

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

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
MURINOS DIRIGIDOS CONTRA ANTÍGENOS DE
CÉLULAS-TRONCO ADULTA DE ORIGEM HUMANA E
DE COELHO.**

Juliane de Campos Inácio

Botucatu
2011

JULIANE DE CAMPOS INÁCIO

**Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos
contra antígenos de células-tronco adulta de origem
humana e de coelho.**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Co-Orientadora: Dra. Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves

Botucatu - SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Inácio, Juliane de Campos.

Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho / Juliane de Campos Inácio. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

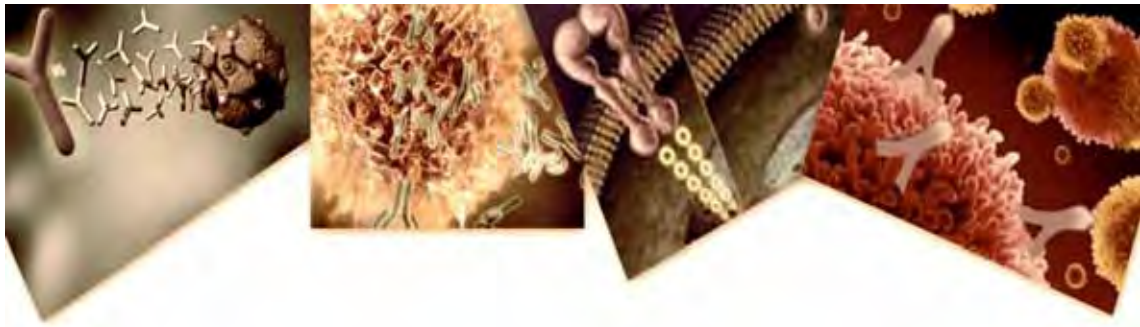
Orientadora: Elenice Deffune

Co-Orientadora: Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves

Capes: 90400003

1. Biotecnologia. 2. Células-tronco. 3. Anticorpos Monoclonais.

Palavras-chave: Anticorpos Monoclonais; Células-tronco adultas; Cultura celular.



Dedicatória

*Dedico a realização desse sonho aos meus pais **Ademir** e **Zilda**,
E ao amigo, irmão e hoje anjo no céu **Douglas** (in memoriam).
Meus alicerces e grandes motivadores, exemplos de cristão.*



Agradecimientos

A Deus, pela imensa fonte de sabedoria, por me capacitar a cada dia, por ser o único e real sentido da minha vida, por me fazer enxergar o profundo quando eu insistia em ver a margem, por acreditar que eu posso ser sempre melhor e maior no Amor, por me permitir servir a Ele e anunciar sua palavra fazendo de mim um instrumento de paz.

*Ao meu Pai, **Ademir Inácio** pela motivação de sempre, por ter o dom de ver estradas onde eu vejo o fim, por fazer o possível e o impossível para que os meus sonhos se realizassem, por ser exemplo de filho, irmão, amigo, esposo, pai e principalmente cristão.*

*A minha mãe, **Zilda de Campos Inácio** pela mulher de aço e de flores “que reconcilia na carne a força dos metais e a fragilidade das flores”, por me acolher nos momentos de dor e solidão, por me estender sua mão segura quando os meus olhos não podiam ver, por me enxergar melhor do que eu realmente sou e me ensinar que o que é Eterno vem de Deus e que é preciso amor pra poder pulsar é preciso paz pra poder sorrir e é preciso a chuva para florir.*

*Aos meus irmãos **Daniel e Gabriele**, por trazerem alegria aos meus dias de tristeza, por me ensinarem a nunca esquecer a criança que existe dentro de mim, pela confiança que em mim depositam e pela certeza que sempre alimentaram em seus corações de que minha vitória é sempre certa, pois é Deus quem está a minha frente.*

*Ao meu nAMORado **Pedro Fernandes**, por todo seu carinho, apoio e compreensão principalmente nas tantas horas em que deixei de estar com ele para a realização deste sonho, por diminuir a distância e amenizar a saudade nos pequenos gestos e detalhes que fazem toda a diferença, por me fortalecer com seu amor me ensinando a ser cada vez mais de Deus e fazendo com que eu me sinta sempre cada vez mais especial, por me fazer capaz quando eu já não acreditava que poderia vencer e por partilhar comigo o mesmo plano de uma vida inteira juntos.*

*A toda a minha família, avós, tios, tias, primos e primas em especial a **Tia Cássia**, grande bióloga fonte de minha escolha e amor pela minha profissão, grande incentivadora e principalmente amiga, ao **Tio José Aparecido** pelo carinho que sempre me confiou, pelas caronas por todos os anos de faculdade demonstrando mais que um simples cuidado, mas amor verdadeiro sem esperar nada em troca e a minha Avó materna, **Herminda** pelo zelo de mãe por toda a minha vida e por me ensinar sempre que é preciso ter coragem, honestidade e fé em Deus que as outras coisas são consequência.*

*Ao Prof. Dr. **Luciano Lobo Gatti**, pela fantástica orientação em minha graduação, por ser o preceptor de toda a minha história na pós-graduação, por ter acreditado em meu potencial antes mesmo que eu soubesse que existia, pelas grandes oportunidades que sempre me proporciona para que eu possa cada vez mais despertar a grandeza que existe em todo ser humano assim como ele fez comigo e essencialmente por sua amizade, pelos conselhos e pelas boas risadas que fizeram e fazem minha vida mais bonita.*

*A minha orientadora Prof^ª. Dr^a **Elenice Deffune** por ser fonte de inesgotável conhecimento, por todos os momentos de aprendizagem, por me ensinar que eu posso e consigo realizar os meus projetos, por me apresentar o lado humano da hemoterapia no meu aprimoramento não me deixando jamais esquecer do valor da pessoa humana que esta por trás da amostra que manipulo em laboratório, por acreditar em meu potencial na Biotecnologia e que eu posso me aperfeiçoar cada vez mais, pelo exemplo de ser humano que é, pela mãe que põe em pratica o verdadeiro sentido de amar e pela amizade mostrando sempre sua compreensão mas não me deixando esquecer de que eu posso sempre melhorar e que críticas são essenciais.*

*A minha co-orientadora, Dr^a **Flávia Cilene Alves**, por toda confiança que depositou em mim quando cheguei no laboratório, totalmente perdida me acalmando e ditando o rumo*

certo, exemplo de profissional, uma mulher dedicada que não desiste sem lutar, muito obrigado por sua amizade e seus cuidados.

