



**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 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”, 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

1.1 – Hemorragia feto – materna HFM

A hemorragia feto-materna (HFM) se dá pela transferência do sangue fetal para o compartimento intravascular materno, devido à ruptura na membrana vásculo-sincicial da placenta.⁸

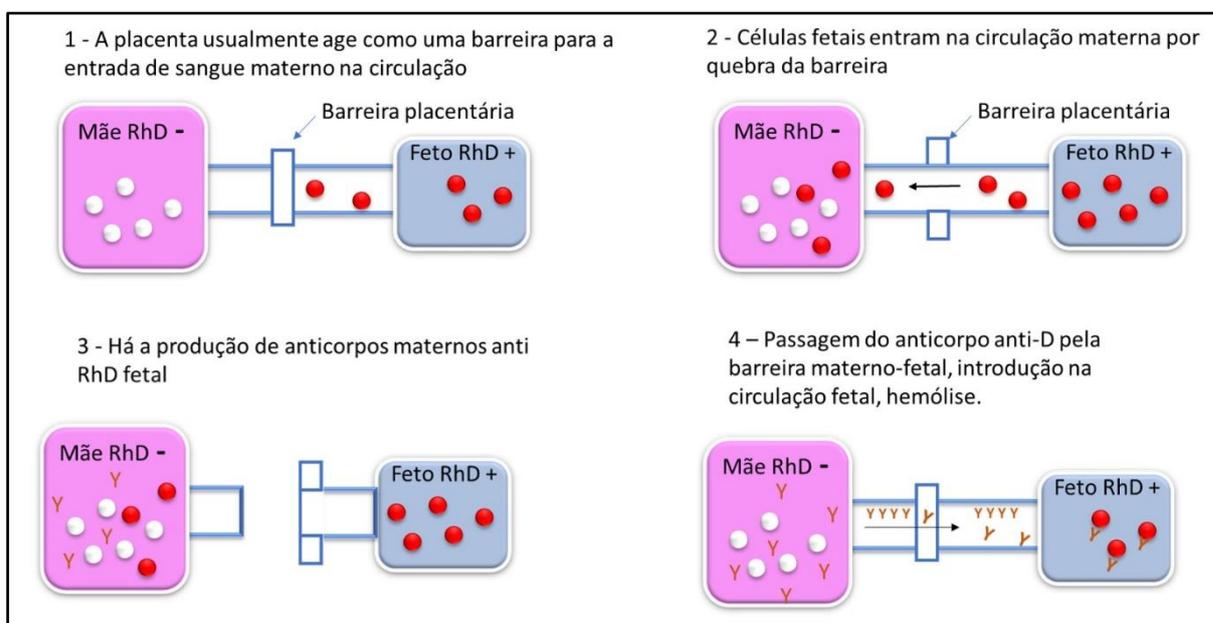
Em uma gestação normal, a placenta apresenta um fluxo sanguíneo da mãe para o feto, garantindo as trocas gasosas materno-fetais, a nutrição do feto, eliminação de excretas e estimulando a produção de hormônios e enzimas específicas. A placenta usualmente age como uma barreira para a entrada de hemácias/células fetais na circulação materna, mas nesta atividade contínua uma pequena quantidade de eritrócitos fetais atravessa a barreira placentária, por quebra deste equilíbrio de barreira.^{9,10} Desta forma ocorre a exposição da mãe a antígenos

fetais herdados do pai, que a partir de então passam a ser considerados como não-próprios e desencadeiam toda a cascata de eventos que envolve a aloimunização materna.¹¹

Muitas são as causas que podem vir a ter como consequência a HFM, como alterações placentárias, pré-eclâmpsia, choque hemorrágico materno, trauma materno-abdominal, trabalho de parto prolongado^{12,13} entre outros.

As consequências podem ser tanto para a mãe, aloimunização materna na gestação corrente ou em futuras, em destaque aloimunização RhD (figura 2), quando a mulher é RhD-negativo e o feto é RhD-positivo e então esta passa a produzir anticorpos contra os eritrócitos fetais gerando consequências para o feto como, doença hemolítica perinatal que pode desencadear a anemia fetal, que por sua vez pode levar a insuficiência cardíaca, hidropsia fetal, e por fim, morte fetal.^{14,15}

Figura 2 - Representação esquemática do sistema de barreira da placenta e sua respectiva quebra com inversão parcial de fluxo sanguíneo



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Detectar e quantificar a HFM ajuda a prevenir suas consequências, como a aloimunização por RhD, controlar a suspeita de descolamento prematuro da placenta e/ou anemia fetal¹⁶, neste caso há medidas profiláticas. Para uma adequada imunoprofilaxia, a quantificação precisa da HFM se faz necessária para calcular a dose de Ig anti-D.¹⁷

Embora não haja uma definição universalmente aceita do grau de transferência de eritrócitos do feto que constitui HFM, um volume de sangue variando entre 10 e 150mL foram propostos. Trinta mililitros de HFM são frequentemente utilizados como limiar para administração de imunoglobulina (Ig) anti-RhD, a fim de prevenir a sensibilização RhD.¹⁸ Todas as mulheres RhD-negativo que tenha filhos RhD-positivo devem receber pelo menos uma dose única de 300 μ g de Ig anti – RhD dentro de 72 horas após o parto. Além disso uma amostra materna deve ser colhida em 1 hora após o parto para evidenciar a existência da HFM. Aproximadamente 17% dessas mulheres se tornam aloimunizadas se a dose de Ig anti – RhD não for administrada corretamente.¹⁹

Estudos demonstraram que a administração de uma dose adicional de Ig anti – RhD pré-parto no terceiro trimestre pode reduzir em 10 vezes a aloimunização, reduzindo para 0,1% a 0,2%.²⁰

A causa da natimortalidade secundária à HFM envolve a redução progressiva da oxigenação fetal que determina a liberação de catecolaminas e diminui o crescimento fetal. Esta associação leva a descompensação fetal progressiva, acidose metabólica, descompensação cerebral e miocárdica, bradicardia e falência de múltiplos órgãos.^{4,21}

A HFM, portanto, definida como a passagem de sangue da circulação fetal para a materna antes ou durante o parto tem sua incidência bastante variável conforme a literatura consultada, variando de 1/300 a 1/1500 nascimentos.^{4,18} Os dados mundiais são mais homogêneos quando se referem à taxa de natimortos decorrente da HFM: 0,04%. De maneira geral, os autores afirmam que: 1) a HFM pode ocorrer em gestações, sem quaisquer fatores de risco materno e fetal; 2) não há definição clara do quanto de sangue caracteriza efetivamente a HFM, mas que a incidência apontada pelos autores, como discrepante, é função do volume passado do feto para a mãe, de difícil cálculo exato, mas quanto maior o volume, maiores as consequências; 3) a terminologia de HFM maciça é utilizada quando pelo menos de 30mL a 80mL de sangue fetal atinjam a circulação materna; 4) quanto ao grau da HFM, elas podem ser definidas como leve, moderada e maciça e 5) considerados todos os graus, a incidência do evento aumenta com a progressão da gestação (figura 3). Como pode ser observado, no primeiro trimestre a probabilidade é de apenas 4%, aumentando progressivamente, sendo que na hora do parto, esta probabilidade pode atingir 60%.²¹

Figura 3 - Percentual de probabilidade de ocorrência da HFM segundo o momento da gestação



Fonte: Adaptado de Marciano et al.²²

A detecção da HFM é feita após a identificação pela mãe, de que há diminuição dos movimentos fetais. A primeira análise realizada é por meio do ultrassom, para a identificação da mudança do padrão vascular sinusoidal, que pode ser ineficaz em função da geração do equipamento e mesmo pela deficiência na interpretação. O padrão ouro do diagnóstico envolve a realização do Doppler fetal para a identificação da velocidade sistólica do pico da artéria cerebral média. A medida do Doppler tem um papel importante na avaliação e acompanhamento da suspeita de HFM e anemia fetal¹⁵, no entanto não é um exame disponível em todas as maternidades brasileiras. O terceiro pilar diagnóstico da HFM está na investigação laboratorial.

A HFM teve seus estudos aprofundados com a descrição do teste diagnóstico de eluição ácida por Kleihauer e Betke (K-B) em 1957, que diferencia a hemoglobina fetal (HbF) daquelas contendo hemoglobina adulta, por meio da resistência a eluição ácida que a primeira apresenta. Em 1963 Zipursky²³ correlacionou a HFM a doença hemolítica perinatal (DHPN) também denominada de doença hemolítica do recém-nascido. Em 1996 Kaplan²⁴ correlacionou a mesma com casos de trombocitopenia neonatal. Em 1999 Nelson²⁵ constata que há relação entre a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) com a ocorrência da HFM em recém-nascidos e possivelmente na gênese de doenças auto-imunes.

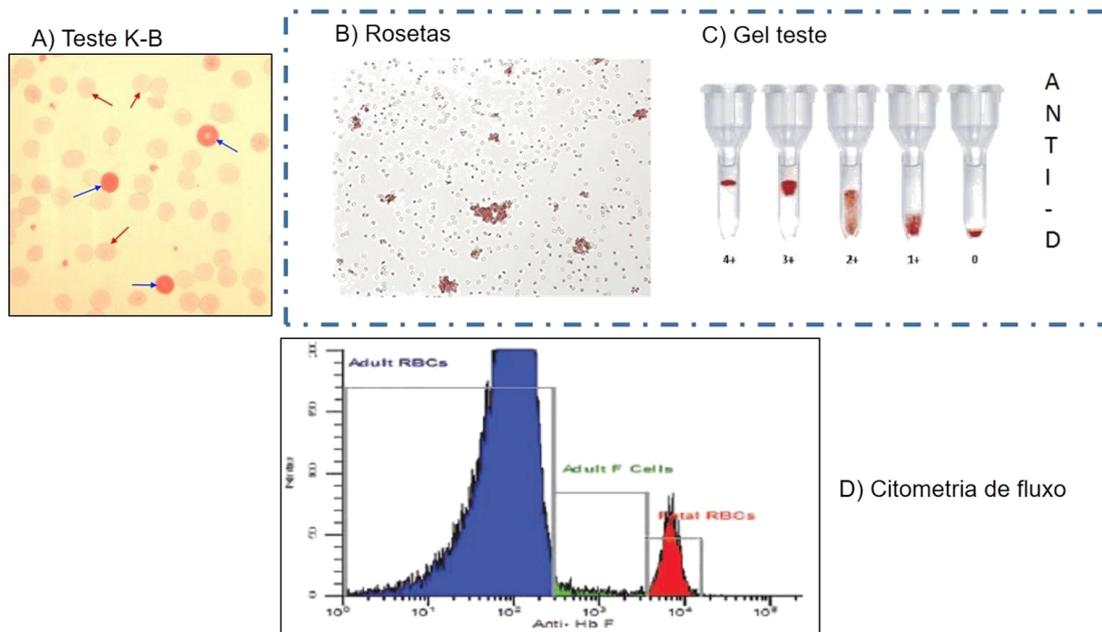
Tendo em vista a importância do diagnóstico laboratorial na detecção e quantificação da HFM pode-se destacar alguns testes disponíveis, entre eles, o teste

quantitativo de K-B, como mencionado anteriormente, este detecta hemácias fetais que contém hemoglobina fetal (HbF) na circulação materna, devido estas serem resistentes a eluição ácida diferindo-as das hemácias que contem hemoglobina adulta, que ao serem expostas ao ácido ficam como fantasmas (figura 4 - A)¹⁷. Através deste teste é realizado a contagem das células fetais, a fim de quantificar a presença destas estabelecendo a quantia em determinado volume, caracterizando a ocorrência de HFM.²⁶

O teste de Roseta também utilizado, é um método altamente sensível para detectar qualitativamente 10 mL ou mais de sangue fetal, ou 0,2% de células fetais na circulação materna (figura 4 - B)⁴. O gel teste (figura 4 - C), surgido posteriormente tem sido usado, mas à exemplo do teste de roseta, ambos são usados apenas quando há incompatibilidade RhD, portanto são limitados. Trabalhos recentes apontam que estes testes devem ser seguidos de testes de confirmação, podendo ser considerados o teste de K-B ou a citometria de fluxo.

Outros métodos foram introduzidos para avaliar os mais diversos aspectos da HFM, entre eles a Citometria de fluxo (CTF), considerada uma técnica sensível, e de melhor reprodutibilidade e precisão comparado ao método K-B.²⁷ Na CTF é utilizado anticorpo monoclonal conjugado com Fluorocromo para detecção da HbF. A HbF é distinguida da hemoglobina adulta pela sua fluorescência após coloração com o anticorpo (figura 4 - D). As indicações para o uso de CTF para detecção de HFM se dividem em dois grupos principais: uma necessidade aguda de um diagnóstico para gerenciar uma emergência clínica e uma necessidade não aguda de investigar possíveis causas de morte fetal inexplicada.²⁸

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.



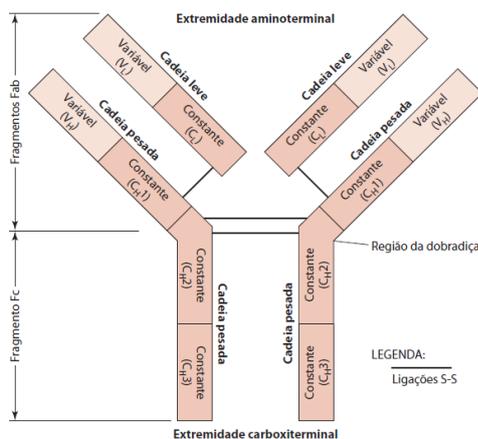
Fonte: Imagens obtidas de: A) Lopes²⁹; B) e D) Kim⁴; C) ipsemg.mg.gov.br

Ambos os testes possuem vantagens e limitações, sendo assim vale ressaltar os trabalhos que compararam as técnicas. Em 2013, Mittal et al.³⁰ compararam as técnicas de gel teste e K-B com as demais, considerando que estas são as melhores para a quantificação de grandes volumes de HFM, enquanto que Othman et al.³¹ ressaltam que a presença de hemoglobina Fetal em adultos portadores de hemoglobinopatias limitam o uso da CTF para quantificação da HFM.

