

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/02/2023.



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

Suelen de Souza Assunção Nishio

**Desenvolvimento de imunossensor para detecção de
hemorragia feto – materna (HFM)**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2019**

Suelen de Souza Assunpção Nishio

Desenvolvimento de imunossensor para detecção de
hemorragia feto – materna (HFM)

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu

2019

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

Nishio, Suelen de Souza Assunção.

Desenvolvimento de imunossensor para detecção de
hemorragia feto - materna (HFM) / Suelen de Souza
Assunção Nishio. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 90400003

1. Anticorpos monoclonais. 2. Biossensores. 3.
Transfusão feto-materna. 4. Imuno-histoquímica. 5.
Imunologia.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal; Biossensor;
Hemorragia feto - materna; Imunossensor.

Suelen de Souza Assunpção Nishio

Desenvolvimento de imunossensor para detecção de hemorragia feto –
materna (HFM)

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

Orientador: Profa. Dra. Elenice Deffune

Comissão examinadora

Profa. Dra. Juliane de Campos Inácio
Faculdade Estácio de Sá

Prof. Dr. Renato Gonçalves Félix
UNOESTE - Faculdade de Medicina de Jaú

Botucatu, 27 de fevereiro de 2019.

Dedico ao meu melhor amigo e grande amor Marco Massatoshi Nishio.

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Elenice Deffune pela orientação, compartilhamento do saber, pelo grande apoio, motivação e por não me deixar desistir de um sonho.

À Prof^a. Dra Marli Leite de Moraes pela supervisão na construção do imunossensor e contribuição na revisão dos dados.

À Prof^a. Dr^a. Marjorie de Assis Golin pela supervisão nos trabalhos realizados com citometria de fluxo e revisão de dados.

À Anna Laura Yuri Yokomichi pela atenção e apoio na construção do imunossensor.

Ao Prof^o. Dr. Eduardo Antonelli por autorizar o uso de equipamento e laboratório de Cerâmicas Avançadas do ICT-UNIFESP.

Ao Prof^o. Dr. Sidney Jose Lima Ribeiro pelo empréstimo de equipamento.

Ao Ednelson Bianchi, pelo auxílio no manuseio dos animais e pelo apoio e motivação.

À toda a equipe do laboratório de Engenharia Celular (Ana Lívia, Francine, Laís, Pâmela e Thaís) pelo auxílio, treinamento e instruções passadas.

À equipe do laboratório de imunohematologia do hemocentro de Botucatu, Dra. Patrícia, Thaisa, Juliana e Sandra pelo apoio.

Aos meus colegas de trabalho, em especial a minha Supervisora Maria Salete Sartori, por compreender a importância do meu conhecimento científico.

À minha Família, minha mãe Maria Gorete, minha irmã Gisele, meu sobrinho Gabriel Henrique e ao meu esposo Marco Massatoshi pela paciência, apoio, dedicação e compreensão.

“Eterno é tudo aquilo que dura uma fração de segundos, mas com tamanha intensidade que se petrifica e nenhuma força jamais o resgata. ”

Carlos Drummond de Andrade

Resumo

Nishio, S. S. A. **Desenvolvimento de imunossensor para detecção de hemorragia feto-materna (HFM)**. 2019. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

A Hemorragia feto-materna (HFM) se dá pela transferência do sangue fetal para o compartimento intravascular materno, devido à ruptura na membrana vâsculo-sincicial da placenta. A HFM pode ser responsável pela alosensibilização do sistema imune materno, levando a morbidade e mortalidade de gravidez corrente e/ou de futura, assim como também constitui a base da etiopatogenia de várias afecções, como se verifica na doença hemolítica perinatal que expõe a complicações fetais como, hidropsia, danos cerebrais hipóxicos e morte fetal. Detectar e quantificar hemácias fetais ajuda a prevenir as consequências devida a ocorrência da HFM. Entre os testes diagnósticos utilizados na detecção e quantificação têm - se os mais sensíveis o teste quantitativo de Kleihauer e Betke e o de Citometria de fluxo, sendo o primeiro considerado padrão ouro. Tendo em vista a importância do diagnóstico laboratorial da HFM foi desenvolvida a proposta da construção de imunossensor para detecção de amostras de sangue fetal na corrente sanguínea materna. Foi realizada a produção de anticorpo monoclonal com objetivo de produzir anticorpos contra antígenos de superfícies de hemácias fetais humana e também foram realizadas a construção de unidades sensoriais para detecção de sinal biológico de imunoafinidade entre anticorpos que detectam hemácias fetais e a hemoglobina fetal presente nestas células, a fim de se diagnosticar a ocorrência da HFM. Foram obtidos como resultados a produção de anticorpo monoclonal que detecta hemácias humanas tanto adulta quanto fetal e a construção de imunossensores que detectam reações de imunoafinidade utilizando anticorpos monoclonais comerciais purificados anti-CD71 e anti-HbF adsorvido a matrizes poliméricas em superfícies de eletrodo impresso de carbono e eletrodo interdigitado de ouro pela técnica *Layer-by-layer (LbL)*. Os sistemas sensoriais montados foram analisados através de medidas eletroquímicas e de impedância elétrica, sendo obtida uma melhor resposta por medida de impedância elétrica, portanto obteve-se resultados satisfatórios em eletrodos interdigitado de ouro.