*A toda equipe do laboratório de **Engenharia Celular da UNESP de Botucatu: Thaiane, Aline Aun, Flavinha, Juliana Ravelli, Paula, Henrique, Aline, Mariele, Woner, Angelo, Armando, Daniel, Josy, Dra Rosana, Dra Micheli, Priscila Murador, Andrei, Vitória, Ondina, Regiane, Regina e Leandro**, pela amizade de cada um de vocês, pelas inúmeras risadas, momentos de alegria que me fizeram nunca desistir e sempre continuar lutando por esse ideal, pela ajuda sincera sem receber nada em troca, pelos cuidados quando eu estava doente e por compartilharem dos momentos de dificuldade onde juntos conseguimos superar e traçar novos caminhos para melhorar.*

*Agradeço especialmente a **Ms^a. Josy Campanhã Vicentini de Oliveira**, que cuidou das minhas células, realizou brilhantemente todo o trabalho de sacrifício dos animais e produção dos anticorpos monoclonais, além da intensa dedicação a me ensinar e me auxiliar nos momentos de dúvidas e dificuldades na rotina do laboratório, serei sempre grata ao auxílio profissional e a amizade.*

*A **Juliana Ravelli**, e a **Thaiane Evaristo** (Biomédica e agora mestre) por todo o auxílio e ensinamentos que me dedicaram quando cheguei no laboratório, sempre com muita paciência e brilhante profissionalismo, me ajudaram a dar meus primeiros passos na cultura celular e o apoio de ambas foi indispensável pelo percorrer de todo o trabalho, agradeço imensamente a dedicação além da amizade e carinho que sempre me depositaram.*

*A **Ms^a. Vitória Aparecida**, pelo carinho e por todo auxílio na realização do Western Blotting, e **Ms^a. Priscila Murador**, por toda ajuda desde o início de minha jornada e apoio nos tantos testes em laboratório, ambas exemplos de profissional que jamais exitaram em transmitir seus conhecimentos, por toda a dedicação e amizade, amenizando os momentos de tensão com toda meiguice e alegria.*

*Ao **Ednelson**, do Laboratório de Cirurgia e Ortopedia, pelas coletas de medula óssea e tecido adiposo de coelho realizado sempre com muita destreza. Ao **Carlinhos**, do Biotério de Roedores, pela dedicação e cuidado com os camundongos utilizados neste trabalho.*

*Ao Laboratório de Citometria de Fluxo, ao **Dr. Paulo Machado**, á **Dra Marjorie de Assis Golin** e a acessoria técnica da **Léia**, em especial agradeço a **Dra Micheli Janegitz**, um exemplo de profissional, por sua infinita tranquilidade, serenidade, dedicação e auxílio na realização de todas as análises necessária para o êxito deste trabalho, pela orientação profissional e pessoal, pelo apoio nos dias de desespero, pela amizade sempre tão sincera que foi construída e sei que vou levar pra vida inteira.*

*Ao Laboratório de Toxicogênica & Nutrigenômica – Departamento de Patologia da FMB, especialmente nas pessoas da **Dra Deyse, Dra Glenda**, e **Ms^a. Elaine** pelo auxílio na realização dos testes do cometa, agraciando nossos trabalhos com a Biologia Molecular.*

*Aos companheiros de Aprimoramento e Mestrado, grandes profissionais e pessoas de garra lutando pelos seus sonhos, todos com a mesma paixão pelas ciências médicas mantendo a certeza de que nosso potencial pode ajudar muito a humanidade a viver melhor, em especial as amigas **Luciana Bonome, Aline Aki e Carla Cabestré**, pela cumplicidade profissional e pessoal, por serem presença nos meus momentos de solidão e porto seguro durante todo o tempo em que me afastei das minhas origens. Agradeço também de maneira especial ao amigo de mestrado, o farmacêutico **Leandro**, pela amizade de todos os dias, os conselhos dados sempre com muito carinho, as risadas que aliviavam meus dias difíceis e a todo o ensinamento comigo compartilhado, um brilhante profissional e um grande amigo.*

*A todos os funcionários e amigos dos laboratórios que compõem o Hemocentro de Botucatu, pelos sorrisos que nunca me negaram, pelas ajudas nos momentos críticos da minha pesquisa, pelas conversas que enriquecem minha escola da vida, pelas festinhas e cafés, pelos almoços com marmitas compartilhadas na “copinha”, a todos os laboratórios que fizeram parte da minha formação na hemoterapia, por compartilharem de seus conhecimentos através de sua rotina, em especial a Agência Transfusional onde passei o maior tempo dentro do meu programa de aprimoramento profissional, a todos os funcionários e amigos minha eterna gratidão em especial aos biólogos **Gisela, Fernando e Suraya**, pelas caronas e amizade sincera.*

*Ao projeto de extensão “**Médicos da Alegria**” por me proporcionarem os momentos mais lindos que pude ter pelas enfermarias do hospital, não me deixando esquecer que “somos eternamente responsáveis por aqueles que cativamos” e que um sorriso, um abraço, um gesto de amor pode aliviar e até curar as dores do mundo.*

*Ao movimento do **TLC da Diocese de Ourinhos**, e todos os seus integrantes que atuam com todo amor e dedicação a esse movimento que acredita que é somente através de uma vida em Santidade e em comunhão com Deus que podemos sentir a verdadeira felicidade, agradeço a Deus por me permitir fazer parte dessa família a mais de 10 anos, pois foi dentro do TLC que fixei minhas raízes, lancei minhas verdadeiras amizades, encontrei o verdadeiro sentido de amar e a oportunidade de ser instrumento de amor nas mãos de Deus (“Buscai primeiro o Reino de Deus e a Sua Justiça, que tudo mais vos será acrescentado”).*

*Aos meus amigos que são verdadeiros irmãos de coração e anjos na minha vida desde todo o sempre: **Sarah**, amizade que me completa e nunca me abandonou em todos os momentos felizes e tristes da minha vida; **Adriana**, alicerce que me ajuda a enxergar a vida com os olhos de Deus, me devolvendo a mim mesma sempre mais; **Marcel, Louise e Rafael Diniz**, irmãos que não desistem de me mostrar à verdade e não me deixam esquecer do meu valor e de que eu preciso sempre ser líder de mim mesma; **Sheila**, minha rosa única, que mostra com seu olhar que eu posso ser mais sendo sempre eu mesma; **Douglas**, meu anjo do céu que tão cedo nos deixou mas mantendo em mim a certeza de que “só vale a pena viver quando se tem um ideal pelo qual vale a pena morrer”; **Gilberto e Ana Neuma**, que me concedem a graça de poder continuar com a certeza de que perto sempre vão estar; **Paula**, que me relembra que o amor só é amor se já provou alguma dor; **Djalma**, aquele que nunca desistiu de me amar; **João Paulo**, que trás a alegria a todos os momentos em que me esqueço que sorrindo tudo é mais simples e **Gilbertinho**, que me faz ser sempre mais forte mesmo na distancia porque o que nos une é o amor de Deus.*

*A todos os queridos anjos que Deus me enviou: **Maria Angélica, Idair, Henrique e Luis Fernando** (minha torcida sempre fiel, me conduzem ao céu!), **Clara, Henrique, Ivani, Filipe, Pedro Brito, Rodolfo, Luizão, Naty, Rogério, Guga, Frei Éder e Frei Nei** (amigos e presença de Deus em minha vida), **Maurão, Serginho, Érica, Matheus, Fabiana, Jeferson Vieira, Anderson e Bianca**.*

