos totais. Um padrão semelhante pode ser observado na amostra 2, com 9,69% de positividade para leucócitos totais. Na amostra 3 os valores de média de intensidade de fluorescência foram diferentes das anteriores, mas o mesmo padrão foi observado, com 4,56% de positividade para leucócitos totais.

Figura 20 - Amostra 1 e LAMB 12 e o padrão de positividade nos leucócitos totais



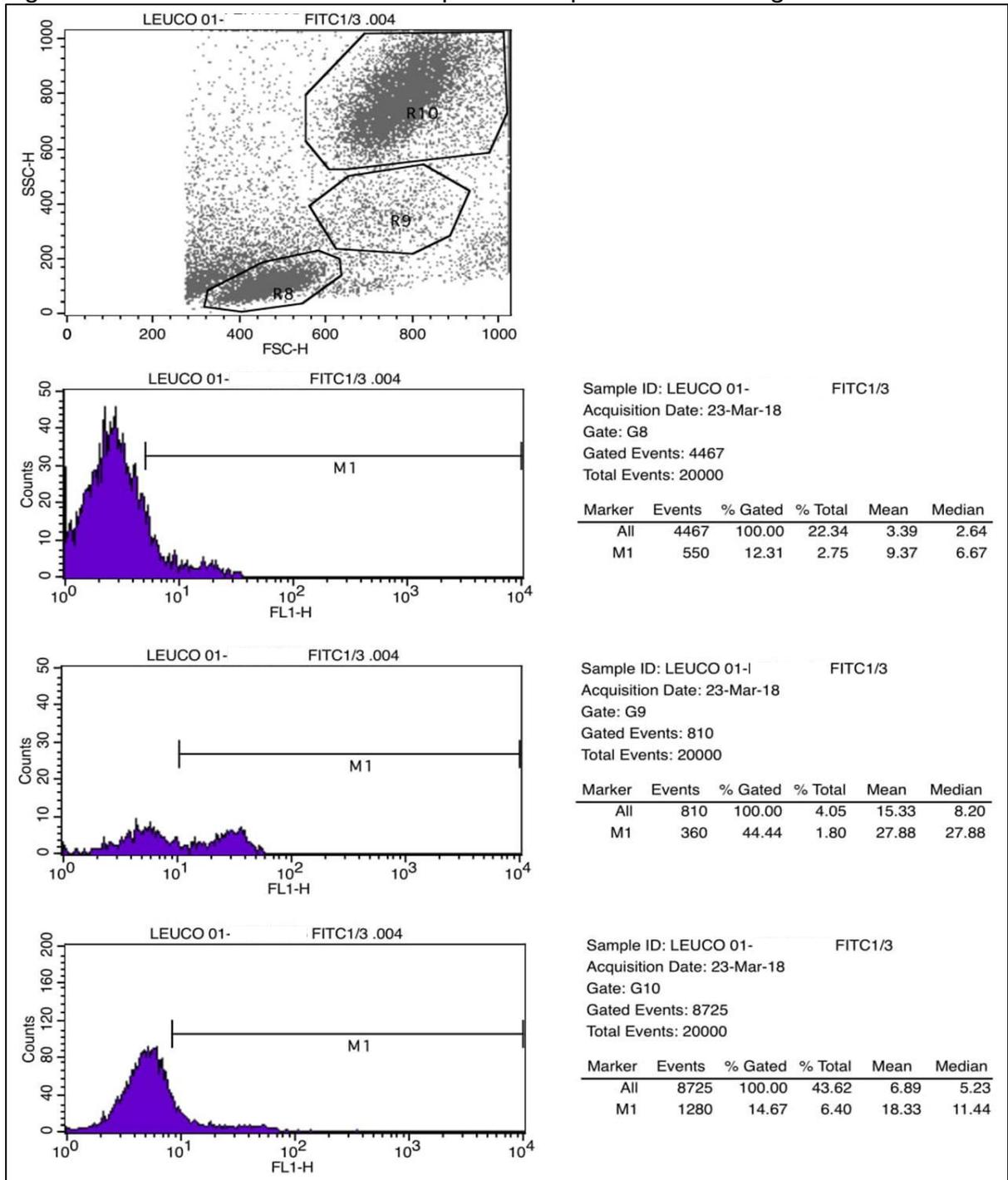
Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A Figura 21 traz o perfil do teste na amostra de leucócitos I e o padrão de positividade nos diferentes subtipos de leucócitos, separados nos *gates* por tamanho e granulosidade: linfócitos (Figura 21 - *Gate*: G8), monócitos (Figura 21 - *Gate*: G9) e granulócitos (Figura 21 - *Gate*: G10).

Na Amostra 1, foi observado uma média de 12,31% de positividade em linfócitos, 44,44% em monócitos e 14,67% em granulócitos. Na Amostra observou-se 22,06% de positividade para linfócitos, 43,23% para monócitos e 9,27% para

granulócitos. A média de intensidade de fluorescência foi menor na Amostra 3, com 3,65% de positividade em linfócitos, 40,54% em monócitos e 13,08% em granulócitos, mas o perfil maior em monócitos se repetiu. Em suma, sempre a positividade maior é em monócitos, indicando uma especificidade para um antígeno que se expressa mais em monócitos do que em outros leucócitos.

Figura 21 - Amostra I e LAMB 12 e o padrão de positividade nos *gates* de leucócitos



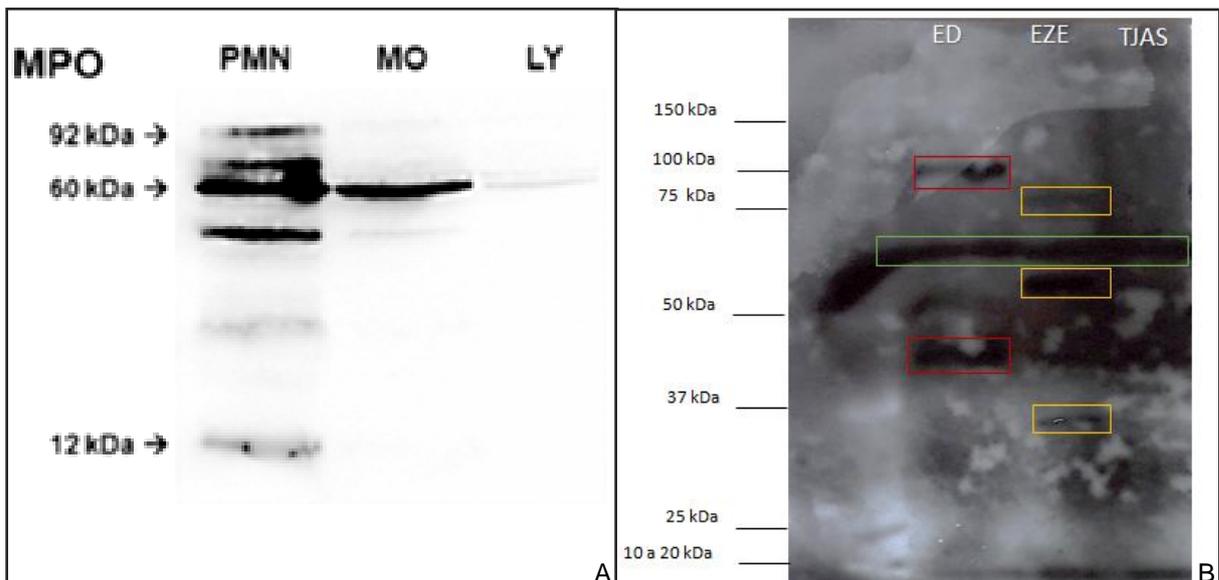
Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Esses resultados corroboram a hipótese de que LAMB 12 é um possível Anti-Mieloperoxidase, uma vez que essa proteína está expressa em leucócitos, especialmente monócitos e macrófagos^{32,34}.

Um estudo realizado em 2015 revelou a expressão da proteína MPO por *Western Blotting* em extratos de células polimorfonucleares (PMN), monócitos (MO) e linfócitos (Ly), apresentado na Figura 22. As células PMN apresentaram uma banda forte em 60 kDa relacionada à cadeia pesada de MPO e uma banda de 12 kDa, relacionada à sua cadeia leve, além de uma banda de 92 kDa, relacionada a um precursor da MPO. Em monócitos e linfócitos a MPO apresentou-se em uma banda de 60 kDa (cadeia pesada)³⁵.

O mesmo padrão foi observado no Blotting de LAMB 12, com a banda próximo a 60 kD mais forte nos três lisados (ED, EZE e TJAS), nos quais há leucócitos globais. Em outro *Blotting* de LAMB 12, realizado com outra técnica de revelação da membrana (filme), mostra um padrão bastante semelhante ao encontrado no estudo de Okada e colaboradores³⁵, o que mais uma vez confirma um perfil de anti-MPO para LAMB 12.

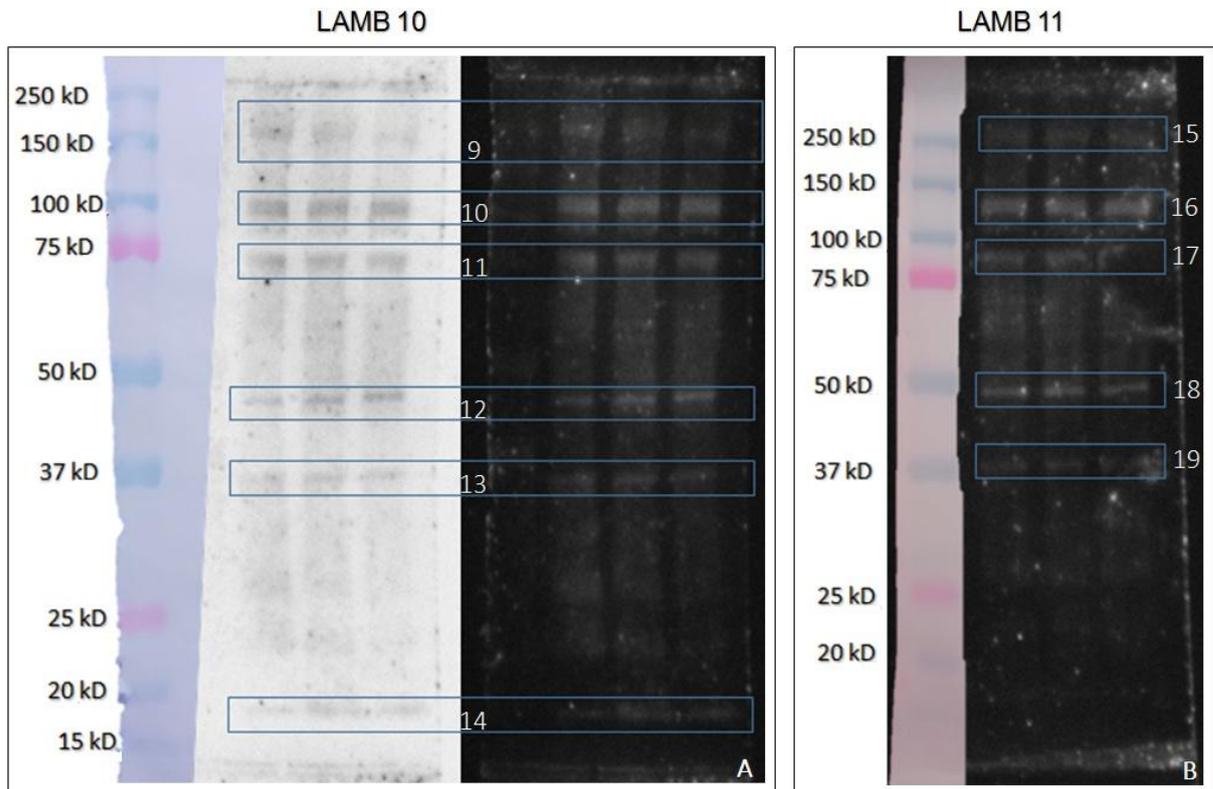
Figura 22 - Estudo sobre a expressão da proteína MPO por *Western Blotting* em extratos de células polimorfonucleares (PMN), monócitos e linfócitos



A: Estudo de Okada e colaboradores; **B:** *Blotting* de LAMB 12 com revelação em filme. Fonte: A: Okada SS, de Oliveira EM, de Araújo TH, Rodrigues MR, Albuquerque RC, Mortara RA, Taniwaki NN, Nakaya HI, Campa A, Moreno AC. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: Production and subcellular localization. *Cell Immunol.* 2016 Fev;300: 18-25; B: Arquivo pessoal, 2018.