Palavras – chave: Anticorpo monoclonal; Biossensor; Hemorragia feto – materna; Imunossensor.

Abstract

Nishio, S. S. A. **Development of immunosensors for the detection of fetomaternal hemorrhage (FMH)**. 2019. 74 f. Thesis (Master) - Faculty of Medicine of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

Fetomaternal hemorrhage (FMH) occurs through the transfer of fetal blood into the maternal intravascular compartment, due to rupture in the placenta-syncytial membrane. FMH may be responsible for the alosensitization of the maternal immune system, leading to morbidity and mortality of current and / or future pregnancies, as well as being the basis of the etiopathogenesis of various conditions, as in perinatal haemolytic disease that exposes to fetal complications such as hydrops, hypoxic brain damage, and fetal death. Detecting and quantifying fetal erythrocytes helps to prevent the consequences due to the occurrence of FMH. Among the diagnostic tests used in the detection and quantification are the most sensitive the quantitative test of Kleihauer and Betke and the one of Flow cytometry, being the first considered gold standard. Considering the importance of the laboratory diagnosis of FMH, the proposal of the construction of immunosensor for the detection of fetal blood samples in the maternal blood was developed. The production of a monoclonal antibody was carried out with the objective of producing antibodies against antigens on human fetal red blood cells and also the construction of sensorial units for the detection of biological signal of immunoaffinity between antibodies that detect fetal red blood cells and the fetal hemoglobin present in these cells, in order to diagnose the occurrence of FMH. The results obtained are the production of monoclonal antibody that detects both adult and fetal human erythrocytes and the construction of immunoassay detectors that detect immunoaffinity reactions using purified commercial anti-CD71 and anti-HbF monoclonal antibodies adsorbed to polymer matrices on carbon printed electrode surfaces and interdigitated gold electrode by the *Layer-by-layer (LbL)* technique. The sensory systems assembled were analyzed by means of electrochemical and electrical impedance measurements, and a better response was obtained by electrical impedance measurement, so satisfactory results were obtained on interdigitated gold electrodes.

Key - words: Monoclonal antibody; Biosensor; Fetomaternal hemorrhage; Immunosensor.

Índice de Figuras

Figura 1 - Delineamento científico do problema da quantificação da HFM	17
Figura 2 - Representação esquemática do sistema de barreira da placenta e sua respectiva quebra com inversão parcial de fluxo sanguíneo	18
Figura 3 - Percentual de probabilidade de ocorrência da HFM segundo o momento da gestação	20
Figura 4 - Estado da arte na determinação laboratorial da HFM - A) teste de K-B; B) teste de roseta; C) gel teste e D) análise por CTF detectando HbF, sendo B e C para detecção RhD.....	22
Figura 5 - Representação esquemática de uma unidade básica de imunoglobulina.	23
Figura 6 - Circuito equivalente para um eletrodo metálico recoberto com filme pouco condutor	27
Figura 7 - Estrutura da cadeia polimérica da polietileno imina (PEI)	28
Figura 8 - Estrutura da fibroína da seda (FS) produzida pelo bicho da seda <i>Bombyx mori</i>	29
Figura 9 - Detalhe do protocolo de imunização: injeção endovenosa do <i>booster</i> - A) Dispositivo de contenção aberto; B) dispositivo de contenção fechado e C) imobilização do camundongo para inoculação.	32
Figura 10 - Microfotografia obtida por microscopia invertida de luz direta das células de mieloma múltiplo murino (NS1)	33
Figura 11 - Detalhamento metodológico da esplenectomia: materiais utilizados na dissociação do baço do animal - A) Materiais para dissociação do baço; B) Baço do animal a ser dissociado e C) Esplenócitos.	34
Figura 12 - Representação esquemática do processo de fusão celular em meio químico	34
Figura 13 - Aspecto da microplaca de 96 poços contendo células fusionadas - ① Nome da fusão e identificação detalhada; ② controle da fusão: alíquota do mieloma múltiplo murino/NS1; ③ controle da fusão: alíquota dos linfócitos obtidos para a fusão e ④ identificação do pesquisador e respectiva data da realização do procedimento.	35