*Aos queridos companheiros e amigos da “terrinha”, **Rafaela, Felipe, Leandro, Betânia, Ananda, Renata, Vinicius, Fernando Mouta, Amanda e Diego Luiz**, por fazerem de simples coisas momentos muito especiais me lembrando sempre que amar é tornar mais fácil o acesso a nós mesmos. Agradeço especialmente ao **Tio Nô** e a **Tia Gina**, pelo amor com que sempre me acolheram em sua casa e por me tratarem como uma filha, além das orações a mim dedicadas.*

*Aos amigos do grupo **GAMMA** que sempre acreditaram nos meus ideais e foram alicerce da trajetória da minha família na vida em comunidade e aos amigos do **Movimento de Cursilho de Cristandade**, que nunca mediram esforços para nos amar e sempre fizeram dos meus pais verdadeiros anunciadores do Evangelho.*

Aos amigos da **Unimed** de Ourinhos, em especial aos do setor financeiro (**Inaiá, Luciene, Rafael, Silvana, Aline e Eric**) a **Lidinha, Estela e Maria das Graças** pelo carinho e companheirismo com minha mãe durante toda a minha vida e principalmente nessa etapa tão importante da minha vida, obrigado pela força e oração de cada um de vocês. A toda equipe da **Ultra Imagem** diagnósticos de Ourinhos, por todos os anos de aprendizado que lá vivi, pelas amizades que são eternas em mim, á **Dra Lurdes** por nunca se cansar de me ensinar e sempre acreditar em meu potencial, a **Dra Herta** pela amizade tão carinhosa, pelos momentos de alegria e de tristeza compartilhados, pelos ensinamentos profissionais e pela certeza que sempre teve de que eu poderia realizar meus sonhos, sou eternamente grata a todos vocês.

A todos os **pacientes** do Hospital das Clinicas, principalmente aos que são atendidos pelo serviço da **Quimioterapia**, por me ensinarem que o essencial é invisível aos olhos e a vida é o mais lindo e precioso bem que podemos ter.

E a todos os demais que estiveram presente em algum momento da minha jornada, seja fisicamente ou através da oração para que este trabalho fosse concluído com êxito, o meu muito obrigado e que Deus abençoe imensamente a todos.



Epígrafe

*“Só quem já provou a dor, Quem sofreu, se amargurou, Viu a cruz e a vida em tons reais, Quem no certo procurou, Mas no errado se perdeu, **Precisou saber recomeçar.***

*Só quem já perdeu na vida sabe o que é ganhar, **Porque encontrou na derrota o motivo para lutar,** E assim viu no outono a primavera, **Descobriu que é no conflito que a vida faz crescer!***

*Que o verso tem reverso, Que o direito tem avesso, Que o de graça tem seu preço
Que a vida tem contrários, E a saudade é um lugar que só chega quem amou
E que o ódio é uma forma tão estranha de amar.*

***Que o perto tem distâncias,** Que esquerdo tem direito, Que a resposta tem pergunta
E o problema solução, **E que o amor começa aqui no contrário que há em mim**
E a sombra só existe quando brilha alguma luz.*

*Só quem soube duvidar, Pôde enfim acreditar Viu **sem ver e amou sem aprisionar**
Quem no pouco se encontrou, Aprendeu multiplicar, **Descobriu o dom de eternizar!***

***Só quem perdoou na vida sabe o que é amar,**
Porque aprendeu que o amor só é amor se já provou alguma dor
E assim viu grandeza na miséria, **Descobriu que é no limite que o amor pode nascer”.***

(Pe. Fábio de Melo)



Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de anticorpos monoclonais.....	23
Figura 2. Fusão resultando hibridoma.....	24
Figura 3. A multipotencialidade das CTMs.....	27
Figura 4. Diferenciação das Células-tronco Hematopoiéticas.....	29
Figura 5. Diagrama esquemático da hierarquia proliferativa das células progenitoras mesenquimais.....	31
Figura 6. Diferenciação em cultura das CTMs.....	32
Figura 7. Marcadores de superfície das CT de MO.....	34
Figura 8. Isolamento e expansão das CTMs de coelho provenientes de Medula Óssea.....	43
Figura 9. CTMs provenientes de Medula Óssea de Coelho.....	44
Figura 10. Isolamento e expansão das CTMs provenientes de Tecido Adiposo.....	45
Figura 11. Cultura de CTMs (Tecido adiposo de Coelho).....	46
Figura 12. Isolamento e expansão das CTMs provenientes de TA Humano.....	49
Figura 13. Câmara hemocitométrica de Neubauer.....	50
Figura 14. Imagem da câmara hemocitométrica em microscopia de luz.....	50
Figura 15. Protocolo do Teste Cometa.....	51
Figura 16. Análise do Ensaio Cometa.....	52
Figura 17. Protocolo de Produção do AcMm anti-CTMh.....	53
Figura 18. Etapas <i>in vivo</i> da produção do AcMm.....	54
Figura 19. Etapas <i>in vitro</i> da produção do AcMm.....	54
Figura 20. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 1.....	59
Figura 21. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 2.....	60

Figura 22. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 3.....	60
Figura 23. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 4.....	61
Figura 24. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 5.....	62
Figura 25. Gráfico de desempenho dos AcMm A69 e A30 com diferentes amostras de sangue humano.....	63
Figura 26. Gráfico de desempenho fenotípico das CTMs – TA de 4 animais frente ao CD44.....	64
Figura 27. Morfologia das células de MO cultivadas no protocolo MSC.....	66
Figura 28. Morfologia das células de MO cultivadas para a etapa de caracterização dos clones do protocolo MSC.....	67
Figura 29. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (Pré-plaqueamento e 2ª passagem).....	68
Figura 30. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (4ª e 6ª passagem).....	68
Figura 31. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (8ª passagem).....	69
Figura 32. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (DIVS).....	70
Figura 33. Gráfico de análise da viabilidade das CTMh utilizadas na produção do AcMm pelo Ensaio Cometa.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de antígenos identificados durante isolamento de CTMs.....65

Tabela 2. Características de cultura das CTMs.....65

Tabela 3. Eficiência da fusão no protocolo CTMh.....72



Sumário

SUMÁRIO

RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 – Terapia Celular.....	21
1.2 – Anticorpos Monoclonais.....	21
1.3 – Cultura Celular.....	25
1.4 – Ensaio Cometa.....	26
1.5 – Células-tronco.....	27
1.6 – Células-tronco Hematopoiéticas.....	28
1.7 – Células-tronco Mesenquimais.....	30
1.8 – Marcadores de superfície.....	33
1.9 – Citometria de fluxo e <i>Western Blotting</i>	35
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 – Objetivo geral.....	40
2.2 – Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 - Caracterização de Anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos expressos em CTM de coelho (ETAPA 1).....	42
3.1.2 – Levantamento dos anticorpos utilizados e protocolo de caracterização dos AcMm anti-CTMs de coelho.....	42
3.1.2 – Animais.....	43
3.1.3 – Isolamento e expansão <i>ex vivo</i> de CTMs.....	43