1.2 – Anticorpos monoclonais

Anticorpo é um tipo de molécula de glicoproteína, também chamada imunoglobulina (Ig) (figura 5), produzida pelos linfócitos B que unem os antígenos, geralmente com um alto grau de especificidade e afinidade. A unidade estrutural básica de um anticorpo é composta de duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. As regiões variáveis terminais das cadeias leves e pesadas formam os locais de ligação do antígeno, enquanto as regiões constantes terminais das cadeias pesadas interagem funcionalmente com outras moléculas no sistema imunológico.³²

Figura 5 - Representação esquemática de uma unidade básica de imunoglobulina



Fonte: Imagem obtida de Levinson³³

Os anticorpos monoclonais (AcMm) são anticorpos produzidos contra antígenos específicos e são originados a partir de um único clone de célula.³³

Em 1975, Köhler e Milstein descobriram que era possível obter quantidades ilimitadas de anticorpos com especificidade predeterminada pela fusão de linfócitos B com células de mieloma de camundongo, obtendo assim células de infinita proliferação secretoras de anticorpos, os hibridomas.³⁴

O primeiro estágio na produção de AcMm é a imunização. Animais podem produzir anticorpos contra uma ampla gama de estruturas moleculares. Existem protocolos variados para imunização de animais. Geralmente, antígenos em formas agregadas são mais imunogênicos do que proteínas monoméricas.³⁵

Na técnica, as células mais utilizadas são de animais camundongos BALB/c, são utilizados os linfócitos B do animal previamente imunizado com o antígeno de interesse e as células de mieloma múltiplo murino. O mieloma murino pode ser induzido quando injetado óleo mineral na cavidade peritoneal do animal. As células de mieloma derivadas de camundongo Balb/C são comumente utilizadas como parceiras de fusão devido estas possuírem a maquinaria celular necessária para secretar anticorpos.³⁶

A obtenção dos híbridos é feita através da fusão entre as células de mieloma e os linfócitos B, secretores de anticorpos, esta fusão pode ser realizada comumente de maneira química com o Polietilenoglicol (PEG). A primeira demonstração de fusão com PEG foi demonstrado por Pontecorvo em 1975, e desde então é o método mais utilizado por ser um procedimento rápido e de fácil manuseio. Este, funde as membranas plasmáticas do mieloma e/ou linfócitos B, e células multinucleadas são

formadas (heterocariose). Na próxima divisão celular os núcleos das células heterocarióticas formadas se fundem e as células filhas passam a ter o material genético das células fusionadas.³⁷

Após a fusão obtém-se células multinucleadas, como mencionado anteriormente, e o produto desta fusão é mal controlado, isto é, pode-se obter a fusão de Linfócitos/Linfocitos, Mieloma/Mieloma e Mieloma/Linfocitos, sendo assim, necessário realizar um processo de seleção dos híbridos de interesse. Para esta seleção é utilizado o meio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina).³⁸ O mecanismo pelo qual o meio HAT seleciona os híbridos se deve que a síntese de ácidos nucléicos pode seguir duas rotas: a “*de novo*” e a “*selvagem*”. Todas as células normais utilizam a rota *de novo*, mas se ela for bloqueada, a célula passa a utilizar a rota *selvagem*. A rota *selvagem* para sintetizar purinas usa hipoxantina e guanina como substrato que são formados por ribose fosfato-inosínico e guanina acidoribose fosfato, respectivamente, com ajuda da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT). Similarmente, a rota *selvagem* para síntese de piridina usa o substrato deoxitimidina para formar timidina monofosfato usando a enzima timidina kinase (TK). Caso ambas as rotas forem bloqueadas, ocorrerá morte celular, sendo assim, as células fusionadas Linfócitos/Linfocitos, Mieloma/Mieloma e as células de mieloma não fusionados morreram quando submetidas a este meio de cultura, já os linfócitos B (esplenócitos) não fusionados morreram naturalmente devido ao seu tempo de vida limitado.^{36,37}

Os híbridos são os únicos capazes de crescer e se multiplicarem neste meio. Inicialmente a cultura celular dos híbridos contém uma mistura de anticorpos, devido a obtenção diversificada de clones de linfócitos B, cada um segregando o seu próprio anticorpo no meio de cultura. Cada clone pode ser separado através de diluição limitante em diferentes poços, para verificar a especificidade de cada anticorpo produzido, estes poços então são testados individualmente, e quando positivos são reclonados para avaliar a produção dos anticorpos novamente.³⁸

A produção de AcMm tem sido aplicada para diversos fins, para uso terapêutico, diagnóstico de doenças humanas e animais, identificação de moléculas, identificação viral, entre outros.

1.3 – Biossensor

Os biossensores desempenham um papel cada vez mais importante em muitas áreas da prática biológica e médica contemporânea, como engenharia de tecidos, engenharia celular, diagnósticos, farmacologia, bem como pesquisa de DNA e proteína.³⁹

De acordo com a definição da IUPAC, um biossensor é um dispositivo analítico para a detecção de analitos que combina um componente biológico com um componente de detecção físico-químico. Isso geralmente ocorre através do uso de sistemas de análise miniaturizados, onde os componentes biológicos são imobilizados em uma superfície de estado sólido, que por sua vez interage com o analito. Essas interações podem ser detectadas usando métodos elétricos, eletroquímicos e ou ópticos.⁴⁰

O conceito básico de biossensor foi elucidado pela primeira vez por Leyland C. Clark em 1962 em sua descrição de um eletrodo enzimático. O exemplo clássico foi a oxidase de glicose imobilizada (GOx), que converteu um simples eletrodo de platina em um poderoso instrumento analítico para a detecção de glicose em amostras humanas de pessoas com diabetes. Duas décadas depois, os transdutores ópticos foram aproveitados em conjunto com os anticorpos para criar monitores de bioafinidade em tempo real. Esses imunossensores lançaram as bases para a segunda linha evolutiva importante de instrumentação de biossensores.⁴¹

Os biossensores, especialmente os sistemas portáteis *Point – of – Care* (PoC), atraem uma atenção considerável com o desenvolvimento da tecnologia sistemas micro – eletromecânicos biológicos (BioMEMS) e da aplicação miniaturizada.⁴²

O *Point – of – Care Testing* (PoCT) evoluiu como uma parte importante da medicina laboratorial em virtude de sua compacidade, portabilidade e viabilidade de operação por pessoal não-laboratorial, onde métodos de testes rápidos e precisos são uma preocupação primária e, como resultado, melhorando o atendimento ao paciente.⁴³

1.3.1 – Imunossensor

Um tipo de biossensor, o imunossensor, é projetado para detectar a ligação direta de um anticorpo ou antígeno para formar um imunocomplexo na superfície do transdutor, que converte o sinal biológico de imunoafinidade em um sinal mensurável.⁴⁴

O princípio fundamental subjacente à tecnologia de biossensores é o requisito de ligação íntima para detecção direta. O elemento biológico está ligado "intimamente" (por exemplo, afixado, adsorvido, quimicamente ligado, aderido ou de outra forma em contato físico direto) com o transdutor para que ocorra "detecção direta" do evento de ligação.⁴⁵ A técnica *Layer - by - Layer (LbL)*, camada por camada, tem sido largamente empregada na imobilização de proteínas e outras biomoléculas, permitindo esta ligação íntima.⁴⁶

Existem vários métodos de detecção de sinal para imunossensores, tais como elétricos, eletroquímicos, ópticos e de massa. Entre estes, os métodos de detecção elétrica oferecem as vantagens da facilidade na medição de sinais e na miniaturização de dispositivos.⁴⁷

A transdução de sinal em imunossensores pode ser realizada por diferentes meios, aproveitando as diferentes mudanças de propriedades ou geração de sinal, que ocorre após a formação do complexo antígeno-anticorpo.⁴⁵

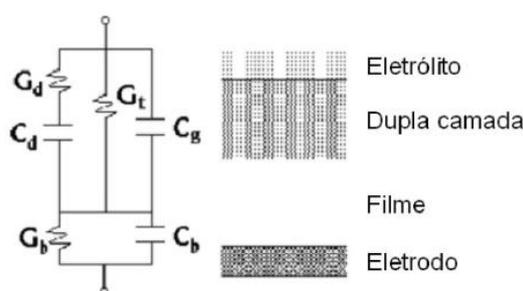
As técnicas de detecção elétrica e eletroquímica são particularmente adequadas por ser de detecção rápida e simples, estas trabalham medindo as mudanças nas propriedades elétricas causadas pela presença de alvos biológicos específicos, estas mudanças podem ser causadas por interferência em campos elétricos. Eletrodos (geralmente de ouro) são usados como interfaces tanto na aplicação de campos elétricos às amostras testadas quanto como método de transmissão e medição de sinais elétricos de detecção⁴⁸, assim como também são utilizados os eletrodos impressos de carbono nas detecções eletroquímicas.⁴⁹

Para as medições elétricas os tipos de sinal elétrico também variam dependendo da aplicação e podem ser medidas simples de impedância ou resistência⁵⁰, medições de capacitância, ou espectroscopia elétrica, tomando medidas ao longo de uma gama de frequências.⁴⁸

A técnica de espectroscopia de impedância é uma técnica de caracterização elétrica, que permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um

número grande de processos intercorrelacionados, ocorre em diferentes velocidades. Medidas de espectroscopia de impedância fornece uma visão detalhada das características elétricas da interface entre o eletrodo e a solução.⁵¹ Assim, um eletrodo metálico é recoberto uniformemente com uma camada isolante ou semi-isolante do material de interesse, quando o eletrodo está imerso em solução eletrolítica uma dupla camada elétrica se forma na superfície do material com a aplicação de uma faixa de corrente alternada. A interpretação da resposta do sistema eletrodo/solução é analisada geralmente através de um modelo de circuito elétrico equivalente descrito por Taylor e MacDonald⁵², como demonstrado na figura 6.

Figura 6 - Circuito equivalente para um eletrodo metálico recoberto com filme pouco condutor



Fonte: Imagem obtida de Taylor e Macdonald⁵²

Para as medidas eletroquímicas comumente é utilizada a voltametria, uma técnica baseada nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a fina camada de solução próxima a essa superfície.⁵³ Sendo possível obter informações quantitativas e qualitativas de uma espécie química por meio do registro de curvas de corrente versus potencial obtidas durante a eletrólise ou adsorção dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída de pelo menos um eletrodo de trabalho e outro de referência.⁵⁴

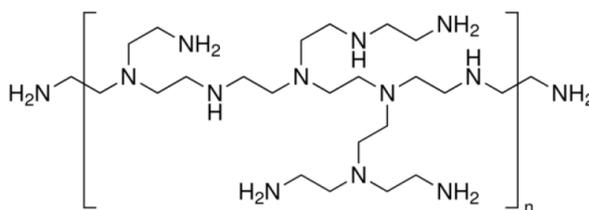
O imunossensor eletroquímico oferece uma série de vantagens significativas, incluindo alta sensibilidade, resposta rápida, simplicidade, fácil miniaturização e custo relativamente baixo. Para um imunossensor eletroquímico, seu desempenho é criticamente dependente das propriedades da interface do eletrodo. A estrutura, a condutividade, a área superficial específica e a biocompatibilidade da interface do eletrodo desempenham um papel crucial na transdução do sinal de interface eletroquímica.⁵⁵

1.3.2 – Polímeros

Matrizes poliméricas são aderidas ou adsorvidas na superfície de eletrodos para imobilização de substâncias de interesse e por auxiliar na condutividade elétrica.⁵⁶

A polietileno imina (**PEI**), é um polieletrólito neutro rico em amina que se torna catiônico em água, ou seja, possui cátions ativos. Isso é favorecido por conter uma elevada densidade de grupos aminas primários, secundários e terciários, como apresentado na figura 7. É bem conhecido que a PEI ramificada, tem sido usado para uma ampla variedade de aplicações biológicas.⁵⁷

Figura 7 - Estrutura da cadeia polimérica da polietileno imina (PEI)

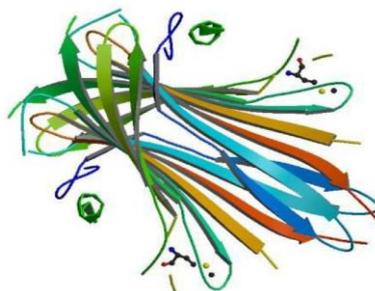


Fonte: Imagem obtida de Feng et al.⁵⁸

A fibroína da seda (**FS**) é um biopolímero extraído do casulo do bicho da seda, apresenta excelentes propriedades mecânicas e estruturais, além de ser biocompatível.⁵⁹

A FS produzida pela *Bombyx mori* consiste de duas cadeias polipeptídicas, uma pesada (H) e outra leve (L). A estrutura da fibroína de seda depende do meio, sendo que na forma cristalina apresenta estrutura predominantemente de folhas β (figura 8) e na estrutura solúvel em água as cadeias estão helicoidais e/ou aleatórias. A fibroína tem se mostrado eficiente para imobilização de biomoléculas via filmes *LbL*, pois em filmes *LbL* assume estrutura folha β favorecendo estrutura secundária de peptídeos.⁶⁰

Figura 8 - Estrutura da fibroína da seda (FS) produzida pelo bicho da seda *Bombyx mori*



Fonte: Imagem obtida de HE et al.⁶¹

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Produção de imunossensor para detecção rápida da HFM.

2.2 – Objetivos específicos

- ✓ Obter anticorpos monoclonais murino dirigidos contra Hemácia Fetal Humana.
- ✓ Construção e padronização do imunossensor para identificação e quantificação de Hemoglobina Fetal e/ou Hemácia Fetal Humana, a fim de identificar a HFM.

3 – Material e métodos

Este projeto obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu sob parecer nº2.183.782 e também da Comissão de Ética no Uso de Animais sob registro nº1223/2017, respeitando as exigências legais.

3.1 – Produção do anticorpo monoclonal murino (AcMm)

Para obtenção do AcMm, foi utilizada a técnica clássica descrita por Köhler e Milstein em 1975³⁴, modificada por Deffune em 1992⁶², esta técnica passou a ter grande impulso a partir do reconhecimento inequívoco da importância dos AcMm para diagnóstico e mais recentemente, para uso terapêutico.

3.1.1 – Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos - Balb/C (n=15) com até 6 semanas de idade.

Quanto ao planejamento estatístico/delineamento experimental, foram necessários 5 animais para cada grupo de imunização, um total de 2 grupos para imunização, ficando 5 animais para obtenção de timócitos. Os animais foram mantidos em gaiolas com ração e água *ad libitum*. Ficaram alojados no Biotério da Universidade onde estavam submetidas as condições necessárias para evitar ao máximo condições de estresse que comprometem a qualidade da imunização.

Após o período de imunização os mesmos foram levados ao Laboratório de Engenharia Celular (LEC) para a remoção do baço (esplenectomia) e processamento dos linfócitos para a fusão celular. Os últimos 5 animais, de menor idade (entre 2 e 3 semanas), ficaram reservados para o procedimento de timectomia e obtenção de *feeders cells*, estas células foram utilizadas por estas secretarem fatores de crescimento e servirem de células de companhia as células obtidas após a fusão.³⁶ Para estes procedimentos os animais foram anestesiados com xilazina 5 mg/kg por via intraperitoneal e ketamina 80 mg/kg, pela mesma via, foram induzidos a morte com uma sobredose de tiopental de 50mg/kg por via intra - peritoneal, quer no caso da esplenectomia, quer no caso da timectomia.

Ambos os procedimentos, esplenectomia e timectomia, foram realizados conforme protocolo operacional padrão (POP) do LEC⁶³. Após procedimento anestésico, os animais foram higienizados pela passagem em Hipoclorito a 1% e posteriormente em álcool 70º, colocados sobre leito cirúrgico previamente preparado, em cabine de segurança biológica Classe II-A. Utilizando luvas estéreis e material cirúrgico previamente autoclavado, foi realizada a incisão de pele e subcutâneo com auxílio de tesoura de ponta reta até a exposição do peritônio. Com auxílio de uma nova tesoura de ponta delicada é feita a incisão em peritônio com a exposição do baço. Pinça-se o pedículo esplênico com pinça anatômica, sem dentes, e corta-se o pedículo, pela parte superior da fixação da pinça.

Para a timectomia, os animais de 2 a 3 semanas foram submetidos a conduta inicial descrita acima. Após a tricotomia é realizada a abertura de pele e subcutâneo com auxílio de tesoura de ponta fina. Pinça-se o apêndice xifóide com pinça Kelly, e com a tesoura de ponta fina dissecam-se a parte inferior do gradil costal, cortando o

músculo diafragma. Lateralmente é procedido o rebate do gradil costal, previamente cortado à Esquerda e à Direita, para cima com a exposição do timo, órgão de cor esbranquiçada. Pinça-se o pedículo vascular e corta-se abaixo da pinça com o cuidado de não lesionar o órgão que é extremamente frágil. O mesmo é colocado em Placa de Petri para se proceder a dissociação e a obtenção das células em suspensão.