A Figura 23 traz o *Western Blotting* apresentando as bandas reconhecidas pelo anticorpo LAMB 10 (Figura 23 - A) e por LAMB 11 (Figura 23 - B). Ambos os anticorpos apresentam um perfil de reconhecimento proteico semelhante, ou seja, reconhecem bandas que possuem pesos moleculares semelhantes entre si. A marcação mais expressiva se dá em torno de 100kDa.

Figura 23 - *Western Blotting* dos anticorpos anti-eritrocitários



A: Bandas reconhecidas por LAMB 10; **9:** Banda logo acima de 150 kD; **10:** Banda logo abaixo de 100 kD; **11:** Banda logo abaixo de 75 kD; **12:** Banda entre 37 e 50 kD (mais próxima de 50 kD); **13:** Banda entre 25 e 37 kD (mais próxima de 37 kD); **14:** Banda entre 15 e 20 kD; **D:** Bandas reconhecidas por LAMB 11; **15:** Banda logo acima de 250 kD; **16:** Banda entre 100 e 150 kD (mais forte); **17:** Banda entre 75 e 100 kD; **18:** Banda entre 37 e 50 kD (mais próxima de 50 kD); **19:** Banda entre 37 e 50 kD (mais próxima de 37 kD); kD - Kilodalton. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

O Quadro 14 a seguir apresenta a análise proteômica das seis bandas reconhecidas por LAMB 10. Algumas proteínas que foram identificadas na análise proteômica foram excluídas das hipóteses possíveis, devido à localização celular (proteínas que se expressam intracelularmente foram excluídas dentre as possíveis candidatas). Proteínas com pesos moleculares incompatíveis com os observados no *Blotting* também foram retiradas das análises.

Quadro 14 - Análise proteômica das bandas proteicas reconhecidas pelo anticorpo LAMB 10

Banda 9 - Banda logo acima de 150 kD Score > 38	Banda 10- Banda logo abaixo de 100 kD Score > 37	Banda 11 - Banda logo abaixo de 75 kD Score > 38	Banda 12 - Banda entre 37 e 50 kD (mais próximo de 50 kD) Score > 38 7 proteínas detectadas	Banda 13 - Banda entre 25 e 37 kD (mais próxima de 37 kD) Score > 37	Banda 14 - Banda entre 15 e 20 kD Score > 38
139 - Ankyrin-1 Massa: 207.334 D	72 - Epididymis luminal protein 220 Massa: 89.950 D	51 - Truncated beta-globin Massa: 7.051 D	67 - Beta-globin Massa: 16.101 D	88 - Delta-aminolevulinic acid dehydratase Massa: 37.718 D	135 - Beta-globin Massa: 16.101 D
41 - Spectrin beta chain Massa: 268.560 D	33 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.534 D	31 - cDNA FLJ38781 fis, clone LIVER2000216, highly similar to HEAT SHOCK COGNATE 71 kDa PROTEIN Massa: 68.166 D	41 - Testis secretory sperm-binding protein Li 233m Massa: 41.477 D	55 - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Massa: 36.201 D	70 - Mutant hemoglobin alpha 2 globin chain Massa: 15.305 D
40 - Spectrin, alpha, erythrocytic 1 (Elliptocytosis 2), isoform CRA_c Massa: 178.906 D	19 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D	32 - N-acetylaminoacyl-peptide hydrolase, isoform CRA_b Massa: 82.142 D	41 - Rab GDP dissociation inhibitor Massa: 51.577 D	42 - Glycophorin-C Massa: 13.802 D	24 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D
32 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.534 D		25 - EPB41 protein (Fragment) Massa: 83.618 D	37 - Dematin Massa: 45.600 D	36 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.554 D	18 - Alternative protein POLK Massa: - 6.598 D
27 - Mutant hemoglobin alpha 2 globin chain Massa: 15.305 D			32 - Kinesin-like protein Massa: 77.118 D	29 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D	

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

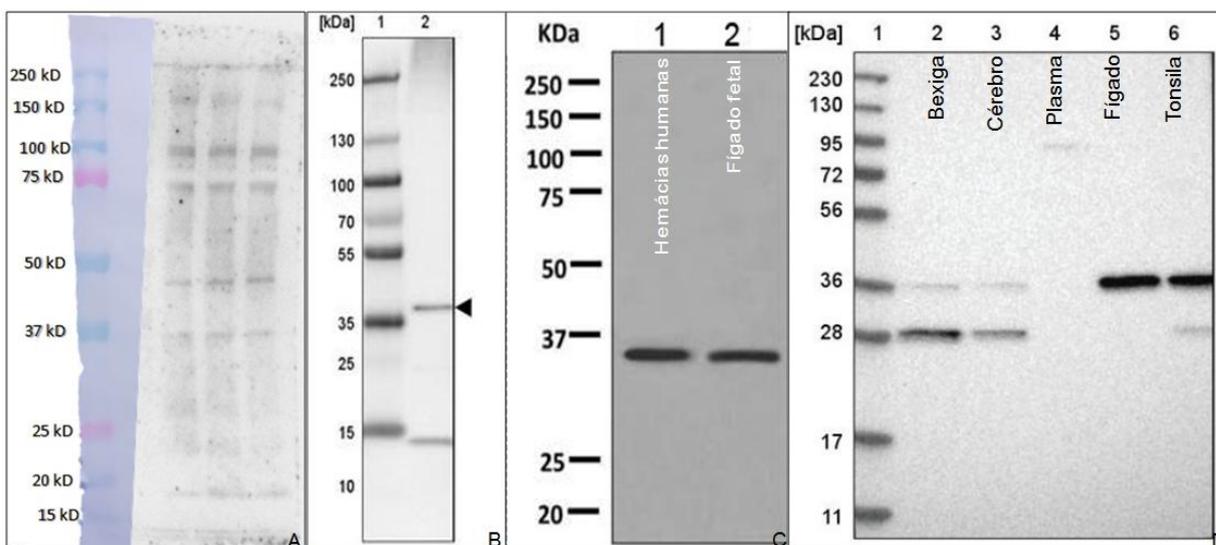
A avaliação dos resultados do conjunto de técnicas revelou que o anticorpo anti-eritrocitário LAMB 10 pode ter especificidade contra as proteínas Ácido delta amino-levulínico desidratase (ALAD) ou Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD) ou, ainda, Glicoforina C (GPC). Será apresentada a seguir uma breve revisão sobre a ALAD, G3PD e GPC. Realizou-se um levantamento de *Blottings* de anticorpos monoclonais comerciais anti-ALAD, anti-G3PD e anti-GPC para comparar com o *Blotting* de LAMB 10, cuja discussão está apresentada na sequência.

A proteína ácido delta amino-levulínico desidratase, também conhecida como ALAD, catalisa um passo inicial na biossíntese de tetrapirrol ou porfirina (anel orgânico heterocíclico que contém um átomo de ferro, constituinte do grupo HEME)^{36,37,38}. Liga-se ao zinco e tem relação com a doença genética hereditária conhecida como porfiria hepática^{36,37,38}. As porfirias são defeitos recessivos na biossíntese do grupo heme, resultando no acúmulo e aumento da excreção de porfirinas ou seus precursores. As porfirias podem ser eritropoiéticas ou hepáticas, dependendo se a deficiência enzimática ocorre nos glóbulos vermelhos ou no fígado. Caracteriza-se por apresentar distúrbios gastrointestinais, cólicas abdominais, paralisias e neuropatia periférica e pode se manifestar em pessoas usuárias de drogas e álcool, dietas restritivas de alta privação calórica, infecções ou fatores endócrinos^{36,37,38}.

A comparação entre os diferentes *Blottings* comerciais e o de LAMB 10 está apresentada na Figura 24. No *Blotting* do anticorpo comercial anti-ALAD da Novus Biologicals® (Figura 24-B) é possível observar uma semelhança com o *Blotting* de LAMB 10 realizado neste estudo apenas nas bandas que correspondem aos pesos moleculares próximos de 36kD e abaixo de 20kD.

Também é possível observar, nas Figuras 24-C e D que as bandas de 36kDa se repetem, e esta corresponde ao *Blotting* de LAMB (Figura 24-A).

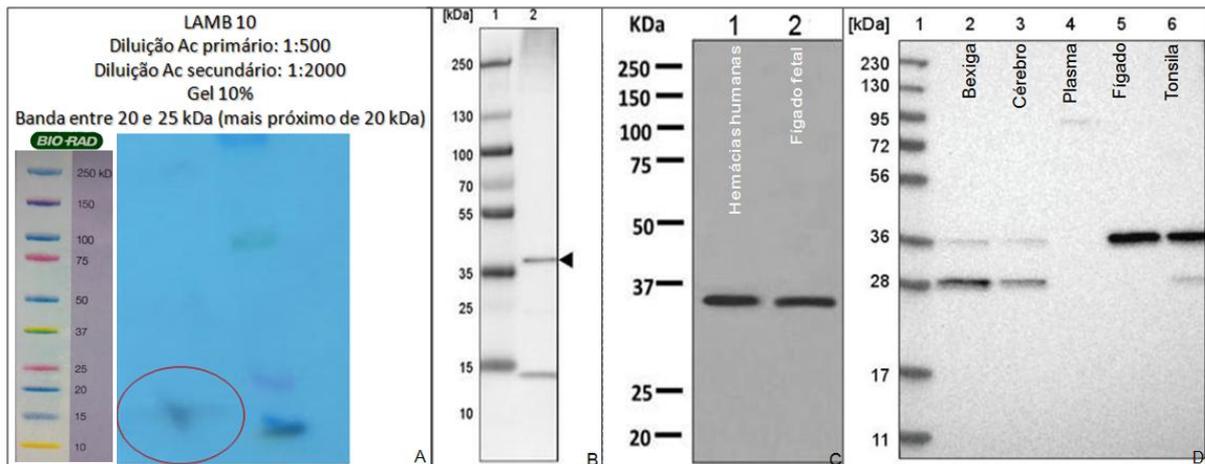
Figura 24 - Comparativo entre *Blottings* de anticorpos anti-ALAD e o *Blotting* de LAMB 10



A: *Blotting* de LAMB 10; **B:** *Blotting* de anti-ALAD da Novus Biologicals[®]; **C:** *Blotting* de anti-ALAD da Abcam[®]; **D:** *Blotting* de anti-ALAD da Sigma-Aldrich[®]. Fonte: Arquivo Pessoal, 2018; https://www.novusbio.com/products/alad-antibody_nbp1-89158; <http://www.abcam.com/alad-antibody-epr10269b-ab151697.html>; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/hpa022124?lang=pt®ion=BR>

Em outro *Blotting* realizado com LAMB 10, mais concentrado do que no teste anteriormente apresentado, e com técnica de revelação distinta (filme fotográfico), em comparação aos *blottings* de Anti-ALAD, pode-se observar uma semelhança entre as bandas de baixo peso molecular dos anticorpos comerciais e a banda reconhecida por LAMB 10. Ainda que se apresente com fraca intensidade na revelação, é possível observar uma banda reconhecida (entre 20 e 25 kDa (mais próxima de 20kDa)), o que pode ser equivalente às bandas reconhecidas por anti-ALAD comerciais (Figura 25).