3.1.4 – Caracterização por Citometria de Fluxo.....	46
3.1.5 - Caracterização pelo método de <i>Western Blotting</i>	47
3.2 – Produção de Anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos expressos em CTM humana (ETAPA2).....	48
3.2.1– Obtenção de tecido adiposo humano e protocolo de produção do AcMm.....	48
3.2.2 – Cultura das células do tecido adiposo humano.....	49
3.2.3 – Teste adicional de Viabilidade Celular: Comprovação da ausência de danos no DNA pelo Teste Cometa.....	51
3.2.4 – Protocolo de produção dos AcMm anti-CTM humana.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 – Caracterização dos clones MSC – 160 A69 e MSC – 160 A30 dirigidos contra antígenos expressos em CTM de coelho pelo método de Citometria de Fluxo (ETAPA 1).....	59
4.2 - Protocolo CTMh: Produção de AcMm dirigidos contra antígenos expressos em CTM humano (ETAPA 2).....	71
4.2.1 – Comprovação da ausência de danos no DNA pelo Teste Cometa.....	71
4.2.2 - Produção de AcMm dirigidos contra antígenos expressos em CTM humano.....	72
5. CONCLUSÕES.....	74
6. PERSPECTIVAS.....	76
7. REFERENCIAS.....	78
ANEXOS.....	90



Resumos

RESUMO

A pesquisa em Biologia Celular, depende de técnicas laboratoriais que possam ser usadas para estudar a estrutura e função celular. Importantes avanços na compreensão das células têm sucedido diretamente o desenvolvimento de novas técnicas, que permitiram novos meios de investigação. Uma grande inovação da indústria biotecnológica é a produção de anticorpos monoclonais que são de extrema importância na área médica. Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm. Contudo, as células-tronco mesenquimais (CTMs) apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos, sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos. Essa imunofenotipagem é realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem esses antígenos de superfície da membrana celular, conforme demonstrado em estudos contemporâneos. O importante avanço da Terapia Celular em diferentes espécies animais tem alavancado à produção de anticorpos monoclonais para a caracterização fenotípica das células-tronco, sejam de origem hematopoiéticas ou de outros tecidos, por exigentes critérios de qualidade. Para o sucesso terapêutico há que se definir o perfil fenotípico das células a serem utilizadas na Terapia Celular, bem como proceder à quantificação das mesmas. Tendo em vista a inexistência no mercado de reagentes para coelhos e o elevado custo de aquisição para a espécie humana, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver uma ferramenta diagnóstica explorando seu potencial de uso. Foi realizada a caracterização de dois clones de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos expressos em células-tronco mesenquimais de coelhos, produzidos previamente no protocolo MSC, através de estudo com 5 amostras de medula óssea e tecido adiposo de animais expandidas em cultura observando assim o reconhecimento expressão fenotípica das células e o nível de reconhecimento dos clones frente a 5 diferentes passagens da cultura celular. A produção do anticorpo monoclonal dirigido contra antígenos de células-tronco humanas, protocolo CTMh, foi realizada pela técnica de *Köhler & Milstein* que constitui-se de etapas seriadas, incluindo imunização, fusão, screening, clonagem e caracterização de especificidade. Como resultado da caracterização do protocolo MSC a amostra do animal 5 teve desempenho importante com CD90 comercial (*pré-plaqueamento* 68,33%, *4ª passagem* 59, 86% e na *8ª passagem* 12,6%) e não perdeu a expressão com anticorpos produzidos *in house*. As amostras de medula óssea cultivadas apresentaram um perfil de células do estroma, dificultando assim sua análise em Citometria de fluxo devido ao seu tamanho superior e apresentar proteínas adesivas que se agregam *in vitro*. Foram produzidos um total de 70 clones no protocolo CTMh sendo 21 testados em Citometria de fluxo, dos quais 8 foram retidos e selecionados para produção em maior escala e caracterização de sua especificidade.

Palavras-chave: Anticorpos Monoclonais; Células-tronco adultas; Cultura celular.

ABSTRACT

Research in Cell Biology, depends on laboratory techniques that can be used to study the structure and cellular function. Important advances in understanding the cells have happened directly the development of new techniques, which enabled new ways of investigation. Breakthrough biotechnology industry is the production of monoclonal antibodies that are of extreme importance in the medical field. All body cells have a set of surface markers that characterize the biological uniqueness and mark cells that contain them. However, the mesenchymal stem cells (MSCs) have few specific immunophenotypic markers, and their characterization established by identifying a profile of specific markers and nonspecific. This immunophenotype is performed with the use of monoclonal antibodies that recognize these surface antigens of the cell membrane, as demonstrated in contemporary studies. The important advance in cell therapy in different species has underpinned the production of monoclonal antibodies for the phenotypic characterization of stem cells, they originate in hematopoietic or other tissues, exacting standards of quality. Therapeutic success is defined as the phenotypic profile of cells to be used in cell therapy, as well as the quantification of them. Given the lack of reagents on the market for rabbits and the high cost to human beings, the goal of this research was to develop a diagnostic tool for exploring its potential use. The characterization of two clones of monoclonal antibodies directed against antigens expressed in mesenchymal stem cells from rabbits, previously produced in the MSC protocol, through study with five samples of bone marrow and fat of animals expanded in culture so watching the speech recognition phenotype of the cells and the level of recognition of clones against 5 different passages of cell culture. The production of monoclonal antibody directed against antigens in human stem cells, CTMh protocol, was performed by Köhler & Milstein technique that consists of sequential steps, including immunization, fusion, screening, cloning and characterization of specificity. As a result of the characterization of the MSC protocol sample of the animal had five important performance trade with CD90 (68.33% pre-plating, 4th passage 59, and 86% at the 8th passage 12.6%) and lost the expression with antibody produced in house. The bone marrow samples showed a profile of cultured stromal cells, thus hindering their analysis in flow cytometry because of their size and provide superior adhesive proteins that aggregate in vitro. We produced a total of 70 clones and 21 in the protocol CTMh tested in flow cytometry, of which 8 were retained and selected for larger scale production and characterization of its specificity.

Keywords: Monoclonal Antibodies; Adult Stem Cells, Cell culture.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Terapia Celular

A terapia celular é um ramo da medicina regenerativa que tem como objetivo a utilização de células para o tratamento de doenças, onde se busca a substituição de células ou tecidos lesados para restaurar sua função. Na última década, os estudos na área de terapia celular intensificaram-se, principalmente empregando células-tronco como possibilidade na restauração de tecidos em geral, que não o sanguíneo^{1,2}.