Figura 14 - Cronograma seguido no procedimento após fusão celular HemF = Hemácias fetais; HAT D+= dias de uso do meio de cultura com Hipoxantina, Aminopterina e Timidina; <i>Screening</i> : data de início dos testes de screening; HT D+= passagem das células para meio de cultura com Hipoxantina e Timidina e MC D+ = introdução do meio de cultura completo, sem HAT.	36
Figura 15 - Aspecto da amplificação dos hibridomas de interesse: híbridos com <i>Screening</i> positivo transferidos para placa de 24 poços	37
Figura 16 - Esquema representativo da técnica de clonagem celular pelo Método de Diluição Limitante	37
Figura 17 - Aspecto fotográfico da microplaca de clonagem pelo método de diluição limitante com identificação dos clones visualizados - Círculo em verde com a inscrição “U”, representa a visualização por microscopia invertida de apenas um grupamento de células; Círculo em vermelho, com a inscrição “M”, representa a identificação visual, por microscopia invertida de mais de um grupamento celular (M= múltiplos).	38
Figura 18 - Detalhamento dos tipos de Eletrodos utilizados - A) Eletrodo impresso de carbono e B) Eletrodo interdigitado de ouro.	41
Figura 19 - Montagem dos filmes <i>LbL</i> em eletrodo impresso de carbono	42
Figura 20 - Montagem dos filmes <i>LbL</i> em EIO	43
Figura 21 - Células de mieloma múltiplo murino/linhagem NS1 coradas com azul de tripan para teste de viabilidade - A) Células com 100% de mortalidade → células coradas em azul = células mortas e B) → célula em maior volume= necrose celular e → células viáveis, com aspecto normal	45
Figura 22 - Produto das fusões HemF3 e HemF4 – D1= primeiro dia de fusão; HAT = meio de cultura contendo hipoxantina-aminopterina e timidina; A) e C) controle dos linfócitos do baço e mieloma murino (NS1) sem a adição de meio de cultura HAT; B), D) e F) controle da fusão celular no sétimo dia, na presença de meio de cultura seletivo, HAT, dos linfócitos (apoptose natural), das células mielomatosas (NS1) com apoptose induzida e dos hibridomas se organizando em clusters (agrupamento de células circuladas).	48
Figura 23 - Reação de hemaglutinação em tubo: aspecto do <i>screening</i> realizado com reações negativas e positivas	50

Figura 24 - Análise por microscopia invertida da clonagem realizada - A) Crescimento de um único clone de célula; B) crescimento de múltiplos clones e C) clone em expansão	51
Figura 25 - Testes Imunohematológicos realizados em coluna de gel e técnica clássica de hemaglutinação em tubo utilizando hemácias do tipo I e II - A) Teste coluna de gel na presença de BFI; B) teste coluna de gel na presença de papaína e C) testes de hemaglutinação em tubo na presença de salina.	52
Figura 26 - Hemácias íntegras após procedimento de fixação e permeabilização.....	53
Figura 27 - Análise por Citometria de Fluxo: Estratégia de Gate para detecção da hemoglobina fetal - A) delimitando o campo de análise por tamanho e granulosidade; B) marcação da região das hemácias com anti-CD235a e C) marcação intracelular da hemoglobina fetal com anti-HbF.....	53
Figura 28 - Análise de amostras marcadas com anti-HbF utilizando o software Cell Quest Pro® - A) Análise de amostra negativa (sangue adulto) e B) análise de amostra positiva (SCU).	55
Figura 29 - Aspecto do esfregaço sanguíneo corado por Leishmann - Controle hematimétrico das amostras de SCU testadas – A); B) e C) Presença de eritroblastos.....	55
Figura 30 - Análise por Citometria de Fluxo: Estratégia de Gate para análise de amostras marcadas com anti-CD71 - A) As células foram identificadas por tamanho e granulosidade; B) células sem marcação e C) células marcadas com anti-CD71.....	56
Figura 31 - Análise de amostras marcadas com anti-CD71 utilizando o software Cell Quest Pro® - A) Análise de amostra negativa (sangue adulto) e B) análise de amostra positiva (SCU).	57
Figura 32 - Adsorção dos polímeros e anticorpos testados na superfície do eletrodo impresso de carbono - A) Adsorção de PEI/anti – CD71; B) Adsorção de FS/anti – CD71; C) Adsorção de PEI/anti – HbF e D) Adsorção de FS/anti – HbF.....	58
Figura 33 - Avaliação microscópica dos EIOs antes e após a adsorção da bicamada pelo método <i>LbL</i> - A) e B) Eletrodo puro, antes das adsorções; C) e D) após a adsorção da bicamada PEI/AC; E) e F) após a adsorção da bicamada FS/AC.....	59