Figura 25 - LAMB 10 comparativo com anticorpos comerciais anti-ALAD

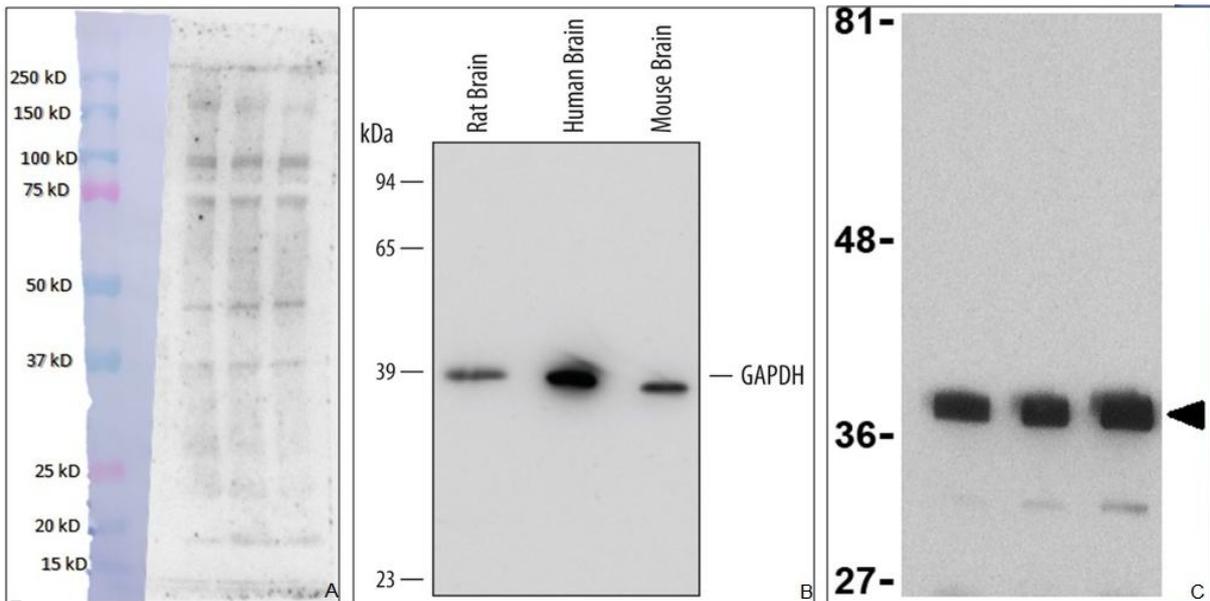


A: *Blotting* de LAMB 10, com marcação dos pesos moleculares; **B:** *Blotting* de anti-ALAD da Novus Biologicals®; **C:** *Blotting* de anti-ALAD da Abcam®; **D:** *Blotting* de anti-ALAD da Sigma-Aldrich®. Fonte: Arquivo Pessoal, 2018; https://www.novusbio.com/products/alad-antibody_nbp1-89158; <http://www.abcam.com/alad-antibody-epr10269b-ab151697.html>; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/hpa022124?lang=pt®ion=BR>.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PD) de glóbulos vermelhos, segunda proteína possível de ser candidata à especificidade de LAMB 10, é uma enzima glicolítica normalmente inibida por ligação à proteína de membrana Banda 3, mas ativa quando livre no citosol^{39,40}. O bloqueio parcial da glicólise induzido pelo estresse pode ser desempenhado pela enzima G3PD, que faz conversões e gera produtos que mantêm a hemoglobina em seu estado funcional^{39,40}. A G3PD é extremamente sensível a radicais oxidativos. Por isso, em concentrados de hemácias estocados, estudos já mostraram ser a G3PD um marcador de hemólise nas lesões de estocagem, juntamente com a ALAD e outras enzimas metabólicas e antioxidantes^{39,40}. Deficiência de G3PD tem sido descrita, desde estudos mais antigos, em associação com anemias hemolíticas⁴⁰.

A comparação entre os diferentes *Blottings* comerciais anti-G3PD e o de LAMB 10 está apresentada na Figura 26. Nos *Blottings* dos anticorpos comerciais anti-G3PD da Novus Biologicals® e Abcam® (Figuras 26-B e 26-C) é possível observar uma semelhança com o *Blotting* de LAMB 10 realizado neste estudo apenas na banda que corresponde ao peso molecular próximo de 36kD.

Figura 26 - Comparativo entre *Blottings* de anticorpos anti-G3PD e o *Blotting* de LAMB 10

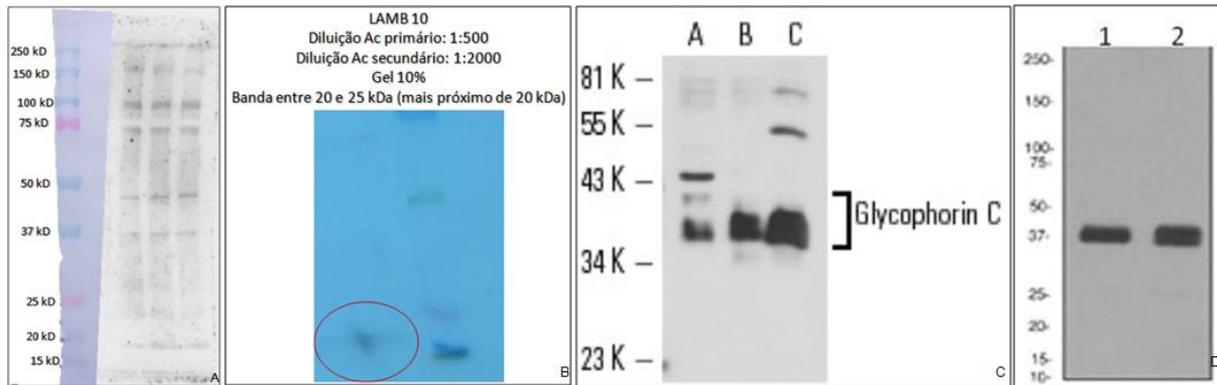


A: *Blotting* de LAMB 10; **B:** *Blotting* de anti-G3PD da Novus Biologicals®; **C:** *Blotting* de anti-G3PD da Abcam®; Fonte: A - Arquivo Pessoal, 2018; B - https://www.novusbio.com/products/gapdh-antibody_af5718; C - http://www.abcam.com/gapdh-antibody-ab37168.html#description_images_1.

A Glicoforina C (GPC) é uma pequena sialoglicoproteína presente nas membranas dos glóbulos vermelhos. Os antígenos do grupo sanguíneo Gerbich estão ancorados a esta proteína, e a GPC, juntamente com as Glicoforinas A e B, é receptora para os merozoítas do *Plasmodium falciparum*⁵⁴. A GPC desempenha um papel importante na regulação da estabilidade das hemácias⁵⁴. As Glicoforinas C e D estão ligadas à proteína conhecida como Banda 4.1 e, juntamente com a Banda 3, associadas ao citoesqueleto, mantêm a forma e as propriedades mecânicas das hemácias na passagem pelos vasos sanguíneos⁵⁵. Deficiência completa de GPC e Glicoforina D são acompanhadas de eliptocitose hereditária³.

A Figura 27 apresenta um comparativo entre *Blottings* de anticorpos comerciais anti-GPC e o *Blotting* de LAMB 10. Observa-se que a GPC representa uma proteína em torno de 35kDa, que pode ser pareada com a banda abaixo de 37kDa reconhecida por LAMB 10 (Figura 27-A).

Figura 27 - Comparativo entre *Blottings* de anticorpos anti-GPC e o *Blotting* de LAMB 10



A e B: *Blotting* de LAMB 10; C: *Blotting* de anti-GPC da Santa Cruz®; D: *Blotting* de anti-GPC da Santa Cruz®; *Blotting* de anti-GPC da Abcam®; <http://a.abcam.com/ps/products/108/ab108619/Images/Glycophorin-C-Primary-antibodies-ab108619-1.jpg>; Fonte: <https://media.scbt.com/product/01/63/b/16366.jpg>.

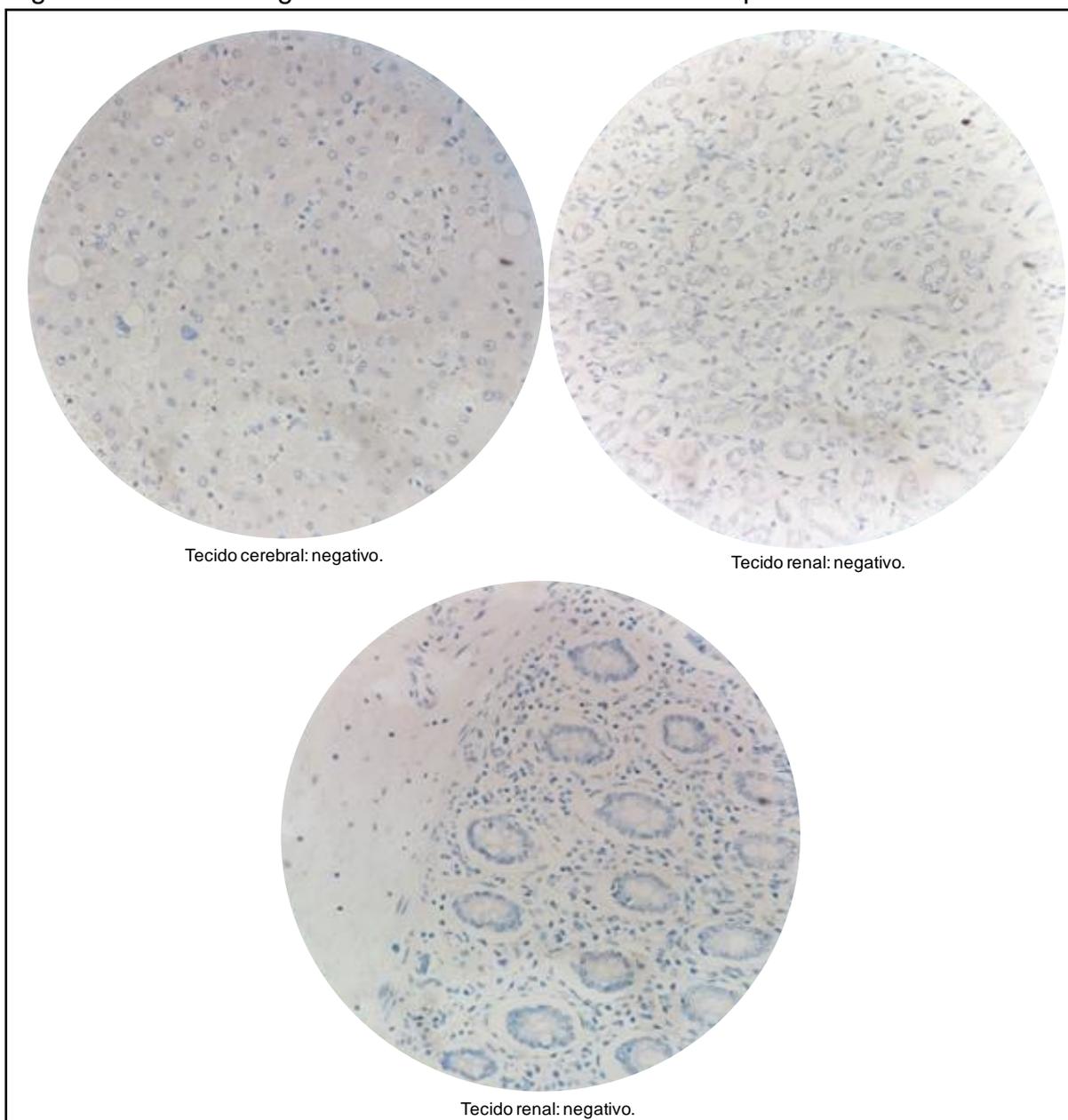
Em um estudo realizado por Pasini e colaboradores⁴¹ sobre análise do proteoma citosólico e membranário de hemácias utilizando a Espectrometria de Massas, os autores encontraram as mesmas proteínas que neste estudo foi possível encontrar. No entanto, muitas glicoproteínas de grupos sanguíneos, ancoradas às membranas, não foram detectadas, como observado no presente estudo para a glicoproteína N, do grupo MNS, cujo padrão é observado nos testes imuno-hematológicos de LAMB 10. Isso pode justificar a não identificação do antígeno N nas análises proteômicas. Pelas possibilidades da proteômica e comparativo entre os *Blottings*, foram mantidas as hipóteses para anti-ALAD, anti-G3PD e anti-GPC.

Para verificar o padrão de reatividade e tentar limitar a uma possibilidade de especificidade, foi proposto realizar imuno-histoquímica com o anticorpo LAMB 10. Separou-se cortes histológicos de fígado, rim e cólon, pois a G3PD, ubiqüitária, se expressa nesses três tecidos, mas a ALAD e a GPC se expressam somente em fígado⁴².

Os testes mostraram-se negativos em cortes histológicos de fígado, rim e cólon, até mesmo nas hemácias presentes nos vasos sanguíneos de cada tecido. Como se tratou do segundo ensaio com imuno-histoquímica utilizando este anticorpo, em diluições diferentes (1:100, 1:50 e puro), o qual tem forte reatividade em técnicas de hemaglutinação e um inequívoco reconhecimento, de forma específica para hemácias, em Citometria de Fluxo (que será apresentado adiante),

conclui-se que este anticorpo, por questões peculiares a ele, não tem reatividade na técnica de imuno-histoquímica, e mantiveram-se as três possibilidades para a especificidade de LAMB 10: Anti-ALAD, Anti-G3PD ou Anti-GPC. As fotomicrografias abaixo (Figura 28) apresentam as reações negativas observadas.

Figura 28 - Fotomicrografias de LAMB 10 em imuno-histoquímica



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

O Quadro 15 a seguir apresenta a análise proteômica das bandas reconhecidas por LAMB 11.