3.1.2 – Obtenção do antígeno

Amostras de sangue de cordão umbilical (SCU) foram obtidas após serem encaminhadas rotineiramente para a Agência Transfusional do Hemocentro de Botucatu para a realização de tipagem sanguínea, teste de Coombs direto do recém-nascido, estas foram segregadas após a realização destes exames, antes de serem descartadas. Portanto, nenhuma amostra de sangue de cordão foi exclusivamente coletada para o presente projeto. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado previamente.

O antígeno de interesse foi do grupo sanguíneo **II**, um antígeno de superfície de hemácias ligados ao sistema ABO, onde este grupo consiste em dois antígenos de hidratos de carbono poli-N-acetilactosamina estruturalmente relacionados **I** e **i**. Os fenótipos correspondentes são **I** ou **i**. As poli-N-acetilactosaminas (polilactosaminas, poli-LacNAc) consistem na repetição de unidades dissacarídica de N-acetilactosamina (LacNAc; Galb1-4GlcNAc, em que Gal é D-galactose e GlcNAc é N-acetil-D-glucosamina). As unidades LacNAc podem formar cadeias lineares (tipo **i**) ou ramificadas (tipo **I**). O antígeno linear **i** é abundantemente expresso na superfície dos eritrócitos embrionários e em eritrócitos durante período de eritropoiese alterada.⁶⁴ Conforme o desenvolvimento do indivíduo o antígeno **i** é substituído por **I**, podendo então ser utilizado como um marcador de hemácias fetais^{65,66}

Foi seguido o protocolo de obtenção do antígeno contra Hemácias Fetais (**HemF**). Para o protocolo as amostras foram submetidas a lavagem em solução salina isotônica estéril a 0,9% por seis vezes. Então, foi preparada uma suspensão de hemácias de sangue de cordão umbilical a 10%, ou seja, uma alíquota de sangue de cordão diluída em solução salina estéril.

3.1.3 – Imunização

Os animais, como mencionado em tópico anterior, foram camundongos de linhagem isogênica Balb/c, e as via de inoculação foram intraperitoneais (IP) no ciclo de 1 a 3 e endovenosa (EV) no *Booster* (quadro 1). A via IP é clássica para as imunizações, devido ao grande volume desta cavidade é permitida a inoculação de um volume maior do imunógeno e por evitar que atinja o sistema sanguíneo diretamente.³⁶

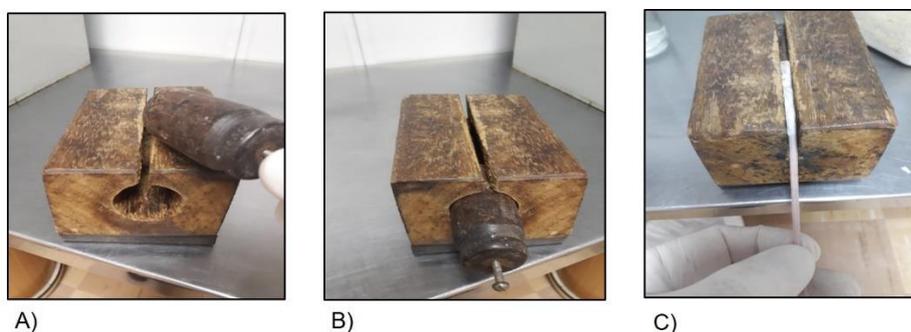
Antecedendo a fusão foi aplicado um reforço (*Booster*) do antígeno por via EV (figura 9 - C), para garantir que o antígeno seja percebido pelo sistema imunológico do animal, visto que a inoculação EV permite uma resposta forte e rápida, porém uma resposta de curta duração^{36,37}, por isso utilizada apenas como uma dose de reforço.

Quadro 1 - Protocolo de imunização utilizado

Ciclo	Dia	HemF	Via de inoculação
1º	D1	100µl	IP
2º	D+15	100µl	IP
3º	D+30	100µl	IP
<i>Booster</i>	4 dias antes da Fusão	50µl	EV

Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Figura 9 - Detalhe do protocolo de imunização: injeção endovenosa do *booster* - **A)** Dispositivo de contenção aberto; **B)** dispositivo de contenção fechado e **C)** imobilização do camundongo para inoculação.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

3.1.4 – Preparo das células NS1

Foram utilizadas células de mieloma murino, linhagem NS1 (figura 10), doadas pelo *Institute de Transfusion Sanguine de Paris/Institute Pasteur*. Estas células foram descongeladas 2 semanas antes da fusão conforme protocolo do laboratório, foi realizado teste de viabilidade para verificar se havia a presença de células vivas, para isto uma alíquota das células (30 μ l) foram misturadas a uma alíquota de azul tripan (30 μ l) e então observadas por microscopia. Verificada a presença de células vivas, estas foram então mantidas em frascos de cultura de células em suspensão com meio de cultura completo (meio enriquecido (RPMI) + 20% de Soro Fetal Bovino (SFB)) em estufa de CO₂ a 5% e a temperatura de 37°C.

Figura 10 - Microfotografia obtida por microscopia invertida de luz direta das células de mieloma múltiplo murino (NS1)



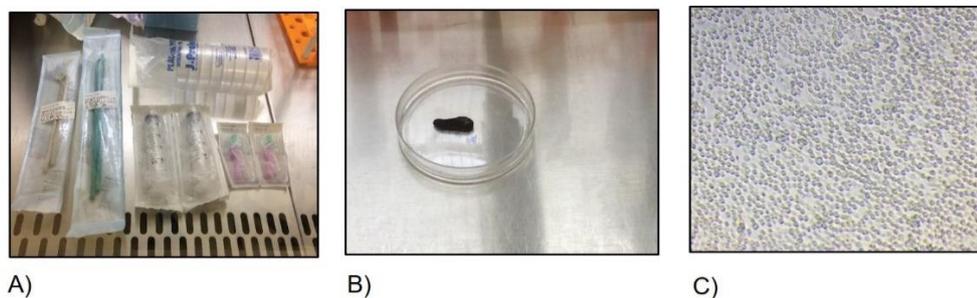
Fonte: Arquivo pessoal, 2018

3.1.5 – Preparo das células do Baço

Esplenócitos, linfócitos B secretores de anticorpos, foram obtidos do baço dos animais previamente imunizados, descrito em protocolo anterior. Estas células foram extraídas do órgão do animal conforme protocolo do LEC⁶³, foram utilizadas nesta técnica, *cell scrapers*, placas de Petri, agulhas e seringas de 20ml (figura 11 – A). Após a extração e lavagem das células com HEPES, o *pellet* celular foi suspenso em RPMI, retirada uma alíquota para contagem de células e em seguida foram armazenadas em tubo Falcon, de maneira vertical, em estufa de CO₂ a temperatura de 37°C até o momento da fusão. A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de tripan para realização da contagem de células

viáveis, ou seja, foram consideradas apenas as células vivas. Quando não foi possível realizar a fusão nos dias agendados os esplenócitos foram congelados.

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.



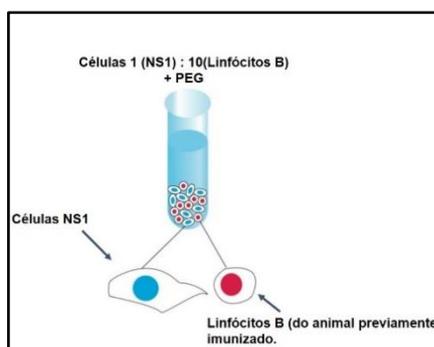
Fonte: Arquivo pessoal, 2018

3.1.6 – Fusão

O procedimento da fusão foi executado conforme Procedimento Operacional Padrão (POP) do LEC⁶³.

O processo de fusão celular foi realizado entre os linfócitos B dos animais imunizados com a linhagem mielomatosa denominada NS1, em fase exponencial de crescimento, na relação 1:10 (1 NS1 para cada 10 linfócitos) (figura 12). Foi utilizado o método químico na presença de PEG, PM 4.000³⁶ por este gerar poros na membrana celular permitindo a fusão do material genético entre as células em um processo de centrifugação. Após a contagem celular das células do baço e das células NS1, foram realizados os cálculos de volume/volume dos produtos que foram utilizados no procedimento, como, o volume de PEG, SFB e RPMI. Para todos os volumes, foram considerados o total de células fusionadas.

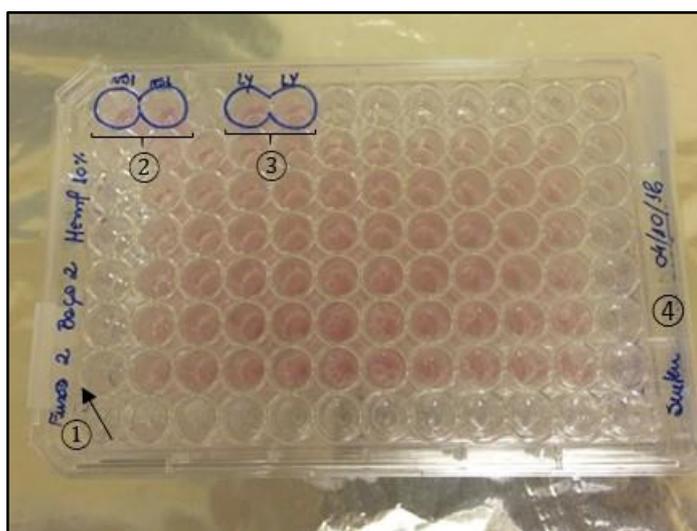
Figura 12 - Representação esquemática do processo de fusão celular em meio químico



Fonte: Imagem modificada de Alberts et al.⁶⁷

Os produtos finais das fusões celulares foram distribuídos em placas de células em suspensão de 96 poços, recebendo cada poço o volume de 100 μ L das células fusionadas. Uma alíquota de NS1 e dos esplenócitos foram separados em poços controles (figura 13), cada uma das placas receberam a seguinte nomenclatura: HemF1, HemF2, HemF3 e HemF4.

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.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Ao término do plaqueamento, as mesmas foram mantidas em estufa de CO₂ a 5% e a temperatura de 37°C. No dia seguinte da fusão, foi utilizado o meio HAT para a seleção enzimática de células deficientes no sistema HGPRT (hipoxantina-fosforibosil-transferase). As células geneticamente selecionadas, HGPRT negativas, não sobrevivem em meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina, como é o caso da linhagem NS1 utilizada^{36,37}. Somente as células HGPRT positivas sobrevivem e podem entrar em divisão celular, neste caso, os híbridos que herdaram estas características das células linfóides esplênicas dos camundongos. Este meio foi utilizado do dia D+1 ao D+15 após a fusão celular. No D+4 foram adicionados aos poços as *Feeder cells*, aproximadamente 2 x 10⁵ por poço, devido aos híbridomas formados terem um baixo crescimento nos estágios iniciais e não se desenvolverem quando cultivadas em baixa densidade³⁷. As *Feeder cells* funcionam como células alimentadoras pois fornecem fatores importantes para o crescimento dos híbridos.

Nos dias subsequentes foram realizadas trocas de meio a cada 48 horas ou conforme a necessidade, seguindo o Cronograma/Protocolo conforme figura abaixo:

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; *Screening*: 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.

Cronograma/Protocolo de Obtenção de Anticorpos Monoclonais: HemF																
Projeto - Suelen Assunção Nishio																
Fusão - 1																
Dia	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	
Fusão - HemF	↑					S	D						S	D		
HAT D+		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Feeders cells					↑											
Screening														↑	↑	
Dia	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28	D29	D30
Fusão - HemF					S	D						S	D			
Feeders cells																
Screening	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			
HT D+	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
MC D+																30

Fonte: Arquivo pessoal, 2018

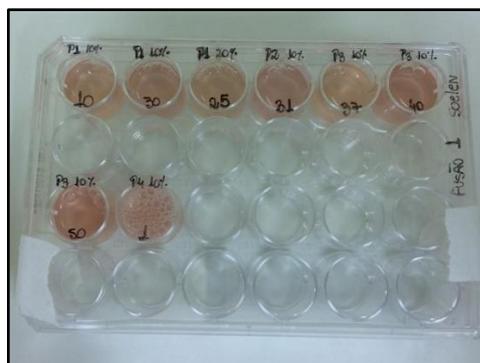
3.1.7 – Screening

O *screening* é uma das etapas mais importantes da produção do AcMm, este pôde ser realizado entre o 7^o ao 14^o dia da fusão, conforme o desenvolvimento dos híbridos das fusões realizadas. Os poços contendo os híbridos foram testados retirando-se 100µL do sobrenadante e testado com 50µL do antígeno de interesse no qual os animais foram submetidos a imunização, ou seja, suspensão de hemácias de sangue de cordão umbilical a uma concentração menor, a 5%.

O método de *screening* escolhido para as fusões realizadas foi o de hemaglutinação, devido ao anticorpo de interesse ser contra antígenos de superfície de hemácias fetais, antígeno i.⁶⁵

Para cada poço positivo, os híbridos foram transferidos para poços de placas de 24 poços (figura 15), afim de expandi-los e obter um maior número de células para realização de novos testes de *screening*. Para os demais poços que inicialmente foram não-reagentes (NR), um segundo teste foi realizado após 48 horas para confirmação do teste se NR ou a identificação de um novo positivo.

Figura 15 - Aspecto da amplificação dos hibridomas de interesse: híbridos com *Screening* positivo transferidos para placa de 24 poços



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

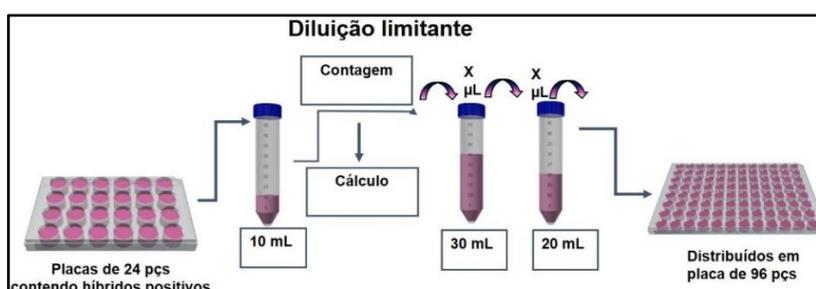
3.1.8 – Clonagem

Após realizado o *screening*, os poços contendo híbridos identificados como positivos, foram preparados para a realização da clonagem por diluição limitante.

O poço positivo original frequentemente contém mais de um clone de células de hibridoma, e muitas células híbridas possuem uma variedade instável de cromossomos, sendo assim, os anticorpos produzidos pelas células desejadas podem ser superados pelas células que não produzem o anticorpo de interesse. A clonagem unicelular garante que as células que produzem o anticorpo de interesse sejam verdadeiramente monoclonais e que a secreção desse anticorpo possa ser estavelmente mantida isolando um clone estável de células de hibridoma que secretam o anticorpo desejado.^{36,37}

Sendo assim, as células dos poços positivos foram segregadas e a contagem foi realizada, foram calculadas as concentrações celulares aumentando o volume da suspensão ajustando a diluição dessas, afim de isolar um número de 100 células e de 50 células em placas de 96 poços, conforme ilustrado na figura 16.