A pesquisa em Biologia Celular depende de técnicas laboratoriais que possam ser usadas para estudar a estrutura e função celular. Importantes avanços na compreensão das células têm sucedido diretamente o desenvolvimento de novas técnicas, que permitiram novos meios de investigação^{3,4}.

1.2 – Anticorpos Monoclonais

Anticorpos são produzidos naturalmente numa resposta imune do organismo, porém estes não são específicos e ideais para serem utilizados como ferramenta de investigação e diagnóstico justamente por serem policlonais. Os antígenos de superfície normais e até mesmo os anormais foram descobertos graças ao advento dos anticorpos monoclonais que somente são produzidos no sistema imune em determinadas patologias⁵.

Uma grande inovação da indústria biotecnológica é a produção de anticorpos monoclonais que são de extrema importância na área médica⁶.

Em 1992, a fim de acompanhar a evolução tecnológica mundial, criou-se no Hemocentro de Botucatu (LAMB), resultados de um acordo internacional entre o Institute National de Transfusion Sanguine – INTS de Paris (França) e a Faculdade de Medicina de Botucatu. As linhas de atuação implantadas são semelhantes aquelas desenvolvidas pelo INST, sendo a linha principal baseada no diagnóstico em hemoterapia. Em dezembro de 1992 foi obtido o 1º clone brasileiro secretor de anti-A. Anticorpos monoclonais para uso diagnóstico hemoterápico foram produzidos, controlados e validados para uso interno.

O trabalho do Laboratório de Anticorpos Monoclonais tem resultado grande sucesso na obtenção de Anticorpos Monoclonais, sendo assim, parcerias tem sido realizadas com outras instituições com o intuito de otimizar a aplicabilidade dos anticorpos para uso terapêutico.

Anticorpos monoclonais (AcM) são biomoléculas indistinguíveis de anticorpos endógenos e de alta especificidade, características que lhe atribuem funções como reagentes utilizados em pesquisa biomédica, diagnóstico e inclusive no tratamento de doenças humanas e animais ⁷. São imunoglobulinas produzidas por Engenharia Celular através da fusão de células tumorais com linfócitos B provenientes de organismos previamente imunizados contra o antígeno de interesse, gerando hibridomas que crescem indefinidamente em cultura, por agregarem características de imortalidade das células tumorais capazes de secretar anticorpos. Após a clonagem, sendo todas as células oriundas de uma única, estas produzirão imunoglobulinas homogêneas ⁸.

Em 1975, foi descrito por George Kohler e Cesar Milstein a descoberta da produção de anticorpos com alta afinidade e única especificidade para um alvo antígeno. Para a produção de anticorpos específicos para determinado epítipo de um antígeno é necessário obter clones de animais que tenham sido imunizados com o antígeno de interesse, os linfócitos B que produzem anticorpos de especificidade única são fusionados com células tumorais para se tornarem imortais, crescendo indefinidamente em cultura celular. As células resultantes são denominadas hibridomas e após comprovação de sua especificidade os hibridomas são clonados, possibilitando que todas as células sejam oriundas de uma única, sendo, portanto, clones que produzirão apenas 1 tipo de imunoglobulina ^{9, 10, 11}.

A produção de AcMm pela técnica de *Köhler & Milstein* de 1975 ¹² (Figura 1) envolve procedimentos *in vivo* e *in vitro* e constitui-se de etapas seriadas, incluindo imunização, fusão, screening, clonagem, caracterização de especificidade e imunoquímica, reatividade do anticorpo, determinação do isotipo e potencial do epítipo alvo ¹³.

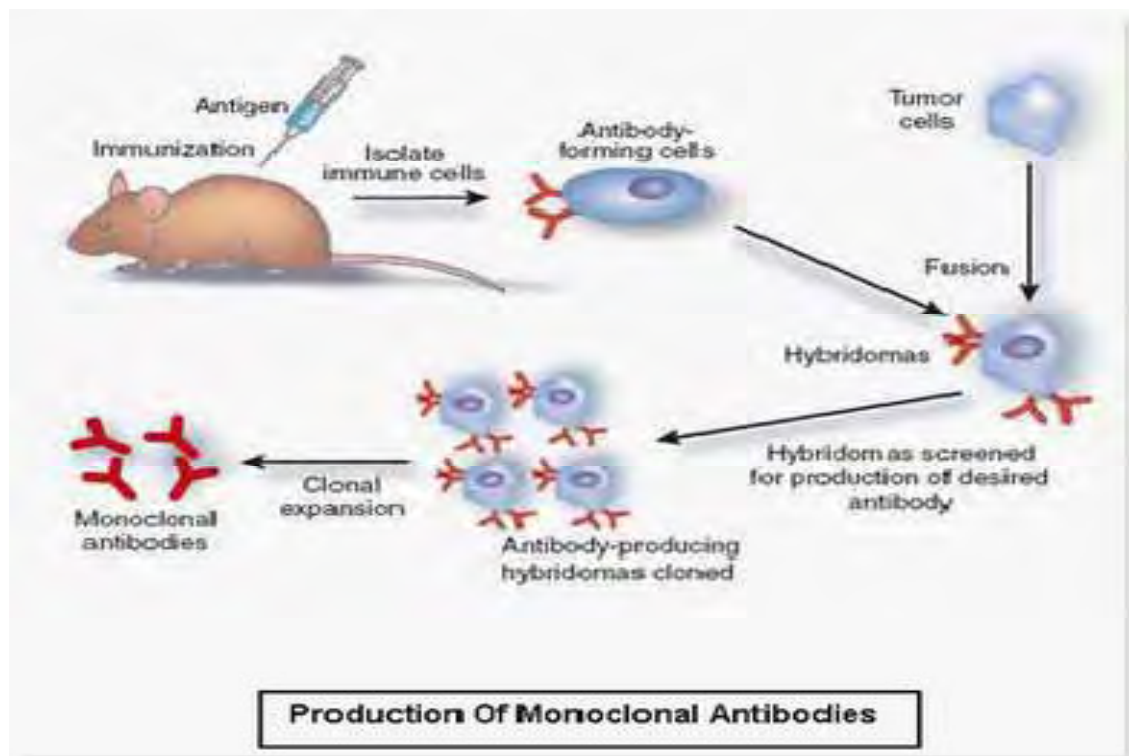


Figura 1 - Produção de anticorpos monoclonais. *Técnica para obtenção de anticorpos monoclonais desenvolvida por Köhler e Milstein, 1975*¹².

Como imunógeno, pode-se utilizar células intactas, membranas totais, frações de membrana, proteínas purificadas, proteínas carregadas, microorganismos, etc. A escolha do agente de imunização, sua via e a agenda de imunização determinam em parte o sucesso do protocolo de obtenção do determinado anticorpo monoclonal¹⁴.