Figura 34 - Voltamogramas das medidas eletroquímicas das unidades sensoriais construídas - A) FS; B) FS/anti-CD71; C) PEI; D) PEI/anti-CD71; E) FS; F) FS/anti-HbF; G) PEI e H)PEI/anti-HbF.	61
Figura 35 - Medidas de impedância elétrica no EIO com o polímero PEI - A) Eletrodo contendo PEI; B) eletrodo contendo PEI/anti-CD71; C) eletrodo contendo PEI e D) etrodo contendo PEI/anti-HbF.....	63
Figura 36 - Medidas de impedância elétrica em EIO com o polímero FS - A) eletrodo contendo somente FS e B) eletrodo contendo FS/anti-CD71.....	64
Figura 37 - Análise microscópica do eletrodo contendo FS/anti-CD71 após as medidas de impedância elétrica - A) e B) São observadas a presença de hemácias aderidas a superfície do imunossensor.	64
Figura 38 - Medidas de impedância elétrica em EIO contendo o polímero FS	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Produto das fusões realizadas	46
Tabela 2 - Número de testes de <i>screening</i> realizados por fusão celular	49
Tabela 3 - Resultados em % obtidos na avaliação das amostras testadas pela técnica de citometria de fluxo	54
Tabela 4 - Resultados em % obtidos na avaliação das amostras testadas pela técnica de citometria de fluxo e controle hematimétrico do percentual de eritroblastos em lâmina	56
Tabela 5 - Área dos voltamogramas e diferenças entre os sistemas construídos.....	60

Índice de Quadros

Quadro 1 - Protocolo de imunização utilizado	32
Quadro 2 - Híbridos selecionados para amplificação e clonagem.....	50
Quadro 3 - Fórmulas para calcular as variáveis necessárias para a análise de impedância elétrica.....	62

Sumário

1 – Introdução	16
1.1 – Hemorragia feto - materna	17
1.2 – Anticorpos monoclonais	22
1.3 – Biossensor	25
1.3.1 – Imunossensor	26
1.3.2 – Polímeros.....	28
2 – Objetivos	29
2.1 – Objetivo geral	29
2.2 – Objetivos específicos	29
3 – Material e métodos	29
3.1 – Produção do anticorpo monoclonal murino (AcMm)	29
3.1.1 – Animais	30
3.1.2 – Obtenção do antígeno	31
3.1.3 – Imunização	32
3.1.4 – Preparo das células NS1	33
3.1.5 – Preparo das células do Baço	33
3.1.6 – Fusão.....	34
3.1.7 – <i>Screening</i>	36
3.1.8 – Clonagem	37
3.2 – Citometria de Fluxo – Padronização do anticorpo anti – hemoglobina fetal humana (anti - HbF) e anti – CD71	38
3.2.1 – Marcação Intracelular	39
3.2.2 – Marcação extracelular.....	40
3.2.3 – Análise de citometria de fluxo	40
3.3 – Construção do Imunossensor	40
3.3.1 – Soluções	40

3.3.2 – Fabricação dos filmes automontados camada por camada (<i>Layer-by-Layer, LbL</i>).....	41
3.3.3 – Medidas eletroquímica.....	43
3.3.4 – Medidas elétrica.....	44
4 – Resultados e Discussões	44
4.1 – Produção dos anticorpos monoclonais	44
4.1.1 – Expansão das células NS1	44
4.1.2 – Imunizações.....	45
4.1.3 – Fusões	46
4.1.4 – <i>Screening</i>	48
4.1.5 – Clonagem	51
4.2 – Citometria de fluxo	52
4.2.1 – Fixação e permeabilização para imunomarcação da hemoglobina fetal.....	52
4.2.2 – Detecção da hemoglobina fetal com anti - HbF	53
4.2.3 – Detecção de eritrócitos imaturos (eritroblastos) com anti-CD71	55
4.3 – Construção do imunossensor	57
4.3.1 – Adsorção dos filmes (PEI/Ac e FS/Ac) em eletrodo impresso de carbono e em eletrodo interdigitado de ouro.	57
4.3.2 Detecção eletroquímica no eletrodo impresso de carbono	59
4.3.3 – Detecção elétrica no eletrodo interdigitado de ouro.....	62
5 – Conclusões.....	65
6 - Perspectivas.....	66
Referências Bibliográficas	67

1 – Introdução

A hemorragia feto – materna (HFM) é descrita desde a década de 1950 como a passagem do sangue fetal para a circulação materna. A mesma pode ocorrer devido a distúrbios na barreira placentária suspeito de causar um vazamento que leva à invasão de células fetais na circulação materna. Pode ser devido a um trauma ou a condições que levam a anormalidades placentárias como a pré-eclampsia.^{1,2}

Desde a introdução da profilaxia com a imunoglobulina (Ig) anti – RhD sua taxa de detecção aumentou. A avaliação da hemorragia feto – materna (HFM) envolvendo a detecção e quantificação de hemácias fetais na circulação materna se faz necessária principalmente para a prevenção de suas consequências, tanto para a mãe quanto para o feto.^{3,4} A quantificação dessas células na circulação materna é de grande importância principalmente quando ocorre a aloimunização materna. Nestes casos, como dito anteriormente, é realizada a administração de doses Ig anti – RhD, a administração dessa dose depende da quantificação do volume de células fetais na corrente sanguínea materna, é através dessa quantificação que se realiza o cálculo da dose adequada.^{1,5}

Encontrar um método de diagnóstico rápido é de grande relevância quando analisadas as consequências da ocorrência da HFM, e tendo em vista as limitações dos testes hoje já utilizados, limitações estas que envolvem desde técnicas laboriosas com tempo prologado para sua realização, até o uso de técnicas sensíveis, porém de alto custo.