Figura 16 - Esquema representativo da técnica de clonagem celular pelo Método de Diluição Limitante

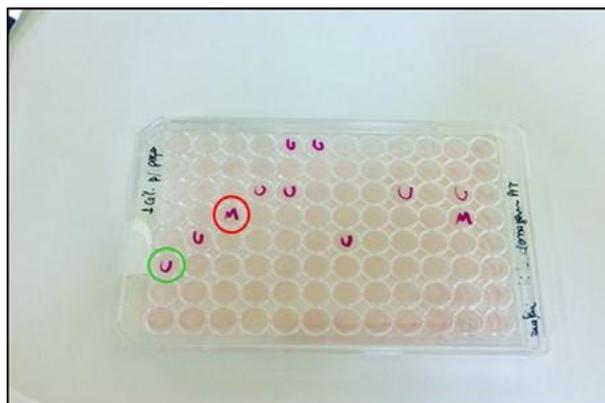


Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Foram adicionados um volume de 2×10^5 de *Feeder cells* 48 horas antes do procedimento da clonagem, foram adicionadas previamente para controle microbiológico e também para que as mesmas secretassem os fatores de crescimento necessários aos hibridomas, afim de melhorar o desempenho da expansão celular.

As células foram plaqueadas afim de se obter uma célula por poço, mas possivelmente ocorreram situações em que houveram mais de uma por poço, assim como também não houveram deposição de híbridos em alguns poços, então, 24 horas após a clonagem as placas foram observadas em microscópio invertido e foram anotados nos poços a presença de um único clone “U” ou de múltiplos “M” (figura 17).

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).



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Esta verificação se faz necessária para confirmação de que o anticorpo produzido em cada poço seja monoclonal, ou seja, produzido por um único clone de célula.

3.2 – Citometria de Fluxo – Padronização do anticorpo anti – hemoglobina fetal humana (anti - HbF) e anti – CD71

Para análise de citometria de fluxo foram utilizados anticorpos monoclonais anti-HbF marcados, hoje já utilizado na literatura por ser considerada uma técnica sensível para detecção e quantificação de hemácias contendo hemoglobina fetal e portanto utilizada na determinação da HFM.²⁸ Juntamente com o anti – HbF foram

realizadas marcações com o anti – Hu CD235a como estratégia de *Gate* devido este ser um marcador de superfície de *Glicoforina A* presente nos eritrócitos em todos os seus estágios de maturação. Também foi utilizado o anti-CD71, um receptor de transferrina que detecta precursores eritróides,⁶⁸ este marcador foi utilizado por reconhecer toda a linhagem de eritroblastos e não reconhecer os eritrócitos maduros, as hemácias propriamente ditas, podendo então ser utilizado como um possível marcador de hemácias fetais.

Os anticorpos monoclonais marcados anti – HbF lote nº551796 e anti-CD71 lote nº531062 foram obtidos comercialmente, tendo em vista de que o projeto fez uso de reserva técnica de outro projeto financiado pela FAPESP (processo nº 2016/25281). A otimização de custos foi importante na realização deste trabalho.

Para a utilização de ambos, os mesmos foram submetidos a leituras de padronização para poder estimar o volume apropriado para os testes.

As amostras foram tratadas de maneira distintas. Para a detecção da hemoglobina fetal foi necessário realizar marcação intracelular, ao contrário da marcação dos precursores eritróides com anti-CD71 que foi extracelular.

3.2.1 – Marcação Intracelular

Amostras de sangue de cordão (100µL) foram fixadas em 2mL de glutaraldeído a 0,05% por 10 minutos em temperatura ambiente e foram lavadas duas vezes com PBS. As células fixadas foram permeabilizadas com 500µL de Triton X-100 a 0,01% (Merck®) por 10 minutos em temperatura ambiente e lavadas com PBS. Após a lavagem o sedimento (*pellet*) de células foi suspenso em 300µL de PBS com 0,1% BSA (Prothemo®). Então, 100µL da suspensão foi incubada com 10µL de anti-HbF, fluorescência FITC (BD Pharmigen™) e com 2,5µL anti-Hu CD235a, fluorescência PE (Abcam®), no escuro e em temperatura ambiente por 15 minutos. Os volumes dos anticorpos utilizados nas marcações foram obtidos como resultados da padronização realizada previamente. Após a incubação as células foram lavadas e suspensas em 500µL de Isoton (BD®) com 0,1% de formaldeído.

O mesmo procedimento foi realizado com amostras de sangue periférico adulto, sendo estas amostras utilizadas como grupo controle negativo, com baixa expressão de hemoglobina fetal.

3.2.2 – Marcação extracelular

Amostras de sangue de cordão foram lavadas por 3 vezes com PBS, após a lavagem foi preparada uma suspensão de hemácias a 5% em PBS. Então, 100 μ L desta suspensão foi incubada com 10 μ L anti-CD71 (Pharmigen[®]) no escuro e em temperatura ambiente. Após a incubação as células foram lavadas e suspensa em 500 μ L de Isoton (BD[®]).

3.2.3 – Análise de citometria de fluxo

As análises foram realizadas no laboratório de Citometria de fluxo do Hemocentro de Botucatu, com a colaboração da Prof^a. Dr^a. Marjorie de Assis Golin. O citômetro de fluxo **BD[®] FACSCalibur 4 Cores** foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante, as amostras preparadas foram lidas em 30.000 eventos, os dados obtidos foram analisados e interpretados no software *Cell Quest Pro*.

3.3 – Construção do Imunossensor

3.3.1 – Soluções

As soluções a serem utilizadas foram preparadas nas seguintes concentrações: PEI a 0,2 (mg/mL) e FS 0,2% (w/v), anti – HbF a 5 (μ g/mL) e anti – CD71 a 5 (μ g/mL). Os anticorpos utilizados, foram anticorpos purificados não marcados adquiridos comercialmente de mesmo número de lote dos anticorpos marcados utilizados na citometria de fluxo.

Os polímeros PEI e FS foram diluídos em água de Milli-Q, com resistividade 18,2 M Ω e pH ~5,7 e os anticorpos anti – HbF e anti – CD71 foram diluídos em solução tampão PBS pH 7,4.

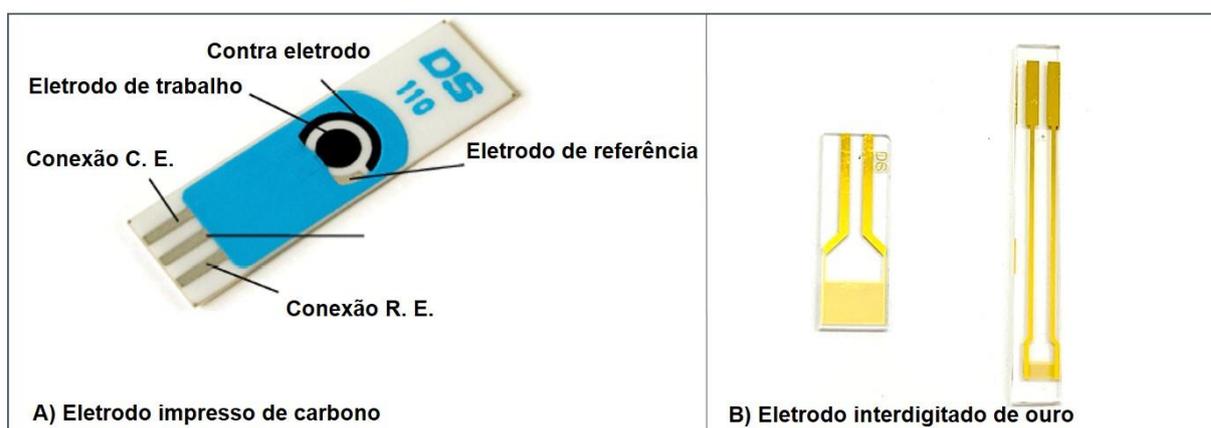
Amostras de sangue de cordão e sangue periférico adulto, foram lavadas e então preparada uma suspensão de hemácias a 5% em PBS. Para a avaliação do anticorpo anti-CD71 foram utilizadas suspensão de hemácias, ao passo que para avaliação do anticorpo anti – HbF esta suspensão de hemácia foi submetida a criopreservação em temperatura - 80°C por 10 minutos e após, descongelada em

banho Maria e centrifugadas por 2 minutos a 3200 rpm, afim de se romper a membrana da hemácia por hemólise e obter a hemoglobina, deixando-a livre.

3.3.2 – Fabricação dos filmes automontados camada por camada (*Layer-by-Layer, LbL*)

Para a montagem dos filmes foram utilizados eletrodos impresso de carbono, sendo este composto por um eletrodo de referência, um contra eletrodo e um eletrodo de trabalho (figura 18 - A) onde são realizados os testes e eletrodo interdigitado de ouro (**EIO**) (figura 18 - B).

Figura 18 - Detalhamento dos tipos de Eletrodos utilizados - **A)** Eletrodo impresso de carbono e **B)** Eletrodo interdigitado de ouro.



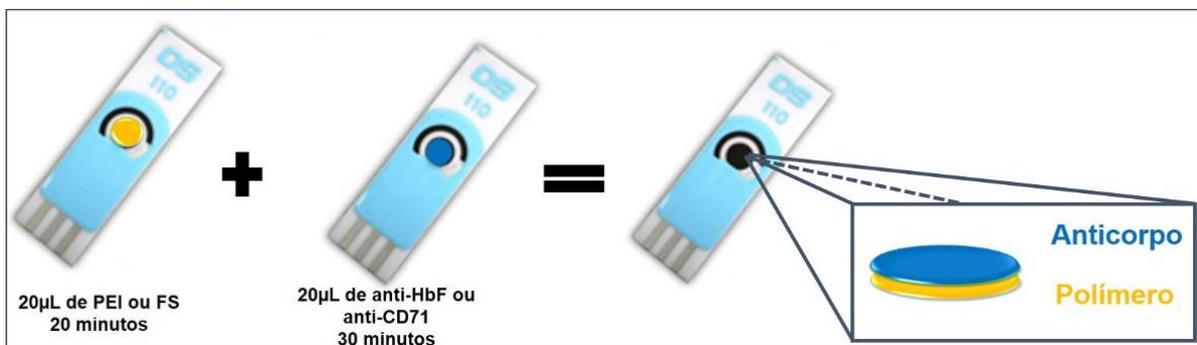
Fonte: A) http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html (modificado); B) Arquivo pessoal, 2018.

Os filmes PEI/anti - HbF, PEI/anti - CD71, FS/anti - HbF e FS/anti - CD71 foram preparados em eletrodo impresso de carbono pelo método *LbL*⁴⁶ (figura 19) para realização de medida eletroquímica.

Inicialmente foi adicionado 20 μ L da solução de PEI ou FS sobre o eletrodo de trabalho por 20 minutos, tempo necessário para que uma camada do material adsorvesse completamente no eletrodo.⁵⁹ Em seguida o excesso da solução foi retirado e o eletrodo foi lavado com PBS para retirar o excesso de moléculas fracamente adsorvidas. Após este procedimento o eletrodo foi seco e aplicado uma nova camada (20 μ L) do anticorpo de interesse (anti - HbF ou anti - CD71), foram incubados em temperatura ambiente por 30 minutos, para que ocorra a adsorção do

mesmo no polímero previamente aplicado na superfície do eletrodo. Após o período de incubação o excesso do anticorpo foi retirado e realizada a lavagem com PBS.

Figura 19 - Montagem dos filmes *LbL* em eletrodo impresso de carbono

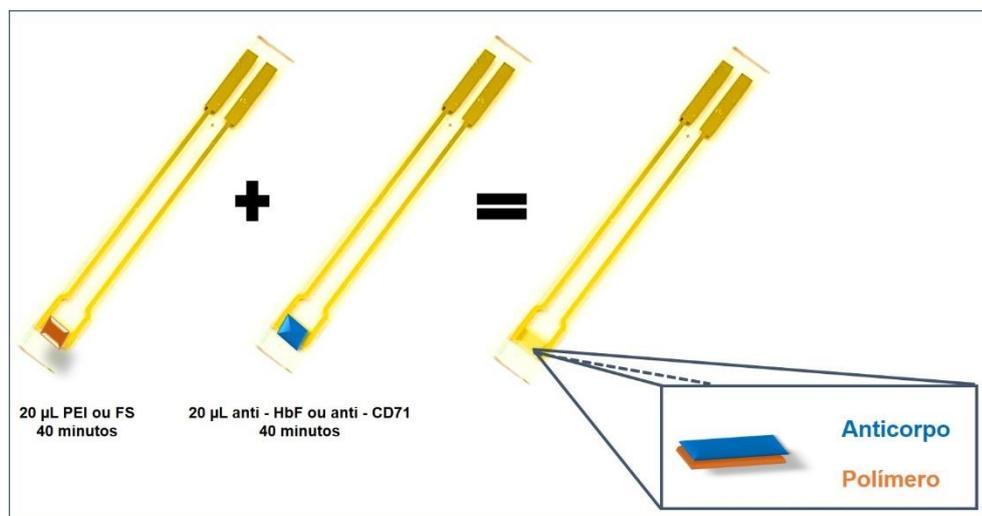


Fonte: modificado de http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html

Filmes PEI/anti – HbF, PEI/anti – CD71, FS/ anti – HbF e FS/ anti – CD71 também foram preparados pela técnica *LbL* na superfície do EIO (figura 20) para realização de medida elétrica. Os eletrodos interdigitados de ouro foram produzidos no Laboratório de nanofabricação do CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais).

O EIO foi preparado previamente, isto é, submetido a uma lavagem com sonicação por 1 minuto em solução de KOH e álcool etílico para retirar as impurezas da superfície do eletrodo e obter uma melhor aderência na montagem dos filmes devido a hidrofilição. Em seguida foi aplicado 20µL da solução contendo o polímero PEI ou FS por 40 minutos, logo após foi realizada a lavagem com PBS para retirar o excesso das moléculas fracamente adsorvidas. E então o eletrodo foi seco e aplicado uma camada da solução contendo o anticorpo de interesse (anti – HbF ou anti – CD71) e incubado por 40 minutos, tempo esperado para que promova a adsorção do anticorpo pelo polímero previamente aplicado, após a incubação procedeu-se a lavagem.

Figura 20 - Montagem dos filmes *LbL* em EIO



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Após a fabricação dos filmes, os eletrodos foram armazenados a temperatura de 4 a 8°C até a realização da leitura.

3.3.3 – Medidas eletroquímica

A voltametria cíclica (VC) foi utilizada para observar a resposta do filme na presença do antígeno. As análises foram realizadas no Laboratório de Biossensores e Biosistemas (LBios) do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) da UNIFESP sob supervisão da Prof^a. Dr^a. Marli Leite de Moraes. Os Voltamogramas foram obtidos utilizando um potenciostato *μ Stat 400* com o software *DropView* da *DropSens®* (Oviedo, Espanha), as leituras foram realizadas na presença de PBS (200 μ L) como solução eletrolítica. A velocidade de varredura foi de 0,05 V/s, e a faixa de potencial foi de -0,6 V a 0,6 V. Mudanças na corrente e área do voltamograma foram analisadas.

A resposta do filme foi verificada utilizando-se as amostras preparadas de sangue periférico adulto (S. Adulto), como controle negativo, e amostras de sangue de cordão umbilical (SCU). Inicialmente foi adsorvida a amostra controle negativo por 5 minutos, foi realizada a lavagem com PBS e então realizada a leitura com 200 μ L de PBS. Em sequência foi adsorvido por 5 minutos a amostra de SCU, realizado o procedimento de lavagem e leitura. As medidas foram realizadas em triplicada, ou seja, para cada amostra foram realizadas 3 medidas consecutivas.