Quadro 15 - Análise proteômica das bandas proteicas reconhecidas pelo anticorpo LAMB 11

Banda 15 - Banda logo acima de 250 kD Score > 38 9 proteínas detectadas	Banda 16 - . Banda entre 100 e 150 kD (mais forte) Score > 37 5 proteínas detectadas	Banda 17 – Banda entre 75 e 100 kD Score > 37 6 proteína detectadas	Banda 18 - Banda entre 37 e 50 kD (mais próximo de 50 kD) Score > 38	Banda 19 - Banda entre 37 e 50 kD (mais próxima de 37 kD) Score > 37
1010 - Spectrin beta chain, erythrocytic Massa: 247.171 D	145 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.534 D	32 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.534 D	69 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.534 D	155 - Delta-aminolevulinic acid dehydratase Massa: 37.718 D
372 - Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 Massa: 281.089 D	48 - ADD2 protein (Fragment) Massa: 79.239 D	30 - Epididymis luminal protein 220 Massa: 89.950 D	64 - Testis secretory sperm-binding protein Li 233m Massa: 41.477 D	71 - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Massa: 28.024 D
301 - Ankyrin-1 Massa: 207.334 D	46 - Ankyrin-1 Massa: 207.334 D	21 – Glycophorin A Massa: 16.175 D	47 - Rab GDP dissociation inhibitor Massa: 51.577 D	32 - Beta globin (Fragment) Massa: 11.534 D
45 - Beta-globin Massa: 16.101 D	25 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D	20 - Heat shock protein 90kDa alpha (Cytosolic), class B member 1, isoform CRA_a Massa: 83.554 D	41 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D	23 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D
30 - T-cell receptor alpha joining 56 (Fragment) Massa: 2.220 D	15 - Mutant Apo B 100 Massa: 490.939 D		16 - Cytochrome P450 2C8 Massa: 48.383 D	22 - Band 3 anion transport protein Massa: 60.897 D
22 – Mutant hemoglobin alpha 2 globin chain Massa: 15.305 D				

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

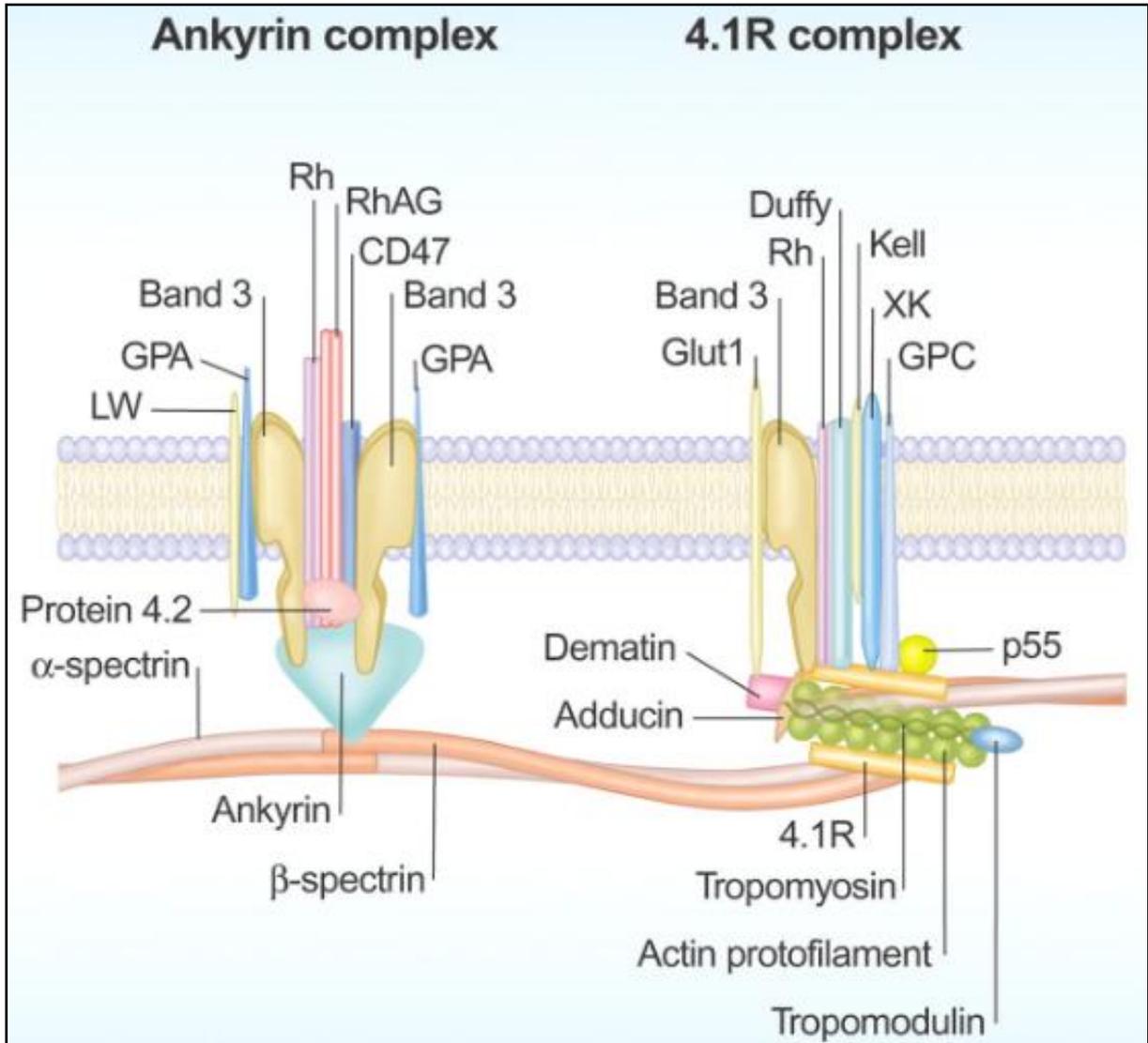
A avaliação dos resultados do conjunto de técnicas revelou que o anticorpo anti-eritrocitário LAMB 11 pode ter especificidade contra Espectrina Beta-1 Eritrocítica, ou ser um anti-Aducina Beta e, pela similaridade do Western Blotting e proteômica com LAMB 10, ser um anti-G3PD ou Anti-ALAD. Será apresentada a seguir uma breve revisão sobre a Espectrina Beta-1 Eritrocítica e sobre a Aducina Beta, e realizou-se um levantamento de *Blottings* de anticorpos monoclonais comerciais anti-Espectrina Beta-1 Eritrocítica e anti-Aducina Beta para comparar com o *Blotting* de LAMB 11, cuja discussão está apresentada na sequência.

A espectrina é o principal constituinte da rede do citoesqueleto subjacente à membrana plasmática dos eritrócitos, associando-se à banda 4.1 e à actina⁴³. Este complexo é ancorado à face citoplasmática da membrana por meio de outra proteína, a anquirina, que se liga à espectrina beta e permite a interação com outro complexo transmembranário conhecido como Banda 3^{44,45} (Figura 29). Essas interações proteicas são responsáveis pela manutenção da forma bicôncava das hemácias humanas, pela regulação dos componentes da membrana plasmática e pela manutenção da assimetria lipídica da membrana^{44,45}. A deficiência de espectrinas na membrana dos eritrócitos leva a quadros anêmicos chamados de eliptocitose e esferocitose, nos quais as hemácias do portador possuem formatos elípticos ou esféricos, respectivamente^{43,44,45}.

A aducina beta, ou ADD2, é uma proteína associada ao citoesqueleto de membrana que promove a montagem da rede espectrina-actina e tem estreita ligação com a dematina^{46,47}. Fornece uma ligação entre o citoesqueleto de espectrina e a membrana plasmática, desempenhando um importante papel na manutenção da forma das hemácias e na estabilidade da membrana^{46,47}. O transportador de glicose-1 (GLUT1) é um dos receptores que se liga tanto a dematina e a ADD2 em eritrócitos humanos^{46,47}. A Figura 29 traz uma representação esquemática da membrana das hemácias, que é uma estrutura complexa composta de moléculas lipídicas anfífilas que se ancoram a uma rede elástica bidimensional de proteínas esqueléticas por meio de locais de ancoragem (proteínas transmembrana) embutidos na bicamada lipídica, entre elas a anquirina, a aducina e a espectrina⁴⁸.

A expressão de aducina alfa e aducina gama é ubiquitária, ao contrário da expressão restrita de ADD2, que se expressa em altos níveis no cérebro e em tecidos hematopoiéticos, como a medula óssea e em baço nos camundongos^{46,47}.

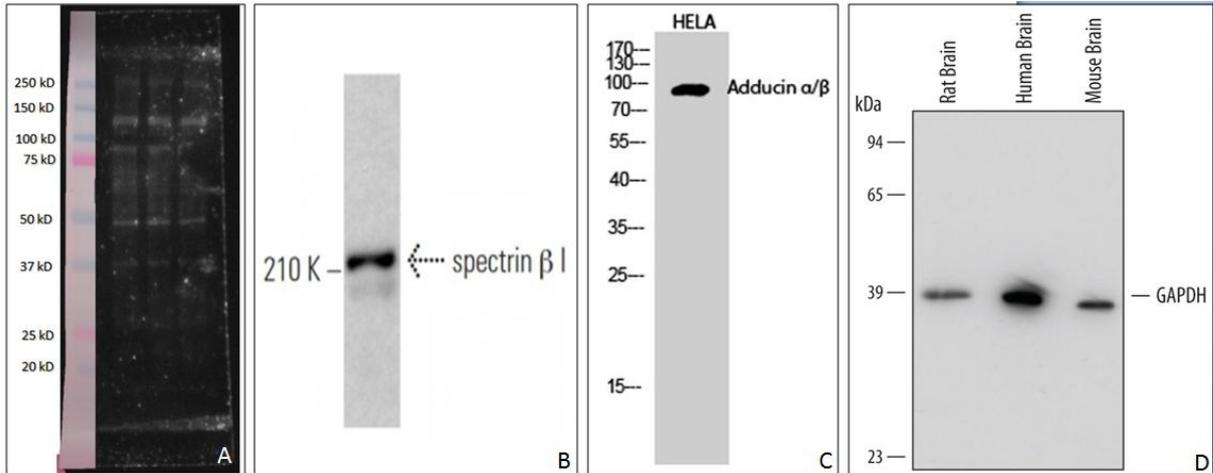
Figura 29 - Representação esquemática da membrana das hemácias, com destaque para a Aducina, Glut1, Anquirina e espectrina β



Fonte: Low PS, 2009⁴⁸.

A Figura 30 apresenta o comparativo dos anticorpos comerciais anti-Espectrina β 1 e anti-Aducina com LAMB 11. Essas especificidades de anticorpos são menos disponíveis comercialmente (a espectrina é uma proteína que pode ser eritrocítica e não eritrocítica, e a maioria dos anticorpos comerciais disponíveis para consulta são os não-eritrocíticos). É possível observar que a banda em torno de 250kD reconhecida por LAMB 11 pode ser equivalente à banda de 210 kD do anticorpo anti-espectrina. E a banda entre 75 e 100 kD de LAMB 11 é equivalente à banda próximo de 100 kD do anti-aducina. A banda em torno de 37kDa reconhecida por LAMB 11 é semelhante à banda de 39 kDa do Anti-G3PD comercial.

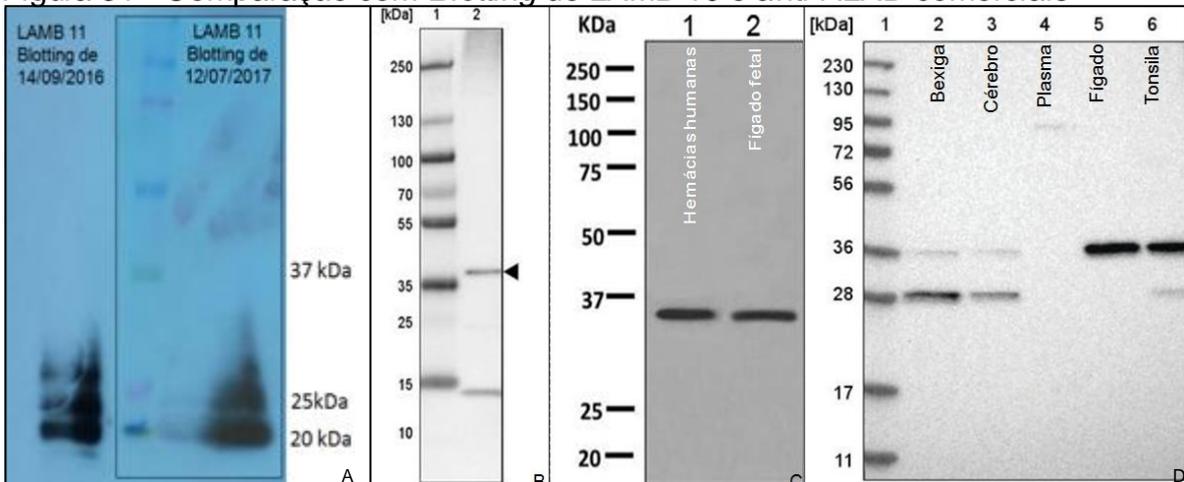
Figura 30 - Comparativo entre o *Blotting* de LAMB 11 e *Blottings* de anticorpos anti-Espectrina β , anti-Aducina e anti-G3PD comerciais



A: *Blotting* de LAMB 11; B: *Blotting* de anti-espectrina β -1 da Santa Cruz BiotechnologyTM; C: *Blotting* de anti-Aducina α/β comercial da My Bio Source; D: *Blotting* de Anti-G3PD comercial da Novus Biologicals[®]. Fonte: A - Arquivo pessoal, 2018; B - <https://www.scbt.com/scbt/product/spectrin-beta-i-antibody-b-2>; C - https://www.mybiosource.com/prods/Antibody/Polyclonal/Adducin-alpha-beta/datasheet.php?products_id=2538932; D - https://www.novusbio.com/products/gapdh-antibody_af5718.