Os imunossensores trazem a proposta ideal, um teste rápido que pode ser aplicado com baixo custo. O desenvolvimento de imunossensores para testes diagnósticos emergiu nos últimos anos de forma extraordinária. Considerados dispositivos analíticos compactos, compreendem a tecnologia de detecção e conversão de sinais que ocorrem durante a reação antígeno anticorpos.⁶

Na concepção dos imunossensores identifica-se claramente a convergência de diferentes campos da ciência, entre eles, a biologia, a química e a eletrônica no campo da inovação tecnológica criando oportunidades de um diagnóstico mais preciso, rápido, seguro e transponível para o mais próximo possível do paciente permitindo a rápida tomada de decisão médica. Tradicionalmente, testes diagnósticos ocorrem em laboratórios complexos. Muitos fabricantes e profissionais de saúde vêm pressionando há décadas para descentralizar alguns desses testes e aproximá-los do

paciente. Tudo isso envolve um grande esforço para melhorar o atendimento aos pacientes.^{6,7}

O tema desta pesquisa foi delineado com a perspectiva de desenvolver um imunossensor para a detecção da HFM. Para atender este objetivo, há a necessidade de se revisar três tópicos essenciais para o entendimento do objetivo delineado, dos materiais e métodos bem como dos resultados obtidos. Portanto, cada tópico será abordado a seguir compreendendo os aspectos da HFM, da produção de anticorpos monoclonais e da construção dos biossensores/imunossensores.

Esta revisão foi feita na ordem acima, pois foi em função do problema identificado: a dificuldade de se determinar quantitativamente a HFM e o impacto desta na epidemiologia da morte materno-infantil que se propôs o desenvolvimento de anticorpo monoclonal específico e a construção do imunossensor para aplicação clínica em salas de parto e centros obstétricos, levando em consideração a estrutura do processo científico, figura 1.

Figura 1 - Delineamento científico do problema da quantificação da HFM



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

~~

5 – Conclusões

Os protocolos desenvolvidos de obtenção de anticorpos monoclonais murino dirigidos contra antígenos expressos na Hemácia Fetal Humana produziram anticorpos que reconhecem ambos os tipos de hemácias, adultas e fetais.

Os resultados obtidos na técnica de citometria de fluxo concluem que é possível utilizar o anti – CD71 como marcador de antígenos de superfície de hemácias fetais quando há a presença de eritroblastos na amostra.

Ambos os sistemas montados em eletrodo interdigitado de ouro que apresentaram resultados satisfatórios, FS/anti – CD71 e FS/anti – HbF e sistema montado em eletrodo impresso de carbono FS/anti – HbF, possuem um grande potencial para a aplicação de um imunossensor para detecção da hemorragia feto-materna, pois ambos demonstraram especificidade e detectaram a presença dos antígenos nas amostras testadas.

6 - Perspectivas

Reiniciar os protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais murinos usando amostras de hemácias de sangue de cordão umbilical com mais de 20% de eritroblastos utilizando a técnica de imunização subtrativa.

Ampliar os estudos de prova de conceito do desempenho dos imunossensores utilizando eletrodos interdigitados de ouro com anti – CD71 e anti – HbF e eletrodo impresso de carbono com anti – HbF, ambos utilizando como polímero a fibroína da seda, para compararmos as medidas dos sistemas montados com análises de citometria de fluxo, para então concluirmos a proposta de podermos utilizá-los na detecção da HFM.

Referências Bibliográficas

1. Maier JT, Chalinski E, Schneider W, Gottschalk U, Hellmeyer L. Fetomaternal hemorrhage (FMH), an update : review of literature and an illustrative case. Arch Gynecol Obstet [Internet]. 2015;292:595–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00404-015-3686-1>
2. Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal Hemorrhage. Obstet Gynecol. 2010;115(5):1039–51.
3. Gielezynska A, Stachurska A, Debska M, Muzyka K, Kraszewska E. Quantitative fetomaternal hemorrhage assessment with the use of five laboratory tests. Int Jnl Lab Hem. 2016;38:419–25.
4. Kim YA, Makar RS. Detection of fetomaternal hemorrhage. Am J Hematol. 2012;87:417–23.
5. Lubusky M. Prevention of RhD alloimmunization in RhD negative women. Biomed Pap. 2010;154(1):3–8.
6. Monošík R, Stred'anský M, Šturdík E. Biosensors - classification, characterization and new trends. Acta Chim Slovaca [Internet]. 2012;5(1):109–20. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/acs.2012.5.issue-1/v10188-012-0017-z/v10188-012-0017-z.xml>
7. Mc Naught AD, Wilkinson A. Compendium of Chemical Terminology - Gold Book. IUPAC Compend Chem Terminol [Internet]. 1997;1598. Available from: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf%5Cnhttp://goldbook.iupac.org/I03352.html%0Ahttp://goldbook.iupac.org/I03352.html%0Ahttp://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf%5Cnhttp://goldbook.iupac.org/I03352.html%0Ahttp://goldbook.iupac.org/A00547.html>
8. Brossard Y, Pons JC, Jrad I, Van Nifterik J, Gillot R, Saure C, et al. Maternal-fetal hemorrhage: A reappraisal. Vox Sang. 1996;71(2):103–7.
9. Wang Y. Vascular Biology of the Placenta. Colloq Ser Integr Syst Physiol From Mol to Funct [Internet]. 2010;2(1):1–98. Available from: <http://www.morganclaypool.com/doi/abs/10.4199/C00016ED1V01Y201008ISP009>
10. Kingdom JCP, Drewlo S. Is heparin a placental anticoagulant in high-risk pregnancies? Blood. 2011;118(18):4780–8.
11. Uriel M, Subirá D, Plaza J, Castañón S, Cañamares M, Recasens JD.