3.3.4 – Medidas elétrica

Medidas de impedância elétrica foram utilizadas para captar a interação antígeno/anticorpo na superfície do eletrodo de ouro, estas medidas foram obtidas pelo equipamento Solartron 1260 A com o *software Smart v3.3.1*, utilizando a faixa de frequência de 1Hz a 10MHz e uma corrente alternada (AC) de 50mV. A região de baixa frequência é dominada pelo efeito da dupla camada, enquanto que na região de 10^2 e 10^4 Hz há contribuição do material sobre o eletrodo e em frequências superiores a 10^5 Hz a impedância do sistema é dependente da capacitância geométrica.⁵²

As respostas dos filmes foram realizadas na presença de uma suspensão de hemácias a 5% em *PBS* de S. Adulto (controle negativo) e SCU (amostra positiva). Inicialmente 15 μ L do controle negativo foi adsorvido por 5 minutos, após o tempo de adsorção o eletrodo foi lavado e então realizada a leitura na presença de 15 μ L de *PBS*. O mesmo procedimento foi realizado para as amostras positivas. As medidas também foram realizadas em triplicada.

As análises foram realizadas no laboratório de Cerâmicas Avançadas do ICT-UNIFESP em colaboração com o Prof. Dr. Eduardo Antonelli.

4 – Resultados e Discussões

4.1 – Produção dos anticorpos monoclonais

4.1.1 – Expansão das células NS1

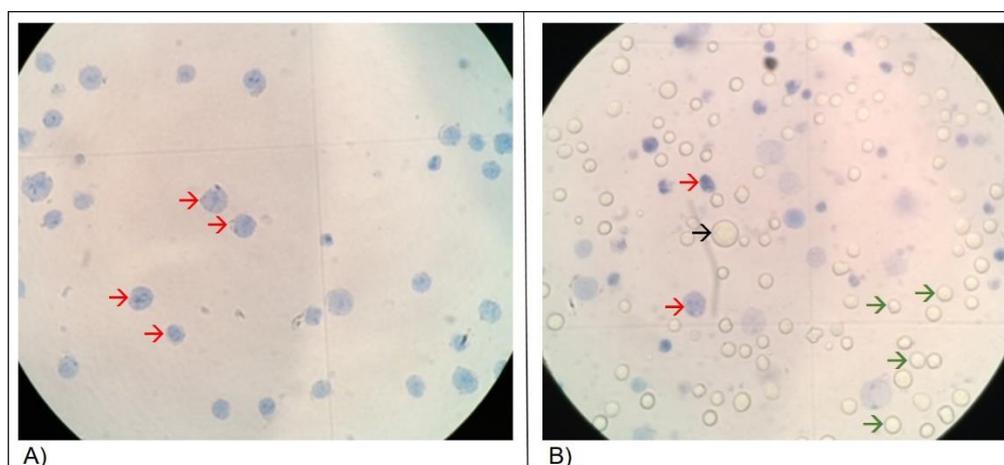
Inicialmente o descongelamento da linhagem de células mielomatosas, NS1 duas semanas antes do procedimento das fusões não foi satisfatório. Foram utilizados os meios de cultura já produzidos em experimentos anteriores e após várias tentativas falhas, foram checadas as condições destes meios de cultura e constatou-se que o pH do mesmo não estava em condições adequadas para o cultivo destas células. O pH ideal é entre 7,4 e 7,8, o pH do mesmo se encontrava em 5,5, o que justifica o mau desempenho da amplificação das células NS1. Após detectado o problema, foi providenciado a correção do pH com uma solução de NaOH e então realizado novo procedimento de descongelamento, onde foi obtida a amplificação celular necessária.

Estudos mostram a influência do pH na sensibilidade à amônia de linhagens celulares de hibridomas murino. Uma relação significativa entre a taxa de crescimento específica e taxa de mortalidade, respectivamente, bem como a concentração de

NH₃, mas não a concentração total de amônia, é detectada por muitos autores, há vários anos⁶⁹. O controle da formação e consumo de lactato numa linha celular de hibridoma é conseguido por alteração do pH durante a fase inicial de crescimento exponencial, influenciando-a positiva ou negativamente⁷⁰.

O desempenho das tentativas de descongelamentos pode ser observado na figura 21.

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



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

4.1.2 – Imunizações

O protocolo das imunizações foi realizado em duas etapas. Em uma primeira etapa quando coincidiu com a má amplificação das células NS1, os animais foram mantidos em biotério por um período prolongado e a dose de reforço *booster* foi realizada após 60 dias da primeira inoculação IP, comprometendo o desempenho da imunização. Na segunda etapa, o protocolo foi realizado no tempo previsto.

A geração de anticorpos monoclonais por tecnologia de hibridomas requer uma análise dos epítomos a serem reconhecidos detalhada, especialmente no que diz respeito a aplicação final, quando o anticorpo deve reconhecer o alvo⁷¹. Mudanças no protocolo de imunização podem comprometer o sucesso da obtenção do anticorpo monoclonal desejado. Quanto as condições dos animais e manejo durante as inoculações, os procedimentos foram controlados, os animais permaneceram vivos e saudáveis durante todo período das imunizações. Constatou-se de forma evidente

que a injeção de hemácias humanas é altamente imunogênica, no entanto, o alvo eram antígenos expressos em hemácias fetais humanas, mas não em hemácias adultas. Levando em consideração trabalhos prévios do grupo, a utilização de técnica de tolerização, também denominada de imunização subtrativa, que diferente da tradicional, primeiro se injeta o antígeno que não se quer reconhecer, seguido de dose controlada de quimioterápico, por vários ciclos, para posteriormente se injetar a amostra que expresse os antígenos para os quais se deseja obter um anticorpo monoclonal. Etapas futuras devem levar isto em consideração, utilizando a hemácia humana adulta como tolerógeno, seguido de imunossupressão e posteriormente a amostra que apresentará o imunógeno, isto é, que apresente o maior volume de hemácias fetais.⁷²

4.1.3 – Fusões

Foram realizadas 4 fusões, sendo a 1ª **HemF1** e 2ª **HemF2** produtos da primeira etapa de inoculação, utilizando células congeladas segundo Maruschi (1988)⁷³ e a 3ª **HemF3** e 4ª **HemF4** da segunda etapa de inoculação utilizando células frescas na 3ª fusão e congelada na 4ª fusão (tabela 1).

Tabela 1 - Produto das fusões realizadas

Protocolo	Nº de placas 96 poços	Nº de híbridos construídos	Nº de híbridos testados	Híbridos positivos (retidos)
HEMF 1	12	1152	4	0
HEMF 2	15	1440	5	0
HEMF 3	6	576	27	20
HEMF 4	4	384	8	3
TOTAL	37	3552	44	23

HEMF = protocolo de fusão celular. Híbridos construídos são aqueles oriundos da razão de 10 linfócito para cada NS1; híbridos testados são aqueles que tiveram crescimento celular após a fusão e apresentaram confluência de mais de 70% e híbridos retidos é a denominação utilizada para aqueles cujo sobrenadante de cultura se apresentou reagente no *screening*. **Fonte:** Arquivo pessoal, 2018.

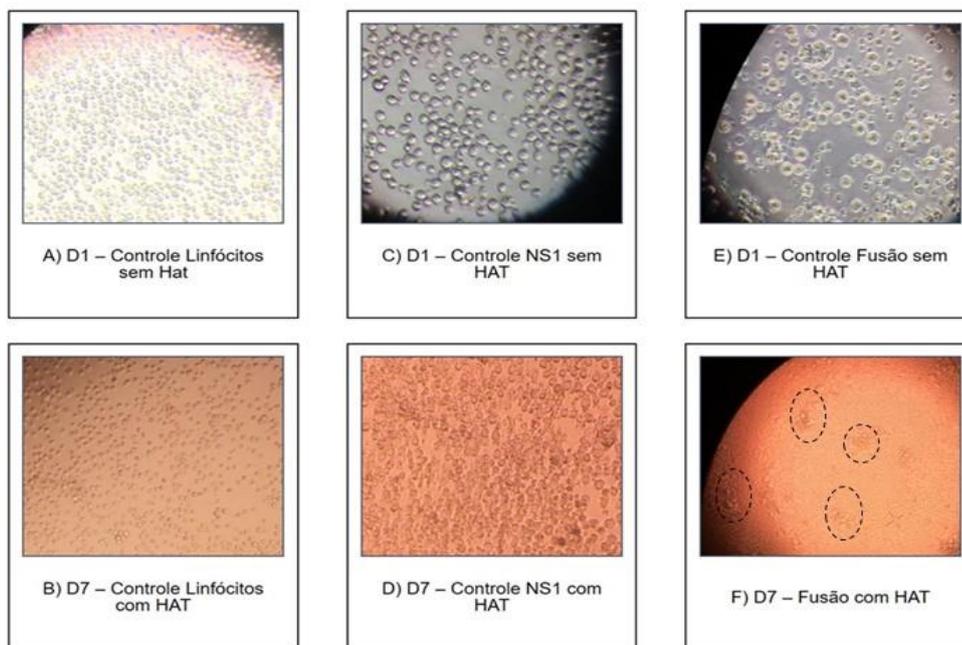
Como pode ser observado na tabela 2, o produto das fusões 1 e 2 não foram satisfatórios. Apesar de apresentarem um número maior de híbridos construídos, o

desenvolvimento dos mesmos não teve um bom desempenho, o uso de células congeladas contribuiu para isto, as células permaneciam vivas nos primeiros dias da fusão, mas logo observava-se a presença de apoptose. Dentre as células híbridas obtidas nestas fusões não foram identificadas células secretoras de anticorpos de interesse, possivelmente o tempo prolongado das inoculações, devido ao problema operacional relacionado ao pH já discutido anteriormente contribuiu para isto.

Nas fusões 3 e 4, apesar de um número menor de híbridos construídos observa-se que se obteve um número maior de híbridos testados, principalmente na 3ª fusão onde foram utilizadas células frescas. Nesta fusão foram obtidos híbridos secretores de anticorpos que reagiram positivamente com os antígenos testados no teste de *screening*, o produto destas fusões pode ser acompanhado nas imagens 22 – A, B, C, D, E e F. Em A) e C) observam-se o controle dos linfócitos extraídos do baço do camundongo previamente imunizado, com viabilidade de 100%, o mesmo podendo ser observado na figura C, o aspecto da célula mielomatosa murina, denominada de NS1. Nesta última, o tamanho é muito maior e existe uma irregularidade na forma, característica deste clone. Em ambas as situações (A e C) não houve a adição do meio de cultura seletivo contendo HAT. Na fotografia E, podem ser observadas células de diferentes tamanhos e bastante irregulares correspondendo ao momento seguinte à fusão celular. Neste momento existe muita irregularidade de membrana e alteração de forma até que a célula fusionada se organize corretamente para o reparo da membrana ou entre em morte celular. Ainda na mesma figura no sétimo dia após a fusão, a análise por microscopia invertida se pode observar a apoptose natural dos linfócitos (B), a apoptose induzida e necrose celular do NS1 na presença do meio de cultura seletivo, que é muito acentuada quando comparada com a imagem dos linfócitos e em F) a imagem da fusão celular de fato se organizando em *clusters* (imagem dentro dos círculos).

Esta sequência fotográfica representa didaticamente todas as fases de mudança morfológica que acontece com as células nos sete primeiros dias de fusão celular. Apesar de pequeno o número de hibridomas testados, eles representariam as células com maior estabilidade genética.⁷⁴

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 circulares).



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

4.1.4 – *Screening*

O teste de *screening* escolhido foi a técnica de hemaglutinação em tubo. Apesar de antiga, esta técnica permite a obtenção dos resultados de forma mais rápida e segura, identificando os híbridos secretores de anticorpos contra antígenos de superfície de hemácias. Inicialmente para a detecção do antígeno de interesse foi utilizada a suspensão de hemácias de Sangue de SCU, tendo como base o antígeno obtido como imunógeno. Foram realizados 3 testes subsequentes, sendo utilizadas suspensões de hemácias de SCU e também de sangue adulto, totalizando 4 testes (tabela 2). Esta reprodução dos testes com intervalos de 48h, sem troca do meio de cultura se faz necessário em função dos rearranjos cromossômicos que ainda podem ocorrer na célula recém-fusionada, fazendo-a perder a especificidade. Outros autores relacionam a perda da especificidade com pH do meio de cultura e a classe e sub-classe de IgG.⁷⁵

Tabela 2 - Número de testes de *screening* realizados por fusão celular

Protocolo	Híbridos positivos (retidos no 1º teste)	Híbridos positivos (retidos no 2º teste)	Híbridos positivos (retidos no 3º teste)	Híbridos positivos (retidos no 4º teste)
HEMF 3	20	14	14	14
HEMF 4	3	3	3	3
TOTAL	23	17	17	17

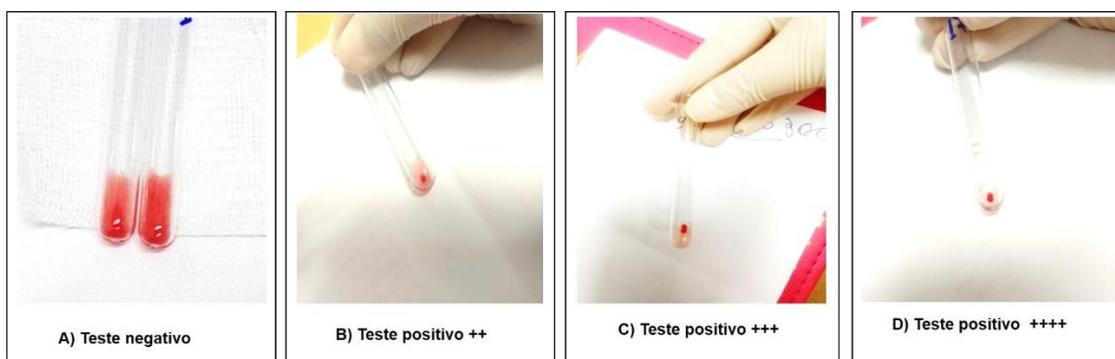
Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Como pode ser observado, 26,08% dos híbridos testados como reagente no primeiro teste tornaram-se negativos. Todos a aqueles que perderam a especificidade foram do protocolo HEMF 3.

Nos testes de *screening* realizados foram observadas reações de hemaglutinação ++, +++ e ++++ (figura 23). A diferença da intensidade de reconhecimento pode ocorrer por: 1) antígenos diferentes e polimórficos sendo reconhecidos sobre as hemácias fetais; 2) híbrido tem uma maquinaria frágil para a secreção de quantidades mais robustas de imunoglobulina; 3) parte da imunoglobulina produzida pode estar sendo adsorvida sobre a superfície plástica, ou ainda, estar em maior quantidade armazenada no citoplasma e não secretada para fora da célula e finalmente, o polimorfismo genético dos antígenos expressos sobre hemácias é muito importante. Alguns antígenos se expressam de forma maciça, como o caso do antígeno H (mais de um milhão de vezes sobre a mesma hemácias), e outros, como o CD71, são expressos 30.000 a 40.000 vezes na mesma célula.⁷⁶

Após a identificação dos híbridos secretores de anticorpos foi realizado um teste subsequente utilizando também uma suspensão a 5% de sangue adulto para cruzarmos as informações, sendo descartada como híbrido positivo aqueles que reagiam para ambos. O anticorpo desejado era aquele que reagia positivamente com as hemácias fetais e não reagiam com as hemácias adultas, podendo ser um anti-i, um anticorpo que reage com o antígeno i presente nas hemácias de recém-nascidos⁶⁴ ou anti-CD71 expressos em eritroblastos fetais⁶⁸ que porventura atingiram a circulação materna.