Para a obtenção das células a serem fusionadas (através do método mais utilizado, quimicamente, com uso de polietilenoglicol, substância que causa fusão de membranas celulares), o baço é extraído e usado como fontes de células B. A fusão é realizada com células de mieloma murino (NS1-0), originando os hibridomas (figura 2), capazes de crescer indefinidamente sob condições ideais. As células mielomatosas, com gene hipermetilado, tem capacidade de multiplicar-se indefinidamente *in vitro*, sem produzir imunoglobulina e são deficientes de uma enzima a triptoxantina – fosforibosil – transferase – HGPRT, deficiência esta que é usada como meio de seleção dos hibridomas gerados. Os linfócitos B não têm essa capacidade, mas por sua vez, produzem imunoglobulina. Híbridos de boa qualidade são aqueles que herdaram a capacidade de multiplicação *in vitro* do mieloma e o gene de imunoglobulina do linfócito B. Para a esplenectomia o animal é anestesiado segundo as normas do Comitê

de Ética para manipulação de animais experimentais e no final do experimento, eutanasiado. As células cultivadas em meio seletivo HAT (Hipoxantina – Aminopterin – Timidina) promovem a proliferação dos hibridomas, ou seja, apenas fusões desejadas (Linfócito B/ NS1), cujo hibridoma herdou o sistema HGPRT dos linfócitos (HGPRT +) e usa a via alternativa para a síntese de nucleotídeos, fato esse impossível para o mieloma que não se fusionou, pois é HGPRT negativo ^{14, 15}.

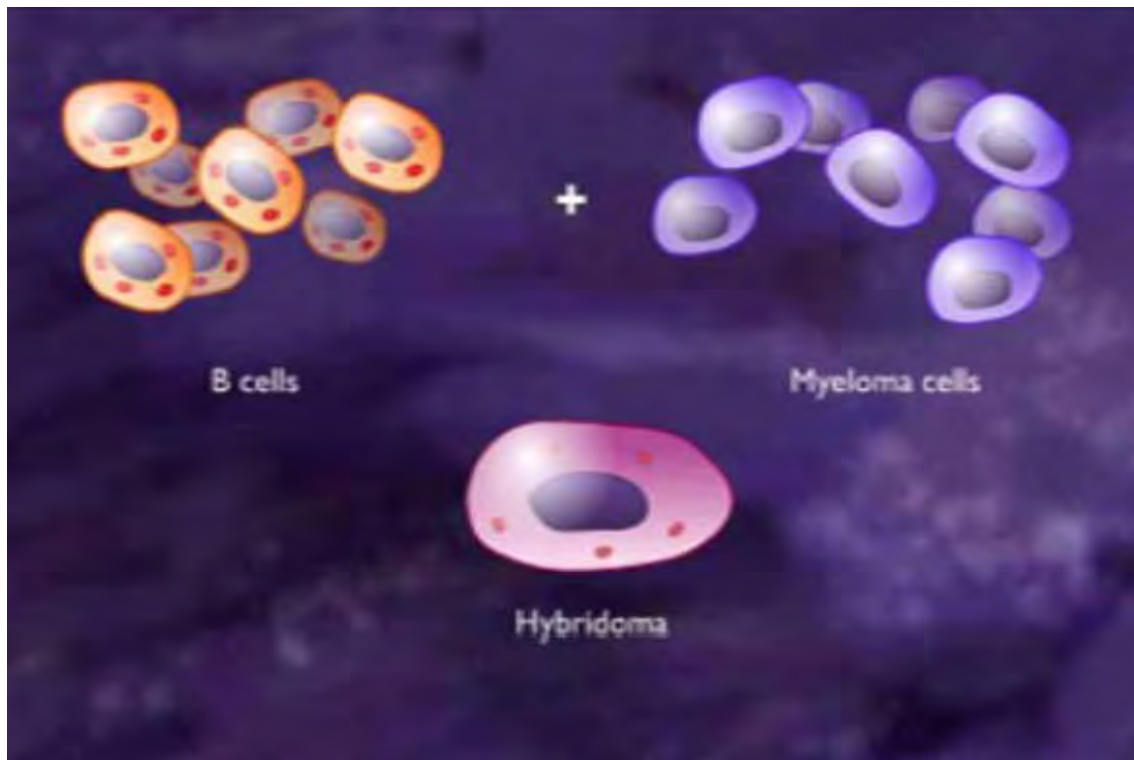


Figura 2 – Fusão resultando Hibridoma. (Fonte: Kravchencko et al., 2006) ¹⁴

Células de companhia (*feeders cells*) são adicionados aos hibridomas para suplementar fatores de crescimento, promovendo o desenvolvimento dos híbridos. A cultura dos híbridos deve ser mantida para a obtenção de sobrenadante de cultura contendo anticorpos, sendo estes então testados quanto a especificidade frente à célula imunógena. Como triagem, vários testes podem ser aplicados (Citometria de fluxo, Dot plot, Hemaglutinação, Western Blotting, etc.), no entanto a escolha deverá ser definida com base na aplicação que se deseja dar ao monoclonal ¹⁵.

1.3 - Cultura Celular:

Os primeiros experimentos de cultivo de células foram realizados por Ross Granville Harrison, na Universidade Johns Hopkins. A técnica foi desenvolvida pela desagregação de fragmentos de tecidos e o crescimento ficou restrito as células que migraram do tecido para o meio¹⁶.

Após o sucesso dos experimentos de Harrison, cresceu o interesse dos cientistas no cultivo de células *in vitro*. Pouco tempo depois, Alexis Carrel publicava um trabalho em que ele, baseado na descoberta de Harrison, buscava formas de prolongar o tempo de vida das células em cultura. Depois vieram os trabalhos de George Gey com células tumorais (estabelecendo a linhagem HeLa), e isso aumentou o interesse em cultivar tecidos humanos^{17, 18}.

Os estudos de Hayflyck e Moorhead com linhagens humanas deram grande contribuição para o uso do cultivo celular como importante ferramenta ao entendimento de processos biológicos¹⁹.

O trabalho com culturas celulares requer uma série de cuidados para que não haja, ou pelo menos, se reduzam aos riscos de contaminação e consequentemente, a perda de tempo, de reagentes e de material biológico. As fontes mais comuns de contaminação com bactérias, micoplasma e fungos podem ser introduzidas pelo operador, ar, bancada, soluções ou vidraria. Por isso existem cuidados essenciais a serem tomados quando se trabalha com células em cultura²⁰.

As linhagens celulares podem ser classificadas em dois tipos: Linhagens aderentes e em suspensão, que se referem de acordo com a necessidade de ancoragem que as linhagens aderentes apresentam. As células que pertencem a linhagem aderente dependem da fixação à base dos frascos ou placas de cultura, essas representam a maioria das linhagens em estudo. Ao contrario das aderentes, as células da linhagem em suspensão não dependem de ancoragem e se proliferam em suspensão²¹.