Em outro *Blotting* de LAMB 11, revelado em técnica diferente (filme fotográfico), o anticorpo LAMB 11 se assemelha bem às bandas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais comerciais disponíveis. Bandas de baixo peso molecular (entre 20 e 37kDa) são comuns entre os diferentes *blottings* apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Comparação com *Blotting* de LAMB 10 e anti-ALAD comerciais



A: *Blotting* de LAMB 10; B: *Blotting* de anti-ALAD da Novus Biologicals[®]; C: *Blotting* de anti-ALAD da Abcam[®]; D: *Blotting* de anti-ALAD da Sigma-Aldrich[®]. Fonte: Arquivo Pessoal, 2018; https://www.novusbio.com/products/alad-antibody_nbp1-89158; <http://www.abcam.com/alad-antibody-epr10269b-ab151697.html>; <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/hpa022124?lang=pt®ion=BR>

O conjunto de dados e comparações não permite excluir nenhuma das especificidades, mantendo-se as quatro hipóteses: anti-ALAD, anti-ADD2, anti-Espectrina β 1 e anti-G3PD.

Para verificar o padrão de reatividade e tentar limitar a uma possibilidade de especificidade, foi proposto realizar imuno-histoquímica com o anticorpo LAMB 11. Separou-se cortes histológicos de fígado, rim e cólon, pois a G3PD, ubiqüitária, se expressa nesses três tecidos, mas a ALAD se expressa somente em fígado⁴². Também foram separados cortes de cérebro, músculo e pulmão.

Os testes mostraram um perfil de positividade e negatividade distinta entre os diferentes cortes histológicos, que será apresentado no Quadro 16. Utilizou-se a diluição 1:100 para o anticorpo LAMB 11.

Destaca-se desta técnica que LAMB 11 tem funcionalidade em Imuno-histoquímica, uma vez que reconhece as hemácias presentes em todas as amostras. Foi positivo, na maioria das situações, para células endoteliais. Também apresentou reconhecimento de células do epitélio bronqueolar e alveolar respiratório.

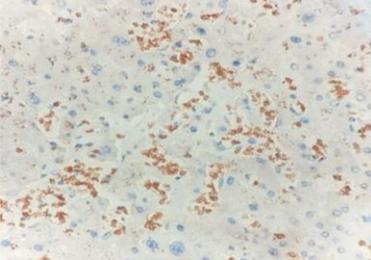
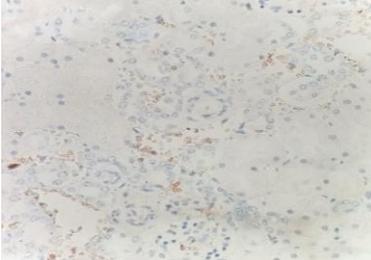
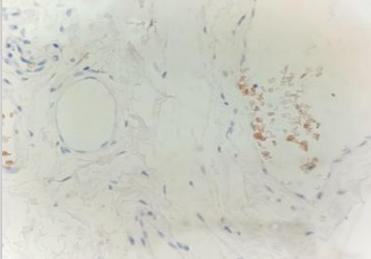
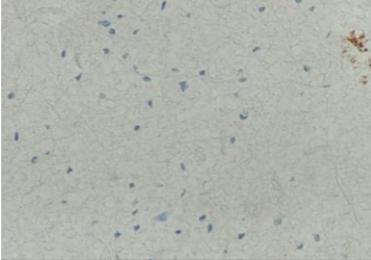
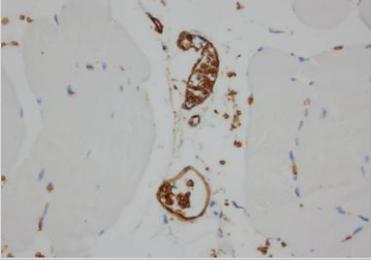
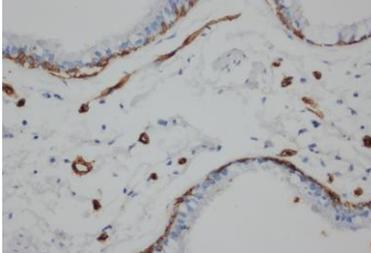
Neste perfil, é possível que LAMB 11 tenha especificidade contra CD36. A Figura 32 traz uma adaptação do Manual de marcadores celulares humanos da BD Biosciences[®]. Na figura é possível observar que o CD36 é um marcador positivo para hemácias, células endoteliais e células-tronco/precursoras, além de células dendríticas, macrófagos e plaquetas. Neste estudo verificou-se a positividade de LAMB 11 para hemácias e endotélio vascular, como mostram os resultados até aqui expostos e os resultados da imuno-histoquímica apresentados no Quadro 17.

Figura 32 - Molécula CD36 e sua expressão em diferentes células

CD	Alternative Name	Ligands & Associated Molecules	T Cell	B Cell	Dendritic Cell	NK Cell	Stem Cell/Precursor	Macrophage/Monocyte	Granulocyte	Platelet	Erythrocyte	Endothelial Cell	Epithelial Cell	Function
CD36	Platelet glycoprotein 4, Glycoprotein IIIb (GpIIIb), Glycoprotein IV (GPiV), PASiV, Fatty acid translocase (FAT), SCARB3, GP88	Thrombospondin, Collagen I, IV, V, Long-chain fatty acids	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	Cell adhesion, cholesterol transport, scavenger receptor

Fonte: Adaptado de https://www.bdbiosciences.com/documents/cd_marker_handbook.pdf.

Quadro 16 - Imuno-histoquímica de LAMB 11

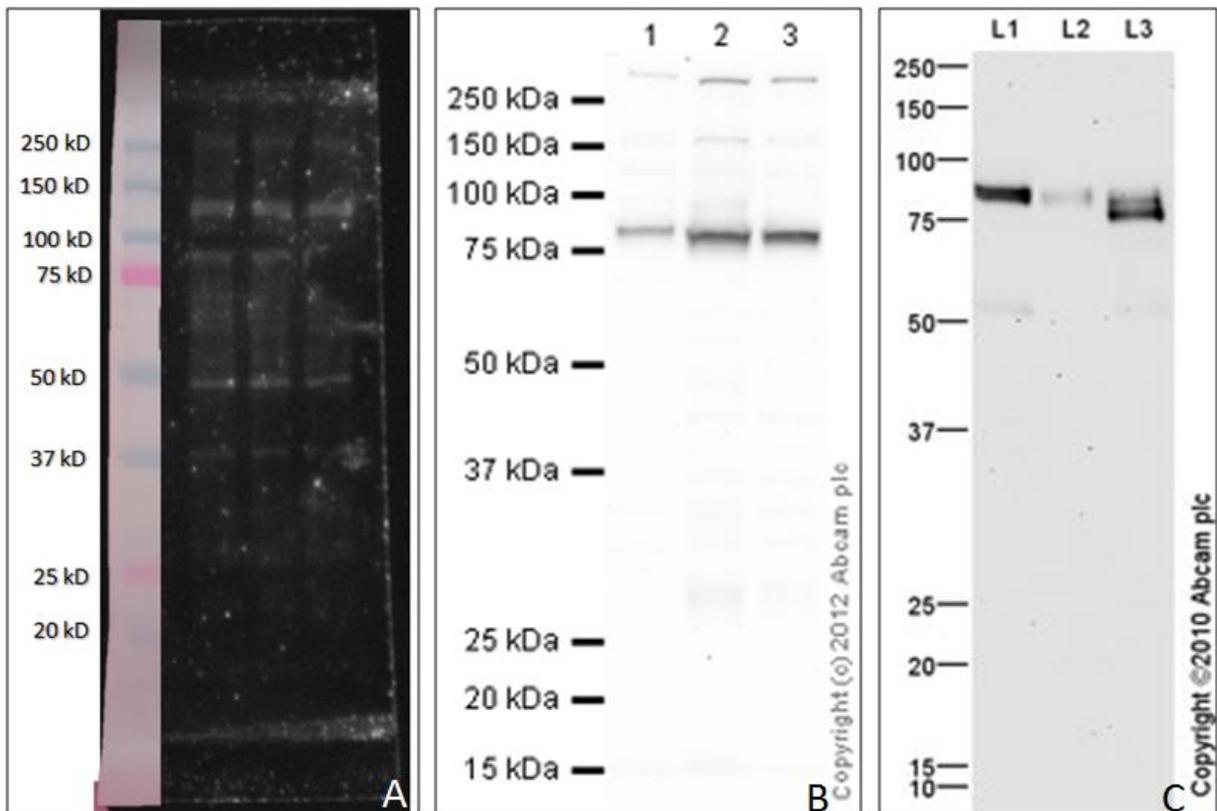
Tecido	Padrão	Fotomicrografias
Fígado	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo em hemácias intrasinusoidais; ▪ Não reconhece linfócitos, hepatócitos e células endoteliais 	
Rim	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo em hemácias; ▪ Positivo em parede de endotélio (citoplasma de endotélio de vênulas); ▪ Endotélio de vasos maiores positivo; ▪ Endotélio de arteríolas negativo; ▪ Parênquima renal negativo; ▪ Glomérulo renal negativo. 	
Cólon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo em hemácias; ▪ Linfócitos negativos; ▪ Endotélio negativo; ▪ Parênquima negativo. 	
Cérebro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo em hemácias; ▪ Positivo em endotélio de capilares; ▪ Neurônios e células ilhais negativas (parênquima cerebral). 	
Músculo Esquelético	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo em hemácias; ▪ Positivo em endotélio de alguns vasos; ▪ Fibras musculares negativas. 	
Pulmão	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Positivo em hemácias; ▪ Corou epitélio bronquiolar respiratório (células basais); ▪ Cílios negativos; ▪ Células colunais negativas; ▪ Endotélio de vasos positivo; ▪ Positivo em células do epitélio alveolar; 	

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A proteína CD36 participa da hematopoiese precoce, é expressa em hemácias, reticulócitos, células progenitoras hematopoiéticas e no endotélio de pequenos vasos de uma variedade de tecidos^{56,57}. Esse padrão foi observado nos testes que LAMB 11 reconheceu endotélio em diferentes vasos.

A Figura 33 a seguir apresenta o comparativo de *Blottings* de anti-CD36 comerciais. Nota-se que a banda próximo de 100kDa de LAMB 11 é semelhante à banda de mesmo peso molecular dos anticorpos comerciais. Também é possível observar, na Figura 33 - B, bandas em torno de 150kDa, que são comparáveis à banda abaixo de 150kDa de LAMB 11 (Figura 33 - A).