Figura 23 - Reação de hemaglutinação em tubo: aspecto do *screening* realizado com reações negativas e positivas



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Foram identificados híbridos com perfis de reconhecimento distinto: aqueles que reagiram ++ somente para SCU (desejado) e híbridos que reagiram ++, +++ e ++++ para ambos, ou seja, reconhecem um antígeno bem formado na vida fetal e que permanece na hemácia adulta. Após esta triagem, foram mantidos dois híbridos, um que reagiu ++ somente com SCU (HEMF3 – P110) e outro que reagiu ++++ (HEMF3 – P417) para ambas as amostras testadas (quadro 2), este último foi mantido pois apresentou características particulares, quando testado com diversas amostras, com tipagens sanguíneas ABO e com diferentes grupos RhD, expressou positividade para ambos, sendo assim, optou-se por preservá-lo tendo em vista que pode vir a ser um novo produto.

Quadro 2 - Híbridos selecionados para amplificação e clonagem

Hemácias testadas	O - SCU	O - adulta	Especificidade Provável
HEMF3 – P110	+	-	anti – i? anti – CD71?
HEMF3 – P417	+	+	Anticorpos dirigidos contra fenótipo específico – testar com painel de hemácias

Fonte: Arquivo pessoal, 2018

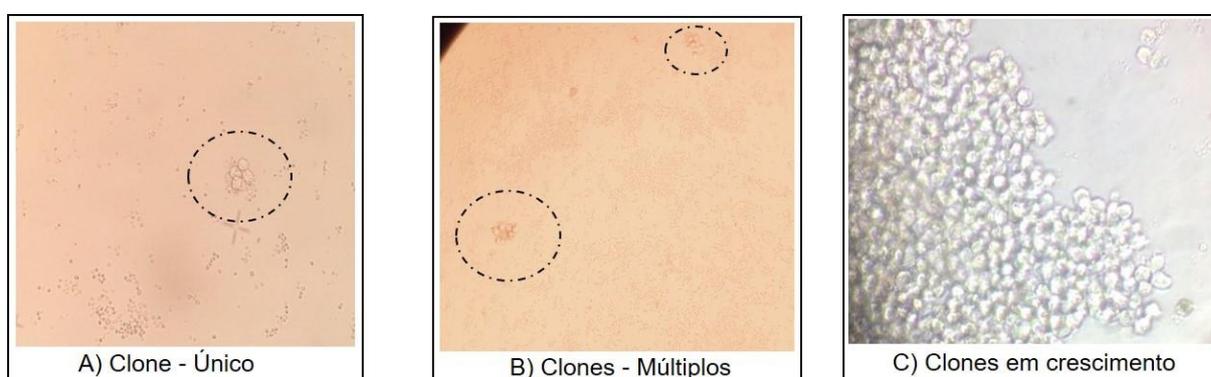
Os híbridos selecionados foram amplificados para posterior clonagem. Durante a amplificação ocorreram problemas técnicos e amostra do híbrido pretendido HEMF3 – P110 foi perdida devido a uma contaminação por fungo, sendo mantida apenas a amostra HEMF3 – P417.

4.1.5 – Clonagem

Seguindo o protocolo foi realizada a clonagem do híbrido HEMF3 – P417 por diluição limitante, segundo Harlow e Lane³⁶ modificado por Deffune⁶².

O objetivo da clonagem foi selecionar 3 poços com positividade estável, foram selecionados poços com clones de células únicos, a análise diária por microscopia invertida foi realizada para confirmar a característica monoclonal (figura 24 - A).

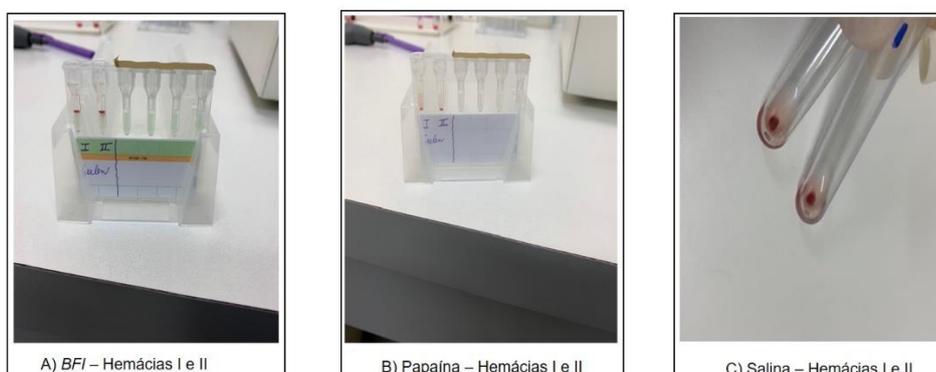
Figura 24 - Análise por microscopia invertida da clonagem realizada - A) Crescimento de um único clone de célula; B) crescimento de múltiplos clones e C) clone em expansão



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Os clones foram mantidos em condições de cultura celular, com meio completo (RPMI + 20% SFB) até que atingissem uma confluência (figura 24 - C) para que fosse realizado um novo teste de *screening*. Após realizado estes novos testes e confirmada a estabilidade, foram aplicados testes imunohematológicos para pesquisa de antígenos de superfícies já conhecidos. Foram testados painel comercial com 16 hemácias (Fresenius®), o anticorpo testado reagiu com os antígenos de superfície dessas hemácias. Também foram realizados testes com hemácias comerciais tipo I e II em cartões de gel com tampão de baixa força iônica (*BFI*), com a enzima papaína e também em salina, o anticorpo reconhece antígenos de superfície das hemácias I e II na presença de *BFI* e na salina (figuras 25 - A e C), mas se degrada na presença de enzimas proteolíticas como a papaína (figura 25 - B).

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.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

A pré-análise do anticorpo secretado pelo clone HEMF3 – P417 confirma a sua não especificidade pelo antígeno de interesse, sendo assim, optou-se pela amplificação e criopreservação do mesmo para uma caracterização futura.

4.2 – Citometria de fluxo

4.2.1 – Fixação e permeabilização para imunomarcagem da hemoglobina fetal

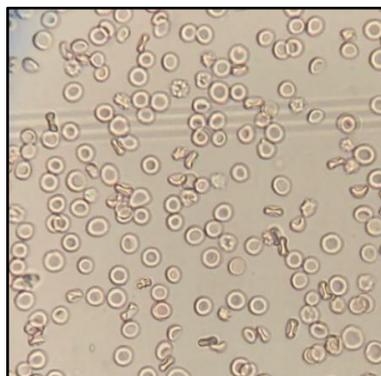
A fixação e a permeabilização fizeram parte do protocolo de marcação intracelular para detecção da hemoglobina fetal (HbF) por citometria de fluxo. Foram encontrados diversos métodos na literatura para realizar esta marcação. Ao realizar o procedimento verificou-se a necessidade de padronizar o volume da amostra a ser utilizada e do reagente fixador, Glutaraldeído a 0,05%, devido a presença de hemólise durante o procedimento, sendo esta hemólise também citada na literatura.^{3,77,78}

Após os primeiros testes foi verificado que o volume utilizado inicialmente 1/2, ou seja, 1 mL de Glutaraldeído a 0,05% para 1 mL de amostra de SCU é inadequado, com este volume as células não eram fixadas adequadamente e ao entrar em contato com o reagente permeabilizante Triton X-100 elas eram hemolisadas, resultando em uma baixa expressão da HbF.

Foi revisando a literatura e realizando novos testes que se identificou que o volume adequado para que ocorra a fixação da célula por completo é de no máximo 50 µL da amostra de sangue para o volume de 1 mL de Glutaraldeído a 0,05%. Como pode ser observado na figura 26, quando utilizado este volume as células

permaneciam íntegras quando analisadas por microscopia. O tempo de incubação também foi testado, e o melhor tempo foi o indicado pelo fabricante de 10 minutos tanto para a fixação quanto para a permeabilização.

Figura 26 - Hemácias íntegras após procedimento de fixação e permeabilização



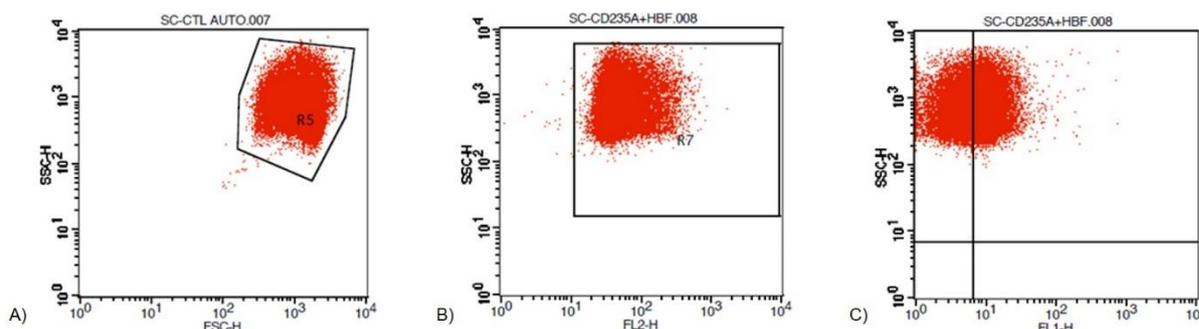
Fonte: Arquivo pessoal, 2018

4.2.2 – Detecção da hemoglobina fetal com anti – HbF

A análise por citometria de fluxo para detecção da hemoglobina fetal utilizando o anticorpo anti-HbF pôde ser realizada após a fixação e permeabilização das hemácias das amostras de sangue. Um total de dez amostras de SCU e uma amostra de sangue adulto utilizada como controle negativo.

Para o delineamento experimental foi utilizado como estratégia de Gate o anticorpo anti-CD235a, um marcador de *Glicoforina A* presente na superfície das hemácias em qualquer estágio de maturação⁶⁸, onde este anticorpo pôde marcar em todas as amostras utilizadas a região das hemácias, e a partir da detecção desta região quais dessas células continham a HbF (figura 27).

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.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Referente ao total de amostras analisadas (tabela 3), a média de HbF em SCU ficou em aproximadamente 60%, houve uma variação para menos em algumas amostras, deve-se levar em consideração que em muitas delas havia a presença de coágulo.

Tabela 3 - Resultados em % obtidos na avaliação das amostras testadas pela técnica de citometria de fluxo

Amostras	Gated %
1 – SCU	63,74
2 – SCU	55,84
3 – SCU	32,21
4 – SCU	60,89
5 – SCU	56,94
6 – SCU	46,62
7 – SCU	66,34
8 – SCU	68,50
9 – SCU	72,07
10 – SCU	63,29
Controle Negativo	3,69
50% SCU (amostra 1) + 50% sangue adulto (Controle negativo)	50,10

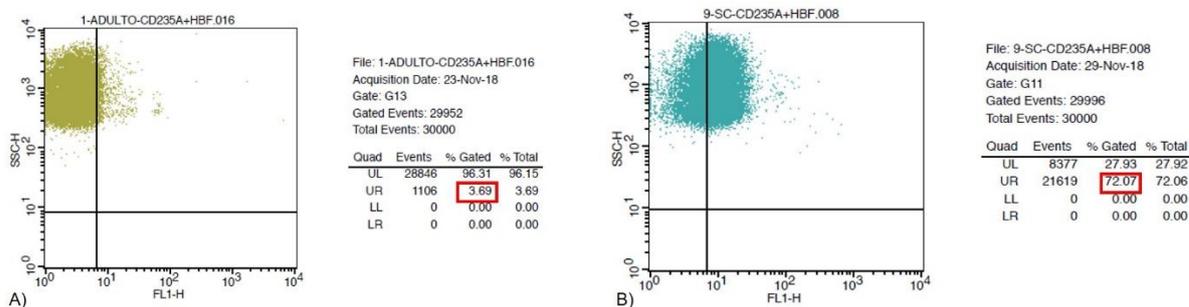
Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Quando avaliado o volume de anticorpo a ser utilizado, volumes de 2,5 μ L, 5 μ L e 10 μ L foram testados e obteve-se uma melhor resposta quando as amostras foram marcadas com 10 μ L do anticorpo anti-HbF.

Os resultados das análises pode ser observado na representação gráfica da figura 28, os dados foram tratados no software *Cell Quest Pro*, pode-se observar a baixa expressão de HbF em amostras de sangue adulto e um percentual considerável de 72% em amostra de SCU, o resultado dessas análises corroboram com os encontrados na literatura, onde o percentual varia de 60 a 80% nos primeiros meses de vida.²⁸

Também foi realizada análise de uma mistura de 50% de SCU com 50% de sangue adulto, simulando uma condição da HFM, e com esta análise pode-se verificar que o teste de citometria de fluxo é sensível na detecção de amostras de SCU em amostra adulta como observado na tabela 3.

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).



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

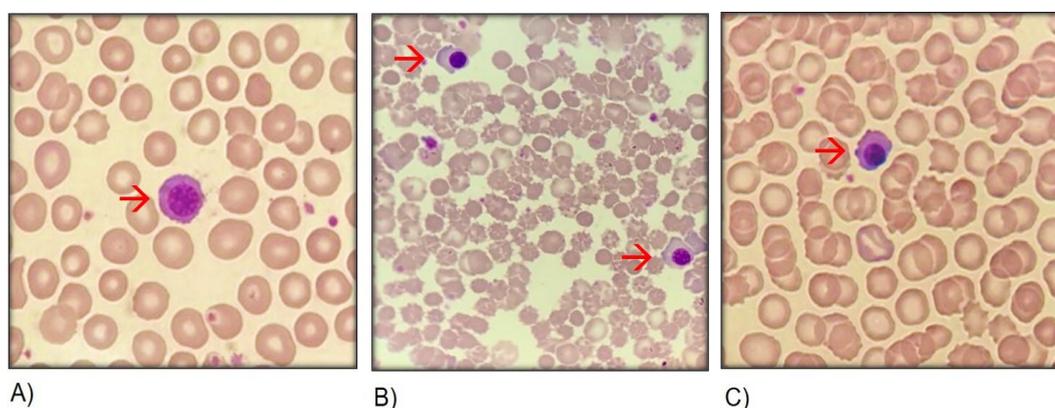
Ambos os resultados analisados, amostras de sangue adulto, amostras de SCU e a mistura foram satisfatórios quando marcados com anti – HbF, a técnica apesar de laboriosa é sensível na detecção e quantificação, conforme demonstrado nos dados da literatura consultada.^{30,79}

4.2.3 – Detecção de eritrócitos imaturos (eritroblastos) com anti – CD71

Para a pesquisa de eritroblastos foram realizadas marcações extracelulares com anti-CD71, um receptor de transferrina.⁶⁸

Os resultados foram obtidos através da análise de citometria de fluxo de amostras de SCU e de sangue periférico adulto, também foi realizado o controle hematimétrico destas amostras para certificar-se da presença de eritroblastos (figura 29).