Uma cultura de células aderentes pode ser transferida para outro frasco e diluída por dissociação com enzima tripsina EDTA, iniciando assim as passagens. A manutenção de células aderentes em subconfluência é simples, apenas a troca de meio se faz necessária, a substituição do meio de cultura a cada 48h possibilita a nutrição

adequada das células e a eliminação de metabólitos secretados para o meio, alguns testes para confirmação da viabilidade celular são necessários para confirmar a integridade da mesma em cultura, a fim de validar seu uso como antígeno para produção de AcMm e seu uso em Terapia Celular²⁰.

1.4 – Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa (EC), “Single Cell Gel Electrophoresis”, é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do dano do DNA em células individualizadas de mamíferos. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. As células, envolvidas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo²².

Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo (nucleossomo) são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, crosslinks, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis^{22, 23, 24}.

A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras como, por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda classificar visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células. O Ensaio Cometa é utilizado amplamente na genética médica, genética toxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações^{25, 26}.

1.5 – Células-tronco

Células-tronco (CT) são células que tem potencial de diferenciação em diversos tipos celulares do organismo, como células musculares, hemácias e neurônios. Estas células têm capacidade de reparar e substituir as células danificadas ou degeneradas do organismo^{2,7}.

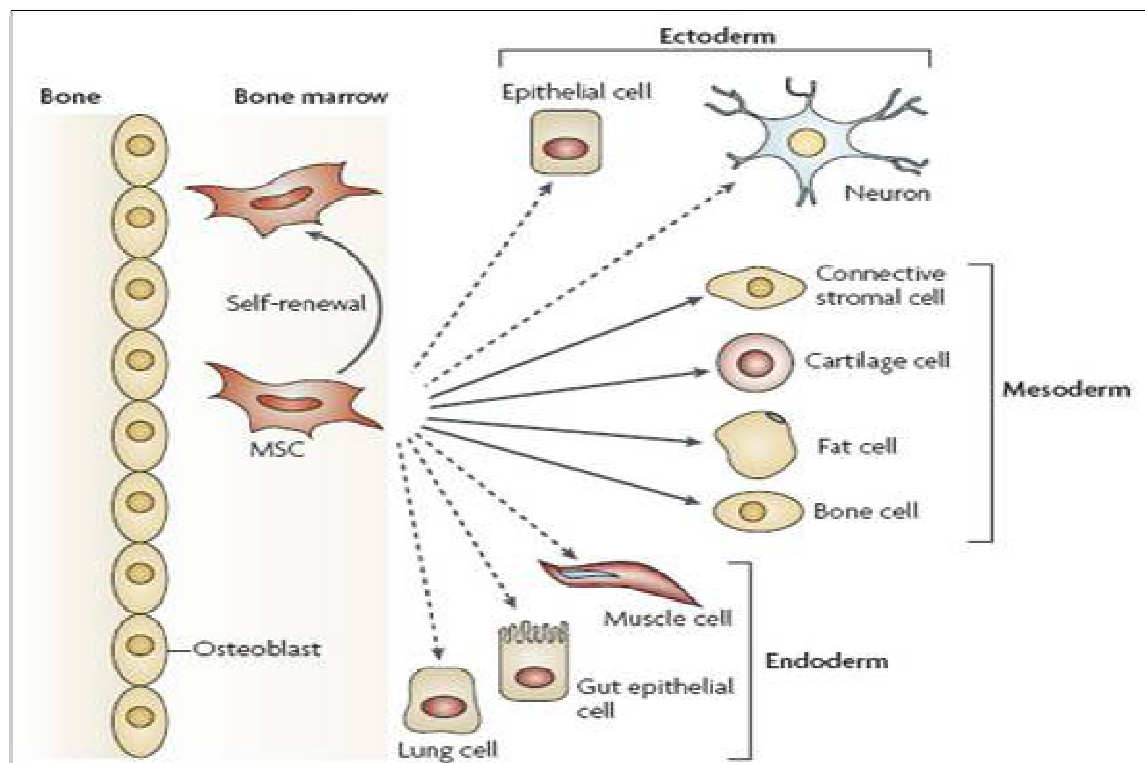


Figura 3 - A multipotencialidade das CTMs. (Fonte: Ucelli, et al. 2008)²⁸

A existência de uma célula primitiva capaz de se autorrenovar e de originar outras células, tem sido aventada desde o século XIX com Wilson (1896)²⁹.

As células-tronco apresentam-se morfologicamente como um blasto indiferenciado, praticamente não expressando ou expressando pouco, marcadores específicos de linhagem, sendo, portanto, difíceis sua caracterização e reconhecimento. Sendo assim é mais fácil caracterizá-las por suas propriedades funcionais; indiferenciadas, que apresentam alta capacidade de proliferação e auto-renovação, podem originar células progenitoras, são capazes de regenerar um tecido após uma lesão

e são capazes de modular estas atribuições. Porém essas características podem não ser expressas simultaneamente mesmo *in vivo* ^{29,30,31,32}.

As técnicas de obtenção de células-tronco induzem modificações no sistema biológico que, invariavelmente alteram o comportamento e provavelmente o número da população obtida. A auto-renovação e a capacidade de modulação talvez sejam as características mais importantes. Outro aspecto fundamental é a capacidade da célula-tronco manter a celularidade do tecido e originar a(s) diferente(s) célula(s) desse tecido, implicando a capacidade de diferenciação ³³.

As propriedades funcionais de autorrenovação e de diferenciação capazes de originar diferentes linhagens celulares são responsáveis pela caracterização das células-tronco que na maioria das vezes é realizada por algumas características como a incorporação de rodamina, detecção de marcadores de superfície, que são conjuntos de moléculas utilizados para diferenciar os variados tipos de células e são chamados CDs (do inglês *Cluster of Differentiation*), ou pelo fenótipo da progênie resultante ².

1.6 – Células-tronco Hematopoiética

As CTHs constituem uma rara população celular, são capazes de originar uma progênie celular que é responsável pela produção diária (em humanos) de hemácias, leucócitos e plaquetas, as CTHs possuem incrível capacidade de autorrenovação e são células multipotentes ³⁴.

As CTHs podem ser divididas em três tipos: CTH com capacidade de autorrenovação a longo tempo (LT-CTH), CTH com capacidade de autorrenovação a curto tempo (CT-CTH) e multilinhagem progenitora (PM) que aparentemente são incapazes de se autorrenovar. Enquanto as LT-CTHs são consideradas capazes de se renovar indefinidamente, sendo responsáveis por repopular todo o sistema hematopoiético, as CT-CTHs e as PMs tem curta duração sendo capazes de manter a hematopoiese de um camundongo irradiado por no mínimo 4 meses. Esses estudos mostram que para se utilizarem CTHs em Terapia Celular, a célula de escolha são as LT-CTHs. A identificação e separação destas diferentes populações de células recaem sobre combinações de marcadores de superfície, uma vez que nenhuma delas possui um marcador específico ^{35, 36, 37}.