Figura 33 - Comparativo de *Blottings* de anti-CD36 comerciais e LAMB 11



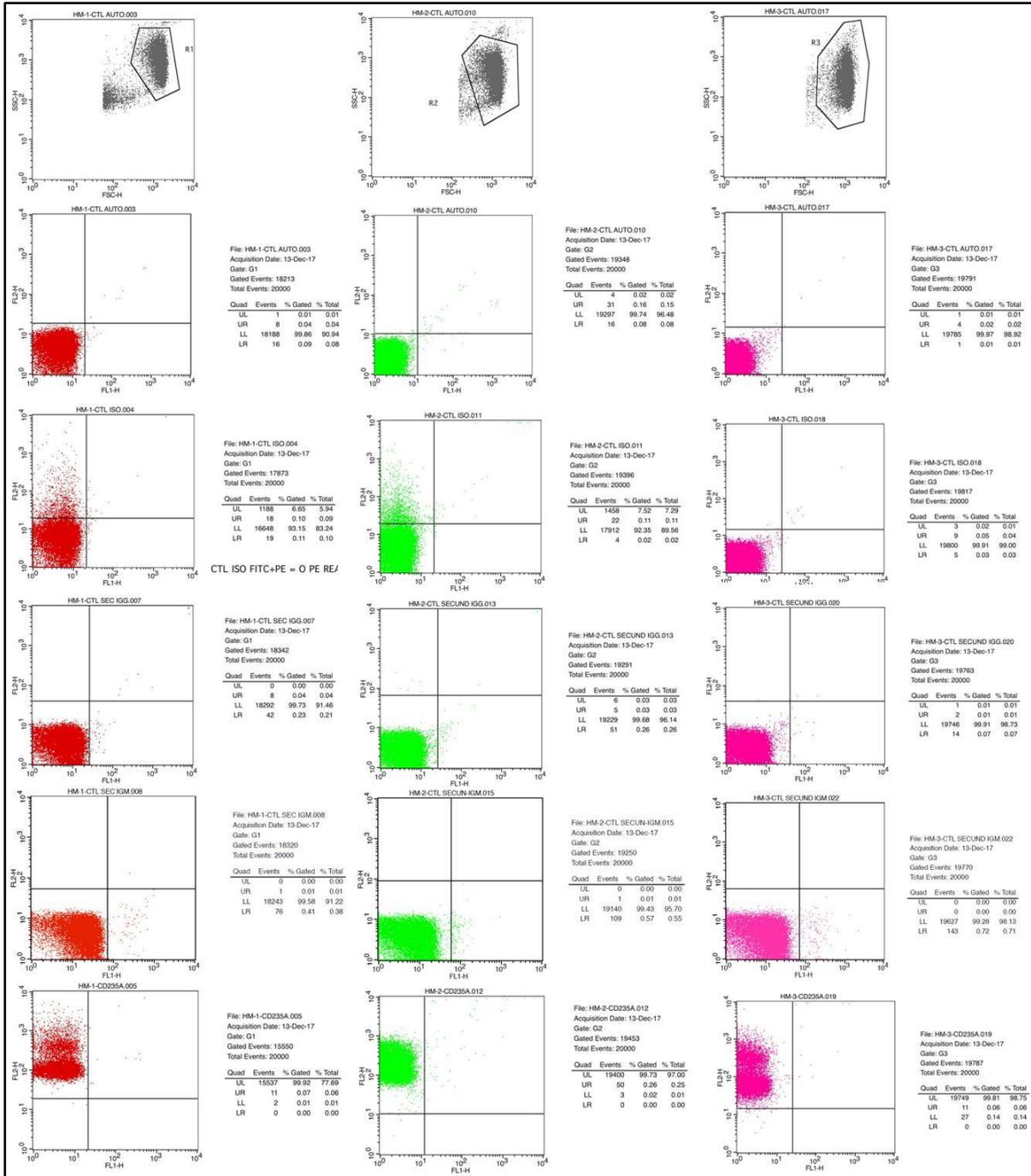
A: Blotting de LAMB 11; **B e C:** Blottings de anti-CD36 comerciais da Abcam®. Fonte: **A** - Arquivo pessoal, 2018; **B** - http://www.abcam.com/cd36-antibody-ab124515.html#description_images_2; **C** - http://www.abcam.com/cd36-antibody-ab64014.html#description_images_1.

Portanto, LAMB 11 e anti-CD36 mostram-se com perfil semelhante, o que faz incluir o CD36 dentre as possibilidades de especificidade para este anticorpo.

A Figura 34 apresenta os controles dos testes com hemácias I, II e III em citometria de fluxo. O controle isotípico PE reagiu inespecificamente, o que foi

corrigido nas análises.

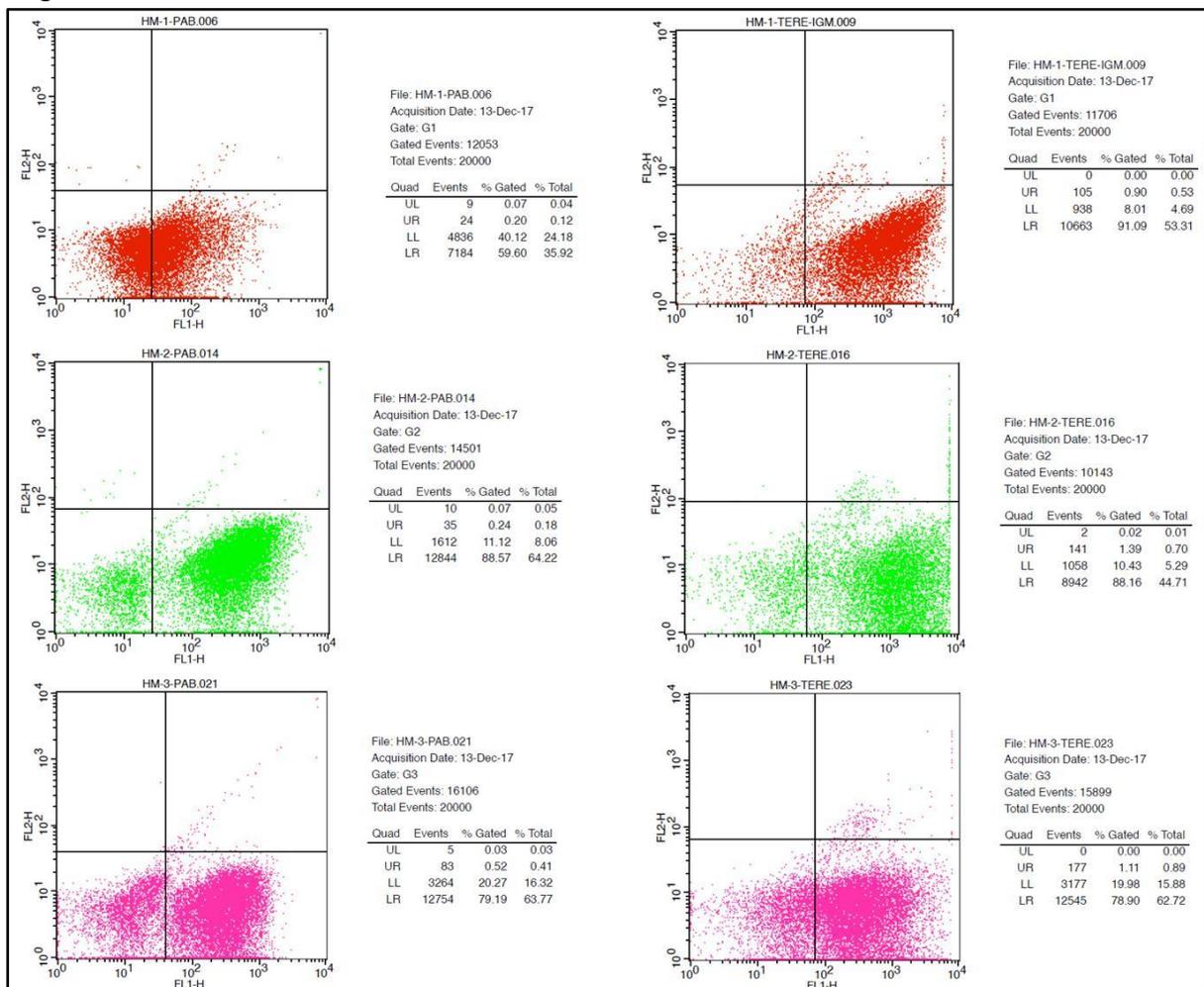
Figura 34 - Controles dos ensaios de Citometria de Fluxo utilizando três diferentes amostras de hemácias



Em linha, de cima para baixo: desenho dos *gates* de hemácias, controle de auto-fluorescência, isotípicos PE e FITC, controle do anticorpo secundário IgG e IgM e controle com anticorpo comercial anti-CD235a; Em cor vermelha: Amostra 1 - hemácias; Em cor verde: Amostra 2 - hemácias; Em cor magenta: Amostra 3 - hemácias. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Os testes com LAMB 10 e LAMB 11 em citometria de fluxo mostraram positividade específica para hemácias, e bom desempenho dos anticorpos nesta técnica. LAMB 10 reconhece 59,6% da amostra 1 de hemácias, e LAMB 11, 91,09%. Para a amostra 2, LAMB 10 reconhece 88,57%, e LAMB 11, 88,16%. Na amostra 3, LAMB 10 apresentou 79,19% de positividade, e LAMB 11, 78,9%. A Figura 35 traz os histogramas das análises em hemácias.

Figura 35 - Testes com LAMB 10 e LAMB 11 e hemácias em Citometria de Fluxo

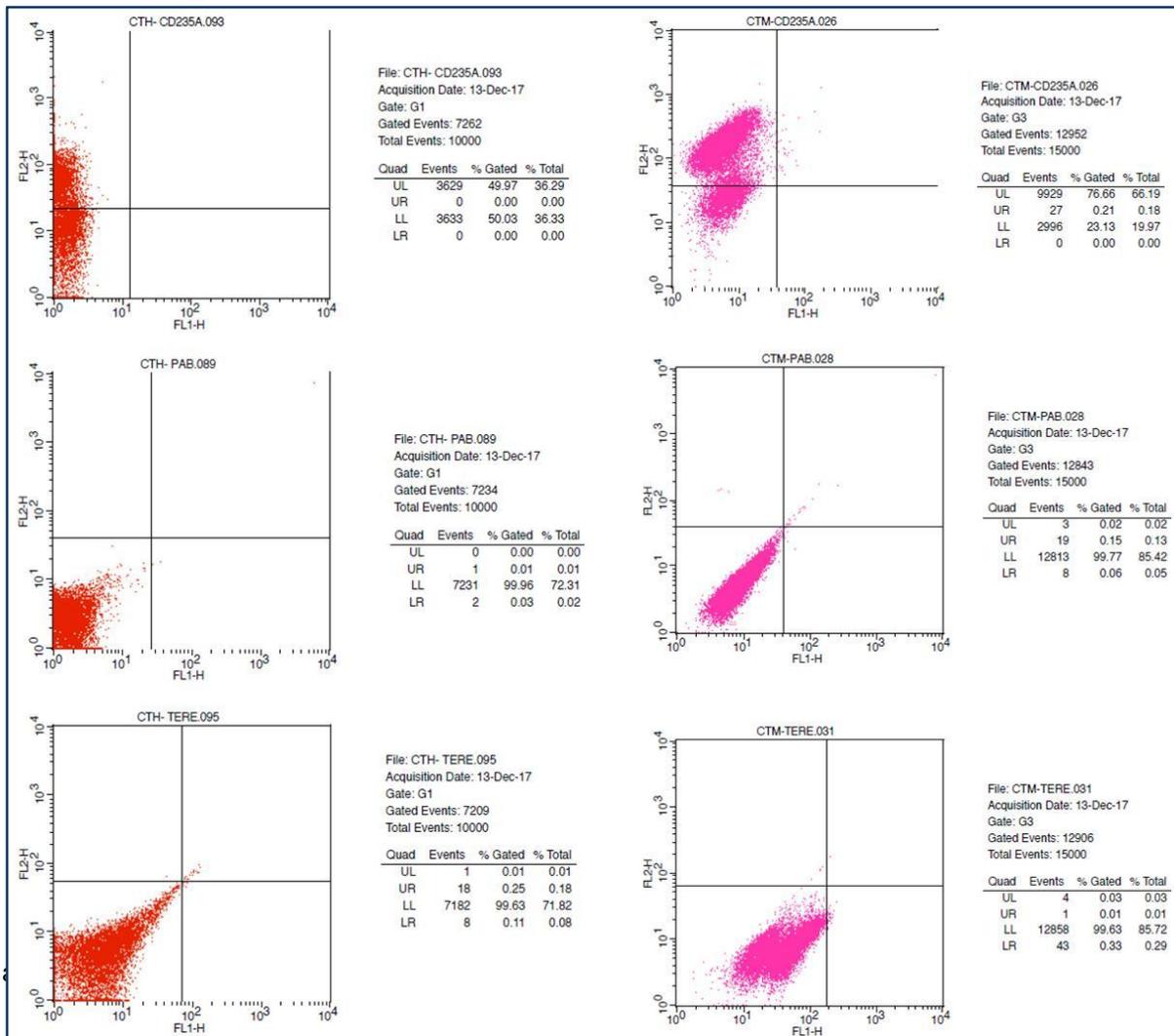


Coluna da esquerda: amostras de hemácias 1, 2 e 3 incubadas com SNC de LAMB 10 (PAB1 - 189), reveladas com anticorpo secundário FITC anti-IgG; Coluna da direita: amostras de hemácias I, II e III incubadas com SNC de LAMB 11 (TERE1 - 5A1), reveladas com anticorpo secundário FITC anti-IgM. Em cor vermelha: Amostra I - hemácias; Em cor verde: Amostra II - hemácias; Em cor magenta: Amostra III - hemácias. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A amostra de CTH foi 50,03% positiva para o anticorpo comercial anti-CD235a, e negativa para LAMB 10 e LAMB 11. A amostra de CTM-TA foi 23,13% positiva para o anticorpo comercial anti-CD235a, e negativa para LAMB 10 e LAMB

11 (Figura 36). Estes dois testes indicaram que os dois anticorpos em estudo não possuem especificidade para o antígeno CD235a, também conhecido como Glicoforina A, e também não possuem especificidade para marcadores específicos de células-tronco hematopoiéticas e nem células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humanas.