- Identification of feto-maternal haemorrhage around labour using flow cytometry immunophenotyping. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;151(1):20–5.
12. Carmona E, Padilla MC, Caño A, De Paco C. Hemorragia fetomaterna masiva. Caso clínico. *Clin Invest Ginecol Obstet.* 2005;32(6):268–71.
 13. Sebring ES, Polesky HF. Fetomaternal hemorrhage: incidence, risk factors, time of occurrence, and clinical effects. *Transfusion.* 1990;30(4):344–57.
 14. Branger B, Winer N. Epidemiology of anti-D allo-immunization during pregnancy. *J Gynecol Obs Biol Reprod.* 2006;35:87–92.
 15. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Spong CY, Dashe JS, Hoffman BL, et al. Distúrbios fetais. In: Amgh, editor. *Obstetrícia de Williams.* 24^a. 2016. p. 306–15.
 16. Fernandes BJ, Dadelszen P Von, Fazal I, Bansil N, Ryan G. Flow cytometric assessment of feto-maternal hemorrhage ; a comparison with Betke – Kleihauer. *Wiley Intersci.* 2007;27:641–3.
 17. Kennedy GA, Shaw R, Just S, Bryson G, Battistutta F, Rowell J, et al. Quantification of feto-maternal haemorrhage (FMH) by flow cytometry: Anti-fetal haemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with anti-D. *Transfus Med.* 2003;13(1):25–33.
 18. Singh P, Swanson T. Acute and Chronic Fetal Anemia as a Result of Fetomaternal Hemorrhage. *Case Rep Obstet Gynecol [Internet].* 2014;2014:1–4. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/crig/2014/296463/>
 19. Urgessa F, Tsegaye A, Gebrehiwot Y, Birhanu A. Assessment of feto-maternal hemorrhage among rhesus D negative pregnant mothers using the kleihauer-betke test (KBT) and flow cytometry (FCM) in Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2014;14(1):1–7.
 20. Koby L, Grunbaum A, Benjamin A, Koby R, Abenhaim HA. Anti-D in Rh(D)-Negative Pregnant Women: Are At-Risk Pregnancies and Deliveries Receiving Appropriate Prophylaxis? *J Obstet Gynaecol Canada [Internet].* 2012;34(5):429–35. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)35239-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1701-2163(16)35239-2)
 21. Carles D, André G, Pelluard F, Martin O, Sauvestre F. Pathological Findings in Feto-Maternal Hemorrhage. *Pediatr Dev Pathol [Internet].* 2014;17(2):102–6. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.2350/13-12-1419-OA.1>
 22. Marciano A, Luca L Di, Maranella E, Natale C Di, Pannone V, Fabio S Di. How to manage fetomaternal hemorrhage ? Description of five cases and literature

- review. *J Pediatr neonatal Individ Med*. 2018;7(1):1–8.
23. Zipursky A, Pollok J, Neelands P, Chown B, Israels L. Transplacental Passage of Fetal Red Blood Cells and Pathogenesis of Rh Immunization During Pregnancy. *Lancet* [Internet]. 1963 Nov 9;2:489–94. Available from: <https://dx.doi.org/10.1001/jama.1963.03710060127124>
 24. Kaplan C, Fforestier F, Daffos F, Tchernia G, Walters A. Manegement of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Med Rev*. 1996;10:233–40.
 25. Nelson J. Non-host cells in the pathogenesis of autoimmune disease : a new paradigm ? *Ann Rheum Dis*. 1999;58(9):518–20.
 26. KLEIHAUER E, BRAUN H, BETKE K. Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear. *Klin Wochenschr*. 1957;35:637–8.
 27. Wong L, Hunsberger BC, Bagwell CB, Davis BH, Davis BH. Automated quantitation of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry for HbF-containing fetal red blood cells using probability state modeling. *Int Jnl Lab Hem*. 2013;35:548–54.
 28. Dziegiel MH, Nielsen LK, Berkowicz A. Detecting fetomaternal hemorrhage by flow cytometry. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):490–5.
 29. Lopes AFG. Detecção de hemorragia feto-materna pela técnica de kleihauer-Betke. 1996.
 30. Mittal K, Marwaha N, Kumar P, Saha S, Thakral B. Comparison of estimation of volume of fetomaternal hemorrhage using Kleihauer-Betke test and microcolumn gel method in D-negative nonisoimmunized mothers. *Immunohematology*. 2013;29(3):105–9.
 31. Othman J, Orellana D, Chen LS, Russell M, Khoo T. The Presence of F Cells with a Fetal Phenotype in Adults with Hemoglobinopathies Limits the Utility of Flow Cytometry for Quantitation of Fetomaternal Hemorrhage. *Cytom B Clin Cytom*. 2018;94(4):695–8.
 32. Abbas, Abul K.; Lichtman AH. *Imunologia Básica - Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. 3ª Elsevier, editor. 2009. 314 p.
 33. Levinson W. *Review of medical microbiology and immunology*. 10ª, editor. 2010. 426 p.
 34. KÖHLER, G.; MILSTEIN C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495–7.
 35. Zola H. *Monoclonal Antibodies - The second generation*. 1995. 21 p.