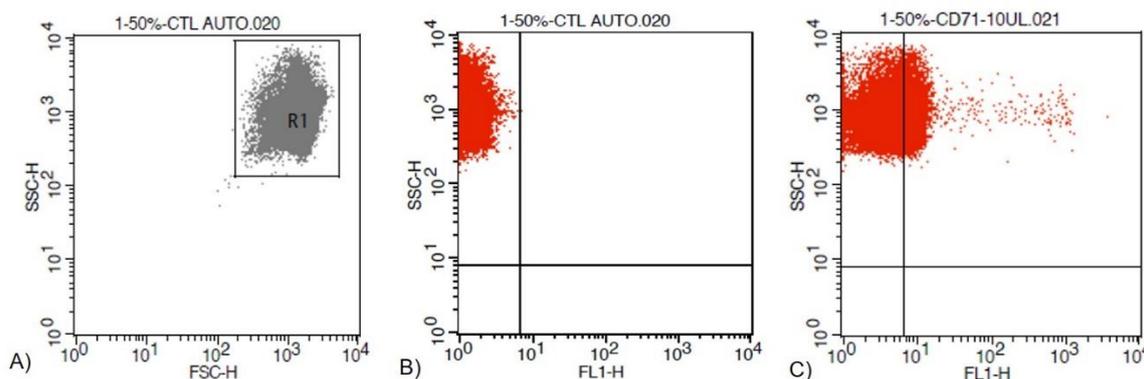
Figura 29 - Aspecto do esfregaço sanguíneo corado por Leishmann - Controle hematimétrico das amostras de SCU testadas – **A); B) e C)** → Presença de eritroblastos



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Como estratégia de *Gate* as células foram avaliadas por tamanho e granulosidade (figura 30), sendo identificada a região das hemácias obteve-se a identificação das células marcadas com anti-CD71.

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.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Foram avaliadas um total de 5 amostras de SCU, uma amostra de sangue adulto como controle negativo e uma mistura 50% de SCU com 50% de sangue adulto (tabela 4).

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

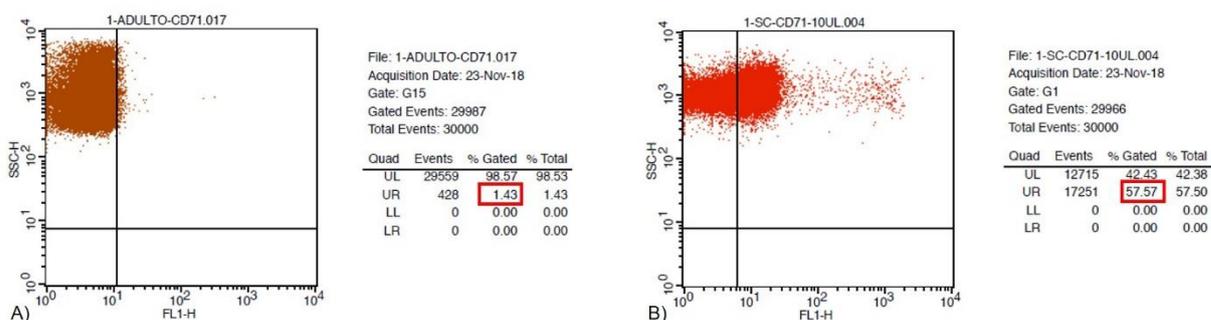
Amostras	Gated (%)	Eritroblastos em lâmina (%)
1 – SCU	57,57	40
2 – SCU	17,40	12
3 – SCU	9,73	6
4 – SCU	12,06	7
5 – SCU	15,44	9
Controle Negativo	1,43	0
50% SCU (amostra 1) + 50% sangue adulto (Controle negativo)	31,23	-

Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Quando avaliado o volume de anticorpo a ser utilizado, volumes de 2,5 μ L, 5 μ L e 10 μ L foram testados e obteve-se uma melhor resposta quando as amostras foram marcadas com 10 μ L do anticorpo anti-CD71.

Os resultados foram satisfatórios quando comparadas amostras de sangue adulto e SCU contendo eritroblastos (figura 31). Quando comparado o número de eritroblastos em lâmina com a análise de citometria observa-se que os valores são bem próximos.

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).



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Os dados obtidos com esta análise evidenciam que o anti-CD71 pode ser utilizado como um marcador de hemácias fetais quando há a presença de eritroblastos na amostra, estes dados se confirmam quando observado o valor obtido na mistura, onde foi utilizado 50% do controle negativo (sangue adulto) com 50% da amostra 1 (SCU) sendo detectada a presença de 31,23% de hemácias fetais.

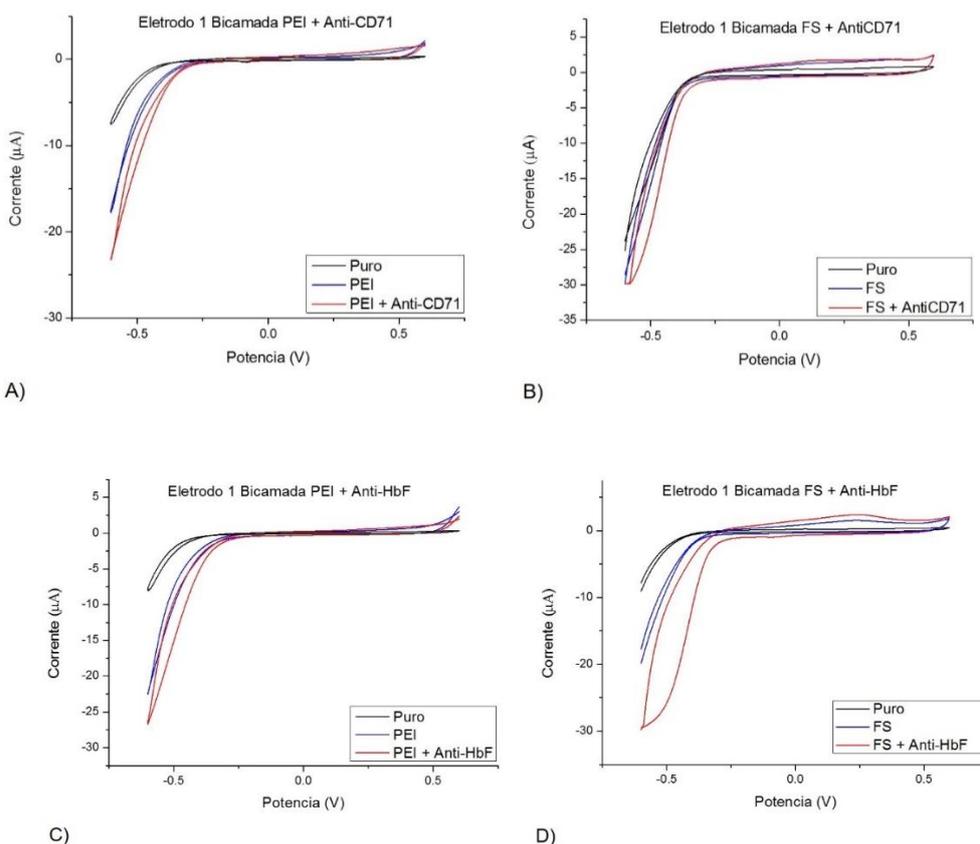
4.3 – Construção do imunossensor

4.3.1 – Adsorção dos filmes (PEI/Ac e FS/Ac) em eletrodo impresso de carbono e em eletrodo interdigitado de ouro.

Os filmes automontados, camada por camada *LbL*, tiveram resultados satisfatórios quanto a adsorção dos diferentes polímeros testados (PEI e FS) e dos anticorpos (AC) na superfície do eletrodo impresso de carbono. A interação dos filmes na superfície do eletrodo pode ser observada quando realizada as leituras durante a construção destas camadas, a comparação desta adsorção na superfície do eletrodo pode ser observada nas figuras 32 - A, B, C e D, onde são observados o deslocamento e um aumento na área dos voltamogramas. Quando adsorvido o anticorpo houve um crescimento na área de 0,81 em **A**, de 2,83 em **B**, de 1,42 em **C** e de 3,88 em **D**. Este

aumento na área, aumento na densidade eletrônica, pode ser atribuído a adsorção do PEI ou FS e dos anticorpos sobre o eletrodo.

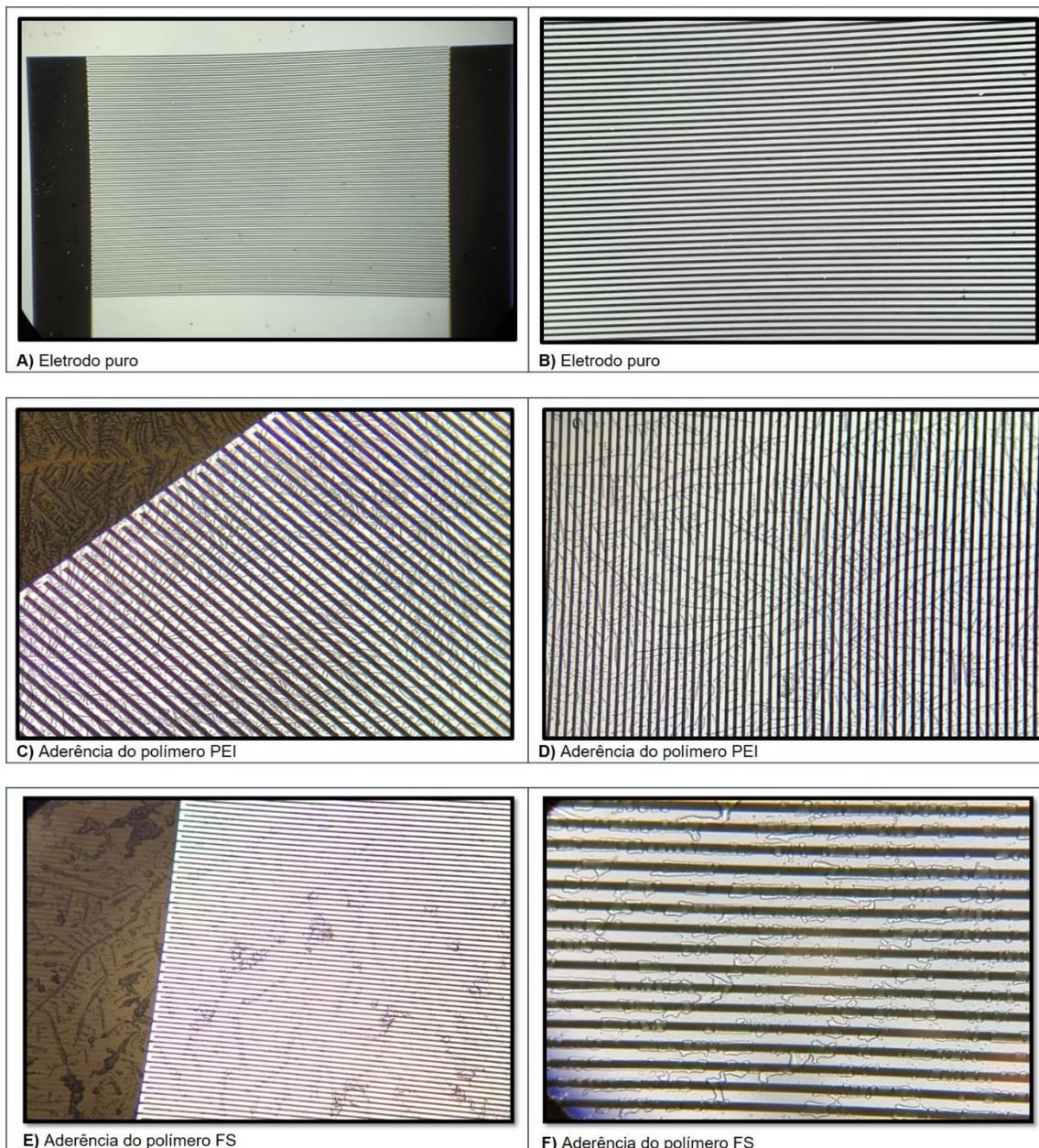
Figura 32 - Adsorção dos polímeros e anticorpos testados na superfície do eletrodo impresso de carbono - **A)** Adsorção de PEI/anti – CD71; **B)** Adsorção de FS/anti – CD71; **C)** Adsorção de PEI/anti – HbF e **D)** Adsorção de FS/anti – HbF.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

Já para os EIOs foram realizadas avaliações por microscopia óptica e obtidas imagens antes e após a montagem dos filmes para verificação da adsorção das camadas. O eletrodo puro, antes da adsorção da bicamada pode ser observado nas figuras 33 - A e B e nas figuras 33 - C e D do eletrodo contendo o polímero PEI/AC e 33 - E e F contendo o polímero FS/AC podem ser observadas estruturas ramificadas que sugerem a adsorção da bicamada.

Figura 33 - Avaliação microscópica dos EIOs antes e após a adsorção da bicamada pelo método *LbL* - **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.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

4.3.2 Detecção eletroquímica no eletrodo impresso de carbono

Medidas eletroquímicas por voltametria cíclica foram realizadas nos eletrodos impressos de carbono construídos, após a adsorção de amostras preparadas de

suspensão de hemácias e de hemoglobina a 5% de sangue periférico adulto e Sangue de Cordão Umbilical (SCU).

Realizando-se a análise comparativa das áreas dos voltamogramas (tabela 5) e dos deslocamentos das curvas (figuras 34 – A, B, C e D) das unidades sensoriais construídas com as bicamadas FS/anti-CD71 e PEI/anti-CD71, assim como também para a construída com a bicamada PEI/anti-HbF (figura 34 – G e H), verificou-se uma variação pouco significativa, comprovando a inespecificidade dessas unidades para identificar os diferentes sistemas construídos. Foi observado nesta análise uma alta taxa de oxirredução das amostras testadas quando adsorvidas nos eletrodos, tanto para as amostras obtidas de sangue adulto, quanto para as amostras obtidas de SCU, em ambos os sistemas, aqueles contendo o anticorpo e naqueles contendo apenas o polímero.