Figura 36 - Testes com anti-CD235a comercial, LAMB 10 e LAMB 11 com CTH e CTM-TA em Citometria de Fluxo



Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

O uso dos anticorpos monoclonais tem tornado muito mais precisas a investigação diagnóstica, a análise dos grupos sanguíneos em doadores e pacientes candidatos à transfusões sanguíneas e a imunofenotipagem de células e tecidos,

além das aplicações como molécula terapêutica. A aplicabilidade vem aumentando nos últimos anos.

Devido à natureza polimórfica das hemácias e leucócitos humanos é necessário o desenvolvimento de novos insumos para as diversas aplicações. Neste sentido, a caracterização de anticorpos monoclonais é tarefa árdua e envolve o uso de múltiplas técnicas com o objetivo de definir a especificidade, determinar eventuais reações cruzadas interespécies e apresentar a técnica para a qual o anticorpo desempenha sua melhor *performance*, além de se utilizar de anticorpos já disponíveis no mercado para validação daqueles obtidos *in house*.

Com relação ao emprego da análise proteômica neste estudo de caracterização de anticorpos monoclonais, embora muitas promessas tenham sido apresentadas na literatura de resolução de entraves nestes protocolos com o advento da Análise Proteômica, o uso dessa ferramenta requer investigação e observação minuciosas dos resultados obtidos em cada análise, uma vez que são muitas as proteínas identificadas em cada banda proteica explorada pela Espectrometria de Massas e pelas ferramentas bioinformáticas, como visto nos Quadros 14, 15 e 16 já apresentados.

A proteômica baseada em análises de Espectrometria de Massas pode fornecer dados qualitativos e quantitativos para a expressão de proteínas de membrana⁴⁹. No entanto, as proteínas integrais da membrana de hemácias são reconhecidas de forma variável por estes métodos, e outras dificuldades incluem a amostragem, a eletronegatividade e quantificação de proteínas hidrofóbicas de membrana⁴⁹. A maioria das abordagens de espectrometria de Massas não se concentram em proteínas de membrana, e as proteínas citoplasmáticas representam um viés nas análises⁴⁹.

Em um estudo de Hegedús e colaboradores⁴⁹, que utilizou-se de estudos proteômicos de membrana em hemácias humanas, e comparou-os resultados com os dados da literatura, diferenças significativas sobre proteínas identificadas foram observadas (número total de proteínas reconhecidas, incompatibilidade com base de dados, não pareamento das proteínas detectadas entre os estudos comparados).

Esses achados da literatura condizem com a dificuldade em analisar os resultados obtidos neste estudo para exploração da especificidade de anticorpos anti-eritrocitários via análise da proteína da membrana dos eritrócitos.

Em relação às técnicas utilizadas, o uso do gel 2-D (SDS-PAGE) para separar proteínas também apresenta alguns fatores que tornam as análises limitadas, uma vez que a área total do gel limita o número de proteínas que podem ser separadas⁵⁰, embora este entrave seja um problema geral em estudos que se utilizam do gel 2-D. Na análise proteômica, muitas das bandas detectadas nos géis são, na verdade, variações dos produtos de proteínas modificadas pós-tradução, que não são, geralmente, detectadas pelo seqüenciamento⁵⁰.

Outro fator limitante dessas análises é o corte manual dos *spots* reconhecidos pelos anticorpos, partindo-se do alinhamento entre a imagem do *Blotting*, pesos moleculares e o gel corado com *Coomassie Blue*. Esse método pode aumentar as chances de erros, como recorte do *spot* no gel em local não exatamente igual àquela cuja banda foi reconhecida pelo anticorpo. Isso resultaria na identificação proteica que não corresponde àquela proteína que realmente o anticorpo reconhece.

Embora a proteômica (e outras técnicas mais sensíveis) sejam fortemente recomendadas para caracterização de anticorpos, o uso de técnicas imunohematológicas, como a hemaglutinação, ainda se apresentam como técnicas de escolha na imunofenotipagem eritrocitária na Hemoterapia. Além disso, esta técnica tem um custo baixo e execução fácil, que permite que pequenos serviços/laboratórios utilizem-a em suas rotinas laboratoriais. O emprego da análise proteômica para definição dos antígenos presentes nas membranas das hemácias, em substituição aos anticorpos das técnicas sorológicas, é economicamente inviável e impreciso, como observado neste estudo com relação ao antígeno N. De acordo com Hegedús e colaboradores⁴⁹, ainda há muitas inconsistências na análise proteômica de hemácias, que geram dados imprecisos e, em alguns casos, duvidosos.

Em suma, técnicas complementares para validação ainda são valiosas e indispensáveis na confirmação da especificidade dos anticorpos estudados, relevando as possibilidades apresentadas pela proteômica.

5. CONCLUSÕES

Foram utilizadas diferentes técnicas para a caracterização de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos, tais como: citometria de fluxo, *Western Blotting*, análise proteômica e imuno-histoquímica. O conjunto de técnicas associa-se à determinação da especificidade com maior segurança.

O anticorpo LAMB 10, de perfil anti-eritrocitário, provável classe IgG, nos testes imuno-hematológicos apresentou perfil de anti-N. A análise proteômica realizada, juntamente com o *Western Blotting*, sugeriu que LAMB 10 reconheça as proteínas Ácido delta amino-levulínico desidratase (ALAD), Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PD) ou Glicoforina C (GPC).

O anticorpo LAMB 11, de perfil anti-eritrocitário, provável classe IgM, nos testes imuno-hematológicos mantém a reatividade intensa, reconhecendo um antígeno que não sofre interferência nas hemácias tratadas com enzimas proteolíticas papaína e bromelina. As análises de *Western Blotting* e proteômica realizadas sugeriram que LAMB 11 reconhece, provavelmente, as proteínas Espectrina β 1 eritrocítica, Aducina beta (ADD2), Ácido delta amino-levulínico desidratase (ALAD) ou Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3PD). Em Imuno-histoquímica, a hipótese mais aceita é de que LAMB 11 reconheça a proteína CD36.

O anticorpo LAMB 12, de perfil anti-leucocitário, foi caracterizado como sendo da classe IgG e, nos testes em Citometria de Fluxo, não excluíram-se as possibilidades de apresentar especificidade contra epítomos de CD3, CD4, CD8, mas não reconhecem antígenos HLA-Classe I ou HLA-Classe II. As análises de *Western Blotting*, proteômica e citometria de fluxo realizadas sugeriram que LAMB 12 reconhece, provavelmente, a proteína Mieloperoxidase (MPO).

Apesar da extensa investigação realizada neste trabalho, outras técnicas tornam-se necessárias para validação dos anticorpos, como ensaios dinâmicos da interação do anticorpo com antígenos-alvo e seus efeitos sobre a atividade celular e validação com anticorpos comerciais de mesma especificidade. Este extenso arsenal necessário para a caracterização inequívoca é um dos fatores limitante nas técnicas de produção de anticorpos monoclonais que tornam o produto final com valor agregado muito alto.

Como perspectiva de estudo, a validação dos três anticorpos aqui explorados com anticorpos comerciais de mesma especificidade e testes em plataformas de diagnóstico rápido mostram-se essenciais para propostas de aplicações diagnósticas.

A análise proteômica é uma importante ferramenta no auxílio à caracterização de novos anticorpos produzidos. No entanto, devido às suas características, técnicas complementares para validação ainda são valiosas e indispensáveis na confirmação da especificidade dos anticorpos estudados, levando em consideração as possibilidades apresentadas pela proteômica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*. 2008; 112(10): 3939-3948.
2. Red Cell Immunogenetics and Blood Group Terminology. International Society of Blood Transfusion. [acesso em 02 Dez 2016]. Disponível em: <http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>.
3. Murador P, Deffune E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29(2): 168-178.
4. Pinto WJ, Marinalva JE, Cardoso SMG, Areas MA. Topologia das principais proteínas de membrana e do citoesqueleto eritrocitário. *Rev Ciênc Méd Biol*. 2013; 12(1):106-120.
5. Webert KE, Smith JW, Arnold DM, Chan HHW, Heddie NM, Kelton JG. Transfusion Medicine. In: Greer JP, Arber DA, Glader B, List AF, Means RT, Paraskevas F, Rodger GM. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2014; 509-586.
6. Bonifácio SL, Novaretti MCZ. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009; 31(2): 104-111.
7. Lane WJ, Westhoff CM, Uy JM, Aguad M, Smeland-Wagman R, Kaufman RM, Rehm HL, Green RC, Silberstein LE. Comprehensive Red Blood Cell and Platelet Antigen Prediction from Whole Genome Sequencing: Proof of Principle. *Transfusion*. 2015; **56** (3): 743–54.
8. Lux IV SE. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions. *BLOOD*. 2016;127(2): 187-199.
9. Castilho L, Pellegrino-Júnior J, Reid ME. Anticorpos, antígenos e sistemas. In: Castilho L, Pellegrino-Júnior J, Reid ME. *Fundamentos de Imuno-Hematologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 1-24.
10. International Society of Blood Transfusion [homepage na internet]. Table of Blood Group Antigens [acesso em 02 Nov 2016]. Disponível em: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20antigens%20within%20systems%20v4.0%20141124.pdf.
11. International Society of Blood Transfusion [homepage na internet]. Table of Blood Group Collections [acesso em 02 Nov 2016]. Disponível em: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20blood%20group%20collections%20v4.0%20141120.pdf.

12. International Society of Blood Transfusion [homepage na internet]. Table of Low Incidence Antigens [acesso em 02 Nov 2016]. Disponível em: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/files-2015/red%20cells/links%20tables%20in%20introduction%20text/Table%20low%20incidence%20antigens%20700%20series%20v4.0%20141120.pdf.
13. International Society of Blood Transfusion [homepage na internet]. Table of High Incidence Antigens [acesso em 02 Nov 2016]. Disponível em: http://www.isbtweb.org/fileadmin/user_upload/Working_parties/WP_on_Red_Cell_Immunogenetics_and/Table_of_high_incidence_antigens_901_series_v5.0_150828.pdf
14. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256: 495 – 497.
15. Clark G, Stockinger H, Balderas R, van Zelm MC, Zola H, Hart D, Engel P. Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clin Transl Immunology*. 2016; Jan 22;5(1):57.
16. Human Cell Differentiation Molecules [home page na internet]. [acesso em 17 Jun 2018]. Disponível em: <http://www.hcdm.org/>.
17. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin BQ, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, Stockinger H, van Zelm MC, Zola H, Clark G. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol*. 2015; Nov 15;195(10):4555-63.
18. Zhang L, English AM, Bai DL, Ugrin SA, Shabanowitz J, Ross MM, Hunt DF, Wang WH. Analysis of Monoclonal Antibody Sequence and Post-translational Modifications by Time-controlled Proteolysis and Tandem Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2016; Apr; 15(4): 1479–1488.
19. Troiano LDC, Thomaz-Soccol V, Agottani JVB, Brodzinski J, Penha TR, Ozaki SC. Production, Characterization, and Use of Monoclonal Antibodies Against gp51 Protein to Diagnose Bovine Leukemia Virus Infection. *Bio Research Open Access*. 2013; 2(1):55-60.
20. van den Broek I, Niessen WM, van Dongen WD. Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013; Jun 15;929:161-79.
21. Ladwig PM, Barnidge DR, Willrich MAV. Mass Spectrometry Approaches for Identification and Quantitation of Therapeutic Monoclonal Antibodies in the Clinical Laboratory. *Clin Vaccine Immunol*. 2017; May 5;24(5).
22. D'Alessandro A, Dzieciatkowska M, Hill RC, Hansen KC. Supernatant protein biomarkers of red blood cell storage hemolysis as determined through an absolute quantification proteomics technology. *Transfusion*. 2016

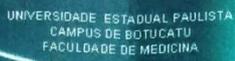
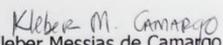
- Jun;56(6):1329-39.
23. Dzieciatkowska M, Silliman CC, Moore EE, et al. Proteomic analysis of the supernatant of red blood cell units: the effects of storage and leucoreduction. *Vox Sang* 2013;105:210-8.
 24. Guidance for Industry: Monoclonal Antibodies Used as Reagents in Drug Manufacturing. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. March, 2001. [acesso em 22 Jun 2018]. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm080417.pdf>.
 25. Race RR, Sanger R. *Blood Groups in Man*. 3ª Edição. Oxford, Blackwell, 1958, p. 246.
 26. Marsh WL. Scoring of hemagglutination reactions. *Transfusion*. 1972; 12(5): 352-353.
 27. LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*. 1970; 227, 680-685.
 28. TOWBIN, H., STACHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979; 76, 4350-4354.
 29. UniProt. [acesso em 17 Jun 2018]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q29381>.
 30. Poon MC, Di Minno G, d'Oiron R, Zotz R. New Insights Into the Treatment of Glanzmann Thrombasthenia. *Transfus Med Rev*. (2016) Abril;30(2):92-9.
 31. UniProt. [acesso em 30 Mai 2018]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P05164>.
 32. Vanhamme L, Boudjeltia KZ, Antwerpen PV, Delporte C. The other myeloperoxidase: Emerging functions. *Arch Biochem Biophys*. 2018; Jul 1;649:1-14.
 33. Domingues-Ferreira M, Levy A, Barros NC, Bertolini DL, Vasconcelos DM. Case report of myeloperoxidase deficiency associated with disseminated paracoccidioidomycosis and peritoneal tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 50(4):568-570, July-August, 2017.
 34. Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol*. 2013 Feb; 93(2): 185–198.
 35. Okada SS, de Oliveira EM, de Araújo TH, Rodrigues MR, Albuquerque RC, Mortara RA, Taniwaki NN, Nakaya HI, Campa A, Moreno AC.

- Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes: Production and subcellular localization. *Cell Immunol.* 2016; Fev;300:18-25.
36. UniProt. [acesso em 30 Maio 2018]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P13716>.
37. Lawrence SH, Ramirez UD, Selwood T, Stith L, Jaffe EK. Allosteric inhibition of human porphobilinogen synthase. *J Biol Chem.* 2009; Dez 18;284(51):35807-17.
38. Jaffe EK, Stith L. ALAD Porphyria Is a Conformational Disease. *Am J Hum Genet.* 2007; Fev; 80(2): 329–337.
39. Rinalducci S, Marrocco C, Zolla L. Thiol-based regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in blood bank-stored red blood cells: a strategy to counteract oxidative stress. *Transfusion.* 2015; Mar;55(3):499-506.
40. Harkness DR. A new erythrocytic enzyme defect with hemolytic anemia: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Lab Clin Med* 1966; 68:879-80.
41. Pasini EM, Kirkegaard M, Mortensen P, Lutz HU, Thomas AW, Mann M. In-depth analysis of the membrane and cytosolic proteome of red blood cells. *Blood.* 2006; Aug 1;108(3):791-801.
42. Human Protein Reference Database. [acesso em 13 Jun 2018]. Disponível em: http://hprd.org/summary?hprd_id=00504&isoform_id=00504_2&isoform_name=Isoform_1.
43. UniProt. [acesso em 31 Mai 2018] Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P11277>.
44. Manciu S, Matei E, Trandafir B. Hereditary Spherocytosis – Diagnosis, Surgical Treatment and Outcomes. A Literature Review. *Chirurgia (Bucur).* 2017; Mar-Apr;112(2):110-116.
45. Narla J, Mohandas N. Red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* 2017; May;39(1):47-52.
46. UniProt. [acesso em 31 Mai 2018] Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P35612>.
47. Khan AA, Hanada T, Mohseni M, Jeong JJ, Zeng L, Gaetani M, Li D, Reed BC, Speicher DW, Chishti AH. Dematin and adducin provide a novel link between the spectrin cytoskeleton and human erythrocyte membrane by directly interacting with glucose transporter-1. *J Biol Chem.* 2008; May 23;283(21):14600-9.
48. Low PS. Where spectrin snuggles with ankyrin. *Blood.* 2009; 113:5372-5373.

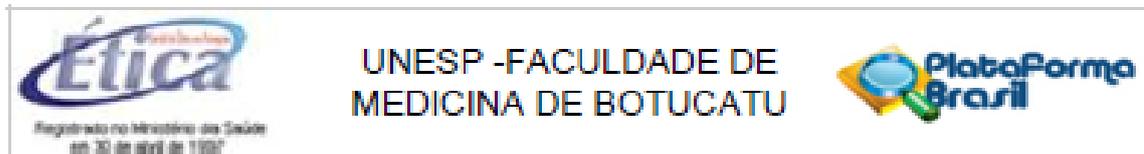
49. Hegedűs T, Chaubey PM, Várady G, Szabó E, Sarankó H, Hofstetter L, Roschitzki B, Stieger B, Sarkadi B. Inconsistencies in the red blood cell membrane proteome analysis: generation of a database for research and diagnostic applications. *Database (Oxford)*. 2015; Jun 14:1-8.
50. Tomazella GG, da Silva I, Laure HJ, Rosa JC, Chammas R, Wiker HG, de Souza GA, Greene LJ. Proteomic analysis of total cellular proteins of human neutrophils. *Proteome Sci*. 2009; Ago 31:7-32.
51. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G: Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J of Cancer*. 1977; 19: 621-626.
52. Inoue T, Swain A, Nakanishi Y, Sugiyama D. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. *Anticancer Res*. 2014; Aug;34(8):4539-50.
53. Ryu KJ, Park C, Hong M, Ko YH, Kim WS, Kim SJ. FOXO4 expression is related to stem cell-like properties and resistance to treatment in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2017; Jan 10;8(2):2466-2476.
54. Uniprot. [Acesso em 24 Jun 2018]. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/P04921>.
55. Aoki T. A. Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes (Basel)*. 2017; Sep 29;7(4).
56. Uniprot. [Acesso em 24 Jun 2018]. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprot/P28906>.
57. Human Protein Reference Database. [Acesso em 24 Jun 2018]. Disponível em: http://hprd.org/summary?hprd_id=01430&isoform_id=01430_5&isoform_name=Isoform_1.
58. Brasil. Ministério da Saúde. PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 5, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017- DOU Nº 190, DE 03/10/2017. [Acesso em 24 Jun 2018]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu aprovado em 31 de Março de 2016, sob registro número 1175/2016

   	
CERTIFICADO Nº 1175/2016-CEUA	
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos", registrada com o n. 1175/2016, sob a responsabilidade de Laís Priscila de Santis, orientada pela Profa. Dra. Elenice Deffune – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 31/03/2016.</p>	
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/01/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo Balb/c
Nº de animais	25
Peso/Idade	260-280 gramas/Menor que 2 meses e 3 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da FMB - UNESP
<p>OBSERVAÇÃO: O início do projeto está condicionado a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – FMB -UNESP (Parecer ético)</p>	
<p> Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros Presidente da CEUA</p>	<p> Kleber Messias de Camargo Secretário da CEUA</p>
<p>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-687 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br</p>	

ANEXO B - Aprovação no Conselho de Ética em Pesquisa em 05 de Julho de 2016,
parecer número 1.622.156



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE PROTEÔMICA NA CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS DIRIGIDOS CONTRA ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS E LEUCOCITÁRIOS

Pesquisador: Lais Priscila De Santis

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 56511116.5.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Urologia

Patrocinador Principal: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.622.156

Apresentação do Projeto:

As membranas eritrocitária e leucocitária são compostas por centenas de antígenos, muitas vezes relacionados a processos de rejeição de transplantes e doenças hemolíticas. Para a detecção desses antígenos presentes nas membranas de hemácias e leucócitos humanos são utilizados anticorpos monoclonais.

A caracterização desses anticorpos pode ser realizada determinando-se o conjunto de proteínas expressas nas moléculas membranárias, por meio de análises proteômicas.

Os clones de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos, produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu em estudos anteriores, porém não caracterizados, estão criopreservados no banco de células.

O presente estudo tem como objetivo caracterizar e validar estes anticorpos, visando identificar clones para serem patenteados.

Estes anticorpos serão selecionados e os cinco clones que produzem estes anticorpos serão

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



UNESP -FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU



Continuação do Parecer: 1.522.156

expandidos, usando o método de Batch cultura (para os antieritrocitários e produção de ascite em camundongos para os antileucocitários. Os clones expandidos, retestados e que tiveram bom desempenho nas análises passarão por caracterização Imunoquímica (Western blotting) e proteômica. Os anticorpos, após sua caracterização, terão sua atividade comparada com anticorpos de mesma especificidade, disponíveis no mercado, e os resultados obtidos serão submetidos à análise estatística por regressão linear. Os avanços dos estudos proteômicos, aliados aos estudos sorológicos/fenotípicos contribuem de maneira significativa na caracterização dos anticorpos monoclonais, o que facilita a análise de sua presença e identificação de antígenos membranares, tornando práticas hemoterapêuticas e os diagnósticos mais precisos.

Os anticorpos monoclonais reconhecedores de hemácias e leucócitos humanos podem ser validados em comparação aos seus pares comerciais gerando patente para a universidade.

Para realização da pesquisa as células murinas serão colocadas em expansão pelo método de cultura, e os sobrenadantes de cultura serão testados com hemácias ou leucócitos de doadores de sangue, cujas amostras serão solicitadas, via assinatura de TCLE.

Não serão necessárias coletas de sangue específicas para o projeto, pois pequenas quantidades de 1 ml de sangue excedentes das análises realizadas no Hemocentro são suficientes para os referidos testes com os anticorpos monoclonais.

Serão necessárias 20 amostras de doadores de sangue, saudáveis, maiores de 18 anos, cujos resultados dos exames sorológicos para Hepatite B, C, HIV, HTLVIII, Chagas e Sífilis tenham sido não reagentes.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos, produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu no período de 1992 a 2014, utilizando-se análises Imunoquímicas e proteômica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não acrescenta riscos aos participantes, pois as amostras serão obtidas a partir de sangue de doadores.

Não haverá benefícios diretos aos participantes.

Endereço: Chácara Butignelli, s/n

Bairro: Rubião Junior

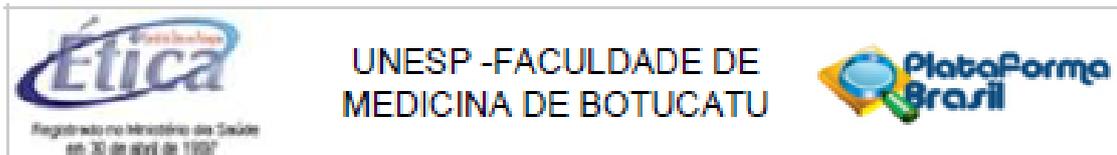
UF: SP

Telefone: (14)3880-1608

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-070

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.622.156

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa de caráter experimental, cuja participação dos indivíduos será exclusivamente para doação de sangue para realização dos testes. Salienta-se que não haverá coleta específica para a pesquisa, e sim, utilização do sangue dos doadores do Hemocentro.

Os métodos de análise estão detalhados no projeto e há uma parte da pesquisa que será realizada em animais, a ser submetida ao Comitê de Ética específico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e termos foram anexados ao processo.

O TCLE é claro e explicativo.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou de parecer favorável a aprovação do projeto, sem necessidade de envio a CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

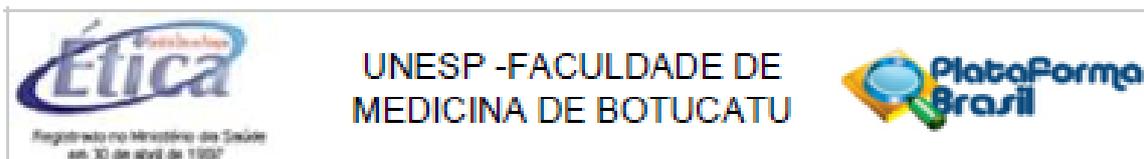
Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 04/07/2016, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado para análise o "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_692263.pdf	23/05/2016 14:35:34		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	EAPAPROVADO.pdf	23/05/2016 14:33:57	Lais Priscila De Santis	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoLais.pdf	23/05/2016 14:32:52	Lais Priscila De Santis	Aceito
Outros	bolsa.jpg	08/04/2016 14:10:56	Lais Priscila De Santis	Aceito
Outros	Processofapesp.docx	08/04/2016 14:09:06	Lais Priscila De Santis	Aceito

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 16.618-070
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1608 E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.522.158

Orçamento	Custos.pdf	08/04/2016 13:59:12	Lais Priscila De Santis	Aceito
Outros	Autorizahemocentro.pdf	08/04/2016 13:58:51	Lais Priscila De Santis	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizalec.pdf	08/04/2016 13:50:06	Lais Priscila De Santis	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2016 13:48:51	Lais Priscila De Santis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoLais.pdf	05/04/2016 11:56:14	Lais Priscila De Santis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/04/2016 11:55:36	Lais Priscila De Santis	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 05 de Julho de 2016

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br