36. David HEL. Antibodies A Laboratory Manual. 1988. 148-212 p.
37. Goding JW. Monoclonal Antibodies: Principles and Praticce. 2^a. 1988. 5-93 p.
38. Liu JKH. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg* [Internet]. 2014;3(4):113–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amsu.2014.09.001>
39. Jian A, Tang X, Feng Q, Duan Q, Ji J, Ma Z, et al. A PDMS surface stress biosensor with optimized micro-membrane: Fabrication and application. *Sensors Actuators, B Chem* [Internet]. 2017;242:969–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.157>
40. Luppia PB, Müller C, Schlichtiger A, Schlebusch H. Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2011;30(6):887–98.
41. Turner APF. Biosensors: Sense and sensibility. *Chem Soc Rev.* 2013;42(8):3184–96.
42. Sang S, Zhao Y, Zhang W, Li P, Hu J, Li G. Surface stress-based biosensors. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2014;51:124–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.033>
43. Warade J. Organization of the POCT unit. 26:125–32.
44. YAMANAKA, H.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I.; FERREIRA AAP. Biossensores eletroquímicos. Boreal L, editor. 2009. 104 p.
45. Liu, Benjamin L.; Saltman MA. Immunosensor Technology. *CE Updat - Chem II* [Internet]. 1996;27(2):109–15. Available from: https://watermark.silverchair.com/labmed27-0109.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAcYwggHCBgkqhkiG9w0BBwagggGzMIIBrwIBADCCAagGCSqGSib3DQEHATAeBglghkgBZQMEAS4wEQQMAb-Jlv6nq7O893KCAgEQglIBeY2JJbys2PSFKP98z-4zLvQoyy0qdE0aimd9b6C3i
46. Qu Y, Sun Q, Xiao F, Shi G, Jin L. Layer-by-Layer self-assembled acetylcholinesterase/PAMAM-Au on CNTs modified electrode for sensing pesticides. *Bioelectrochemistry* [Internet]. 2010;77(2):139–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.08.001>
47. Ahn J, Lee TH, Li T, Heo K, Hong S, Ko J, et al. Electrical immunosensor based on a submicron-gap interdigitated electrode and gold enhancement. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2011;26(12):4690–6. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.05.027>
48. MacKay S, Hermansen P, Wishart D, Chen J. Simulations of interdigitated electrode interactions with gold nanoparticles for impedance-based biosensing applications. *Sensors (Switzerland)*. 2015;15(9):22192–208.
 49. Hatada, M.; Tsugawa, W.; Kamio, E; Loew, N.; Klonoff, D. C.; Sode K. Development of a screen-printed carbon electrode based disposable enzyme sensor strip for the measurement of glycated albumin. *Elsevier*. 2017;88:167–73.
 50. Ehret R, Ehret R, Baumann W, Baumann W, Brischwein M, Brischwein M, et al. Monitoring of cellular behaviour interdigitated AG Medizinische impedance measurements on electrode structures. *Biosens Bioelectron*. 1997;12:29–41.
 51. Carvalho LA De, Bueno PR, Química I De, Paulista UE, Sp A. Espectroscopia De Impedância Eletroquímica Aplicada Ao Estudo Das Reações. 2006;29(4):796–804.
 52. Taylor DM, Macdonald AG. AC admittance of the metal/insulator/electrolyte interface. *Phys D Appl Phys*. 1987;20:1277.
 53. BARD, A. J.; FAULKNER LR. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*. 2^a. New York: John Wiley & Sons, editor. 2001. 856 p.
 54. SKOOG, D.A. *Principles of instrumental analysis*. Philadelphia: Orlando H, Publishers BC, editors. 1998. 299-444 p.
 55. Liu N, Chen X, Ma Z. Ionic liquid functionalized graphene/Au nanocomposites and its application for electrochemical immunosensor. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2013;48:33–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2013.03.080>
 56. Zhu Y, Cao Y, Sun X, Wang X. Amperometric immunosensor for carbofuran detection based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPS-antibody conjugate. *Sensors (Switzerland)*. 2013;13(4):5286–301.
 57. Jia J, Wu A, Luan S. Spectrometry recognition of polyethyleneimine towards heavy metal ions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2014;449(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.02.032>
 58. Feng J, Ju Y, Liu J, Zhang H, Chen X. Polyethyleneimine-templated copper nanoclusters via ascorbic acid reduction approach as ferric ion sensor. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2015;854:153–60. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.024>
59. Moraes M, Lima L, Silva R, Cavicchioli M, Ribeiro S. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. *Langmuir*. 2013;29(11):3829–34.
 60. Zhou C-Z. Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000;28(12):2413–9. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.12.2413>
 61. He YX, Zhang NN, Li WF, Jia N, Chen BY, Zhou K, et al. N-terminal domain of Bombyx mori fibroin mediates the assembly of silk in response to pH decrease. *J Mol Biol* [Internet]. 2012;418(3–4):197–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2012.02.040>
 62. Deffune E. Obtaining of murine monoclonal antibodies directed against the third component of the complement. In 1992.
 63. Deffune E. Procedimento Operacional Padrão (POP) - Laboratório de Engenharia Celular. 2009. p. 182.
 64. Hirvonen T, Suila H, Tiitinen S, Natunen S, Laukkanen M-L, Kotovuori A, et al. Production of a Recombinant Antibody Specific for i Blood Group Antigen, a Mesenchymal Stem Cell Marker. *Biores Open Access* [Internet]. 2013;2(5):336–45. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/biores.2013.0026>
 65. Beiguelman B. Os Sistemas Sanguíneos Eritrocitários. 3rd ed. FUNPEC, editor. 2003. 195 p.
 66. Prus E, Fibach E. Heterogeneity of F cells in ??-thalassemia. *Transfusion*. 2013;53(3):499–504.
 67. Alberts B. Bruce Alberts - Biologia Molecular da Célula, 5ª Edição (Artmed).pdf. 5ª. Artmed, editor. 2010. 1728 p.
 68. Wood B. Multicolor immunophenotyping: human immune system hematopoiesis. *Methods Cell Biol*. 2004;75:559–76.
 69. Lüdemann I, Pörtner R, Märkl H. Influence of the pH on the ammonia sensitivity of a murine hybridoma cell line. In: RE Spier JG e WB, editor. *Animal Cell Technology Products of Today, Prospects for Tomorrow*. 1994. p. 152–4.
 70. Ivarsson M, Noh H, Morbidelli M, Soos M. Insights into pH-Induced Metabolic Switch by Flux Balance Analysis. *Biotechnol Prog*. 2015;31(2):347–57.
 71. Holzlöhner P, Hanack K. Generation of Murine Monoclonal Antibodies by