Tabela 5 - Área dos voltamogramas e diferenças entre os sistemas construídos

Eletrodos construídos	Área do Voltamograma (após adsorção de S. Adulto)	A – A₀ *	Área do Voltamograma (após adsorção de SCU)	A – A₀ *
1 camada PEI	5,39	3,04	6,28	3,93
1 bicamada PEI/anti-CD71	5,47	2,40	5,82	2,75
1 camada FS	3,35	1,45	6,89	4,49
1 bicamada FS/anti-CD71	5,95	3,12	7,28	4,45
1 camada PEI	4,92	4,63	4,22	3,93
1 bicamada PEI/anti-HbF	5,82	4,36	5,74	4,28
1 camada FS	6,35	5,11	6,16	4,91
1 bicamada FS/anti-HbF	5,96	1,66	6,98	2,68

* (A₀ = área do eletrodo após adsorção da camada do polímero e da bicamada polímero/anticorpo)

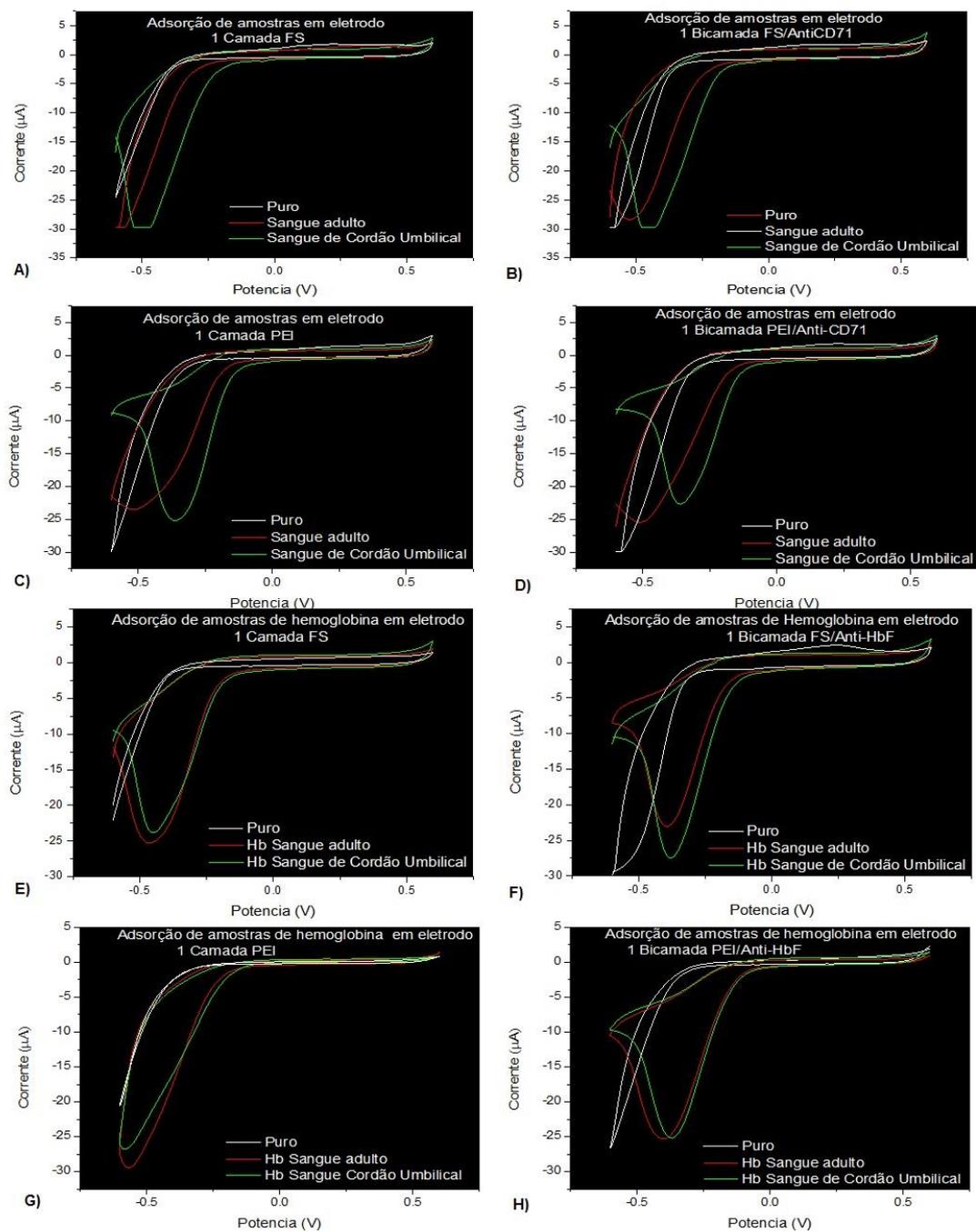
Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Foi observado um aumento expressivo de oxirredução principalmente nas amostras preparadas de hemoglobina livre, acredita-se que isso se deva ao ferro presente no grupo heme que faz parte da estrutura da mesma.⁸⁰

Apesar de também ter ocorrido oxirredução elevada no sistema FS/anti – HbF, quando comparada a corrente aplicada em $-25 \mu A$ foi possível observar a

especificidade do imunossensor contendo o anticorpo anti – HbF (figura 34 - F), o mesmo não foi observado no sensor contendo apenas o polímero FS (figura 34 - E).

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.



Fonte: Arquivo pessoal, 2018

4.3.3 – Detecção elétrica no eletrodo interdigitado de ouro

Medidas de Impedância elétrica foram realizadas nos eletrodos interdigitados de ouro, após a adsorção das amostras preparadas de suspensão de hemácias e de hemoglobina a 5% de sangue periférico adulto e Sangue de Cordão Umbilical (SCU).

Foram realizadas leituras dos eletrodos construídos para os sistemas: PEI e PEI/anti-CD71, PEI e PEI/anti – HbF, FS e FS/anti-CD71 e FS e FS/anti – HbF. Os dados obtidos foram tratados no software *Origin*.

Foram realizados cálculos para gerar as variáveis necessárias para a análise de impedância elétrica, foram calculados a Frequência angular (ω), Capacitância em série (C_s), Constante de propagação (TAU), Capacitância em paralelo (C_p), Resistência em paralelo (R_p), Perda em paralelo ($lossP$), utilizando os dados obtidos das leituras de impedância, Frequência em Hz, Impedância Real (Z') e Impedância Imaginária (Z'') (quadro 3).

Quadro 3 - Fórmulas para calcular as variáveis necessárias para a análise de impedância elétrica

Variáveis	Fórmulas
Frequência angular (ω)	$= 2 \cdot 3.1416 \cdot \text{Col}(E')$
Capacitância em série (C_s)	$= -1 / (\text{Col}(\omega) \cdot \text{Col}(L''))$
Constante de propagação (TAU)	$= \text{Col}(\omega) \cdot \text{Col}(K') \cdot \text{Col}(C_s)$
Capacitância em paralelo (C_p)	$= \text{Col}(C_s) / (1 + \text{Col}(\text{TAU}) \cdot \text{Col}(\text{TAU}))$
Resistência em paralelo (R_p)	$= (1 + \text{Col}(\text{TAU})) / (\text{Col}(C_s) \cdot \text{Col}(\text{TAU}))$
Perda em paralelo ($lossP$)	$= 1 / \text{Col}(R_p)$

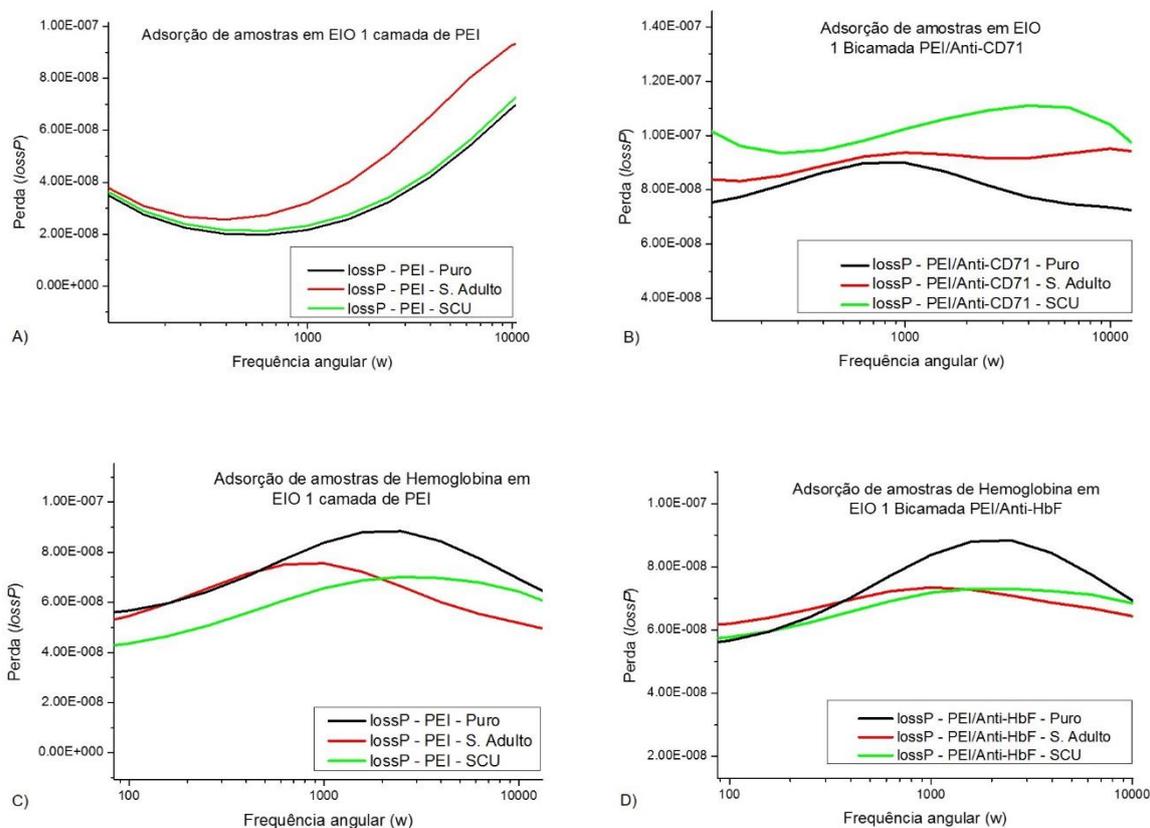
*Col(E) = Frequência Hz; Col(L) = Impedância Imaginária (Z''); Col(K) = Impedância Real (Z')

Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Para gerar os gráficos no *Origin* foram utilizadas as variáveis ω e $lossP$.

Os resultados obtidos não foram satisfatórios quando utilizado o PEI como polímero. Nas unidades sensoriais construídas com o anti-CD71 e testados com suspensão de hemácias (figuras 35 – A e B) não foram observadas perdas elétricas consideráveis e quando utilizado o anti-HbF com amostras de hemoglobina (figuras 35 – C e D) foi observada adsorção para todas as amostras testadas, verificando então a inespecificidade dos imunossensores para esta aplicação.

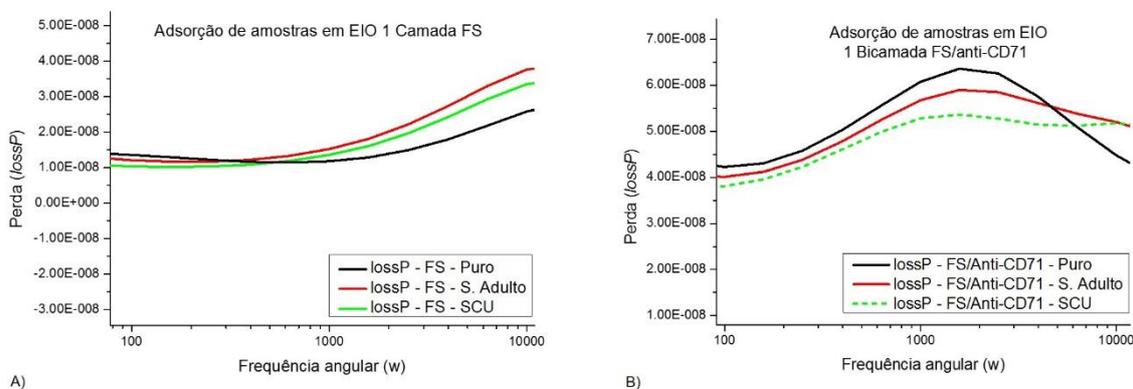
Figura 35 - Medidas de impedância elétrica no EIO com o polímero PEI - A) Eletrodo contendo PEI; B) eletrodo contendo PEI/anti-CD71; C) eletrodo contendo PEI e D) etrodo contendo PEI/anti-HbF



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Já quando utilizada a FS como polímero verificou-se perdas elétricas consideráveis como pode ser observado na figura 36 – B, nesta análise foi possível detectar 2 perdas dielétricas na amostra de SCU ao contrário da amostra de S. Adulto que houve apenas 1 perda dielétrica quando analisadas nas regiões de 10^2 a 10^4 Hz.

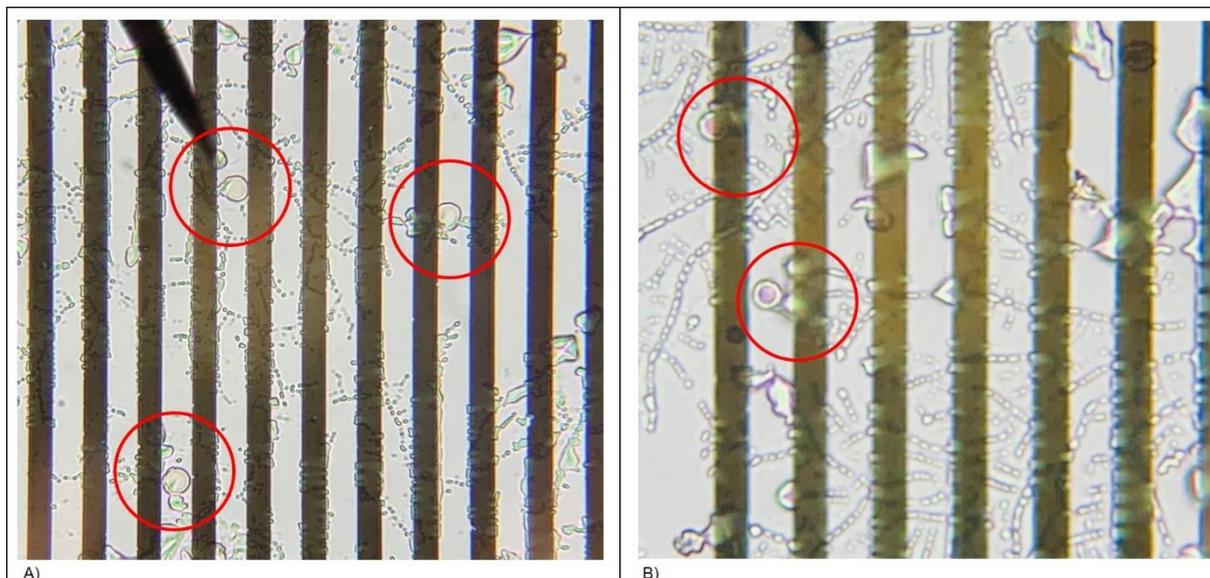
Figura 36 - Medidas de impedância elétrica em EIO com o polímero FS - **A)** eletrodo contendo somente FS e **B)** eletrodo contendo FS/anti-CD71.



Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Foram realizadas análises microscópicas deste imunossensor após as medidas de impedância elétrica para verificação de possíveis alterações em sua superfície. As alterações podem ser observadas nas imagens 37 - A e B, foi possível identificar a presença de hemácias, que possivelmente tenha relação com as reações de imunoafinidade pesquisadas no presente trabalho.

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.

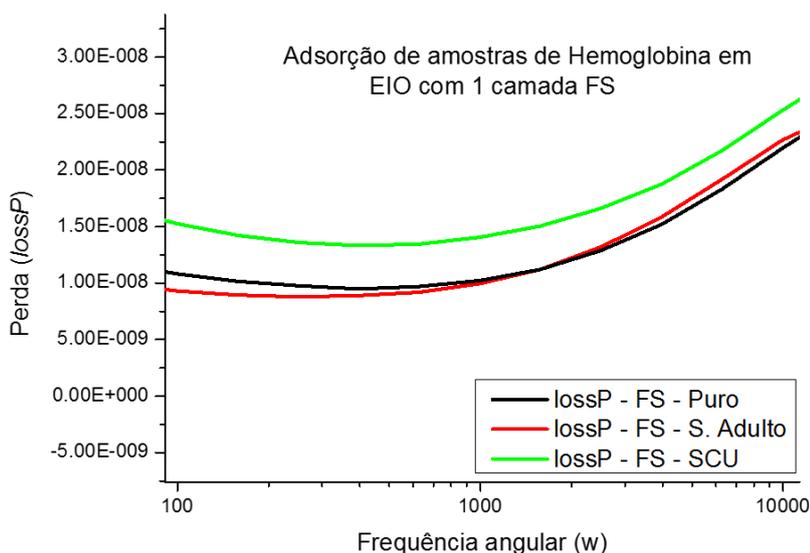


Fonte: Arquivo pessoal, 2019

Devido a problemas técnicos o sistema FS/anti-HbF não pôde ser analisado por completo, quando analisado os dados obtidos no seu controle FS (figura 38) foi

verificado resultados semelhantes ao obtido no controle FS do sistema FS/anti-CD71, o que leva a propor a reproduzir os testes para uma análise mais detalhada.

Figura 38 - Medidas de impedância elétrica em EIO contendo o polímero FS



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, Cañameres 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/criog/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, Fórestier F, Daffos F, Tchernia G, Walters A. Management 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. *Immunoematology*. 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 Practice*. 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).