- Hybridoma Technology. *J Vis Exp*. 2017;119:1–7.
72. Almeida R, Nakamura C, Fontes M, Deffune E, Felisbino S, Kaneno R, et al. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. *MAbs*. 2018;10(1):46–54.
 73. Marusich MF. Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes. *J Immunol Methods*. 1988;114:155–9.
 74. Wang S, Liu M, Zeng D, Qiu W, Ma P, Yu Y, et al. Increasing stability of antibody via antibody engineering: Stability engineering on an anti-hVEGF. *Proteins*. 2014;82(10):2620–30.
 75. Neergaard M, Nielsen A, Parshad H, Van De Weert M. Stability of monoclonal antibodies at high-concentration: head-to-head comparison of the IgG1 and IgG4 subclass. *J Pharm Sci*. 2014;103(1):115–27.
 76. Liao C, Carlson BA, Paulson RF, Prabhu KS. Free Radical Biology and Medicine The intricate role of selenium and selenoproteins in erythropoiesis. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2018;127(April):165–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.578>
 77. Davis BH, Olsen S, Bigelow NC, Chen JC. Detection of fetal red cells in fetomaternal hemorrhage using a fetal hemoglobin monoclonal antibody by flow cytometry. *Transfusion*. 1998;38(8):749–56.
 78. Kumpel B, Hazell M, Guest A, Dixey J, Mushens R, Bishop D, et al. Accurate quantitation of D+ fetomaternal hemorrhage by flow cytometry using a novel reagent to eliminate granulocytes from analysis. *Transfusion*. 2014;54:1305–16.
 79. Chambers E, Davies L, Evans S, Birchall J, Kumpel B. Comparison of haemoglobin F detection by the acid elution test, flow cytometry and high-performance liquid chromatography in maternal blood samples analysed for fetomaternal haemorrhage. *Transfus Med*. 2012;22(3):199–204.
 80. Thom CS, Dickson CF, Gell DA, Weiss MJ. Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(3).