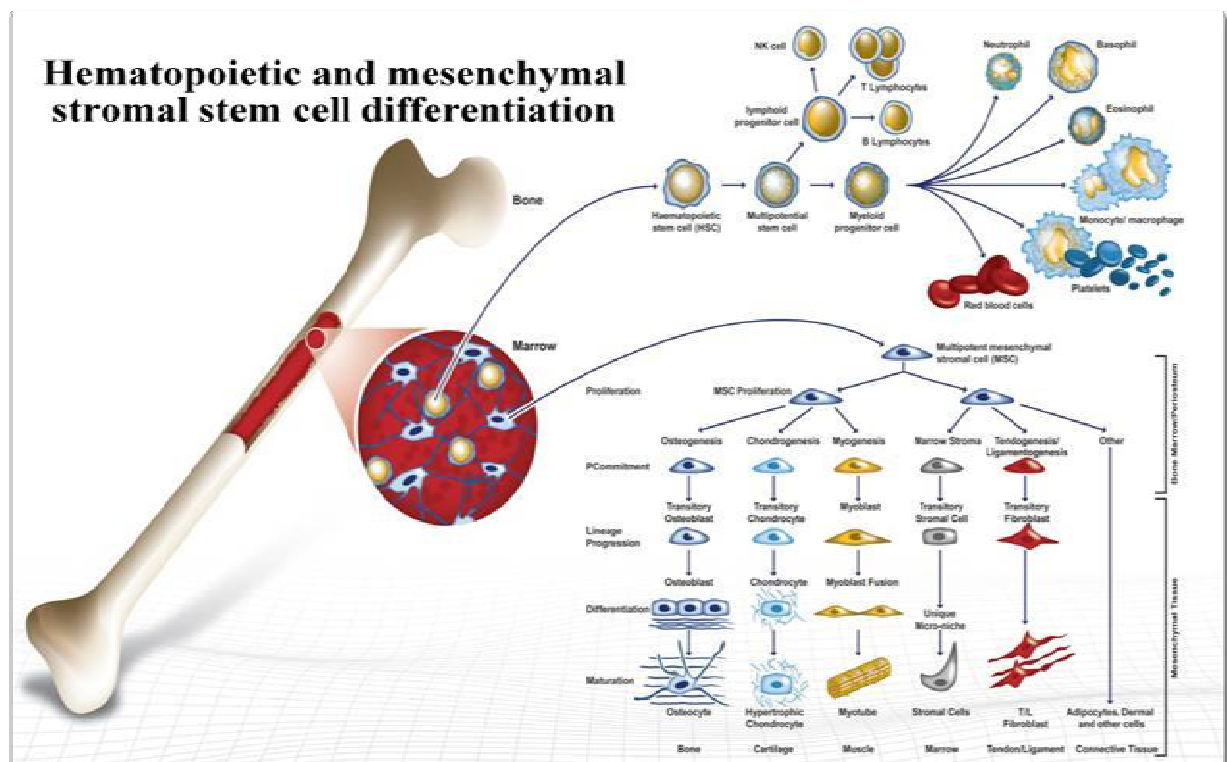


Figura 4 – Diferenciação das Células-tronco Hematopoiéticas.

(Fonte: <http://www.abcam.com/ps/pdf/stemcells/MesenchymalCard.pdf>)

As CTHs são encontradas principalmente na medula óssea (MO), a qual é um tecido gelatinoso que preenche a cavidade interna dos ossos, a função desse tecido é produzir os componentes do sangue, sendo, portanto um órgão hematopoiético ^{38, 39}.

Quanto ao fenótipo de superfície das CTHs, a presença do antígeno CD34 é o principal marcador dessa população. Além do CD34, outros marcadores de superfície e certos corantes, têm sido utilizados para a caracterização do fenótipo da CTH, que atualmente pode ser definida como CD34+, CD38-, CD33-, CD45+, CD71-, entre outros ^{40, 41}.

As CTHs humanas e murinas apresentam algumas características imunofenotípicas comuns. Ambas expressam Thy-1 (CD90) e não expressam marcadores de linhagem negativo das células sanguíneas mais maduras. As CTHs murinas, diferentemente das humanas, expressam níveis altos dos marcadores C-kit, Scal e CD150 e não expressam o FLK2 e o CD34 ⁴².

Além da MO, CTHs podem ser também encontradas e isoladas a partir de sangue periférico e sangue de cordão umbilical. Em adultos normais, a concentração de

células CD34+ no sangue periférico corresponde a 1/10 daquelas da MO, embora esse numero possa variar de acordo com a idade ou circunstâncias especiais ^{27, 41}.

De acordo com achados de Friedenstein *et al.* (1966) ⁴³ na MO comprova-se a existência de células-tronco não-hematopoiéticas (mesenquimal). A MO é composta por duas linhagens distintas e dependentes: a hematopoiética e o estroma associado, que formam um sistema cooperativo ^{43, 44}.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) ou do inglês *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) da MO apresentam algumas características que as distinguem das hematopoiéticas, mas ambos os tipos celulares são de fácil separação *in vitro*. Quando a medula óssea é dissociada e o material é colhido em um gradiente de densidade, as CTMs apresentam a propriedade de se aderir a tubos e frascos de cultura, enquanto que as CTHs não possuem essa capacidade de adesão ⁴⁴.

Células-tronco hematopoiéticas são células determinadas às diferentes linhagens hematopoiéticas, com alto potencial e taxa de proliferação. Essas por sua vez originam as Células Precursoras Hematopoiéticas e Células Maduras do sangue e de outros órgãos, sendo totalmente diferenciadas morfo e funcionalmente, elas dão origem a diversos tipos de células do sangue, da linhagem mielóide (monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, células dendríticas) e da linhagem linfóide (linfócitos T, linfócitos B) ^{44, 46}.

As células do estroma medular, também conhecidas como células-tronco estromais, são células não sanguíneas derivadas a partir de órgãos do sistema sanguíneo, tais como a medula óssea ou o fígado fetal, que são capazes de auxiliar o crescimento de células do sangue *in vitro*. As células de estroma que constituem a matriz dentro da medula óssea derivam de células estaminais mesenquimais e estão relacionadas à manutenção de um microambiente de preservação das CTHs, sendo que a progênie já diferenciada recebe os sinais necessários para a maturação celular ^{45, 46}.

1.7 – Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas, multipotentes de população celular heterogênea e alto potencial regenerativo. CTMs se proliferam *in vitro* como células aderentes ao frasco de cultura, possuem morfologia fibroblastóide e formam colônias em cultura capazes de se diferenciar em células da

linhagem mesodermal como osteócitos, adipócitos e condrócitos, bem como em outras linhagens embrionárias, revelando alto índice de plasticidade ⁴⁶.

As CTMs caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras. Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo. Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular ^{47, 48}.

CTMs já foram obtidas de quase todos os tecidos conjuntivos e tem sido caracterizada majoritariamente após isolamento de MO, sendo esta, portanto a principal fonte de obtenção ⁴⁹.

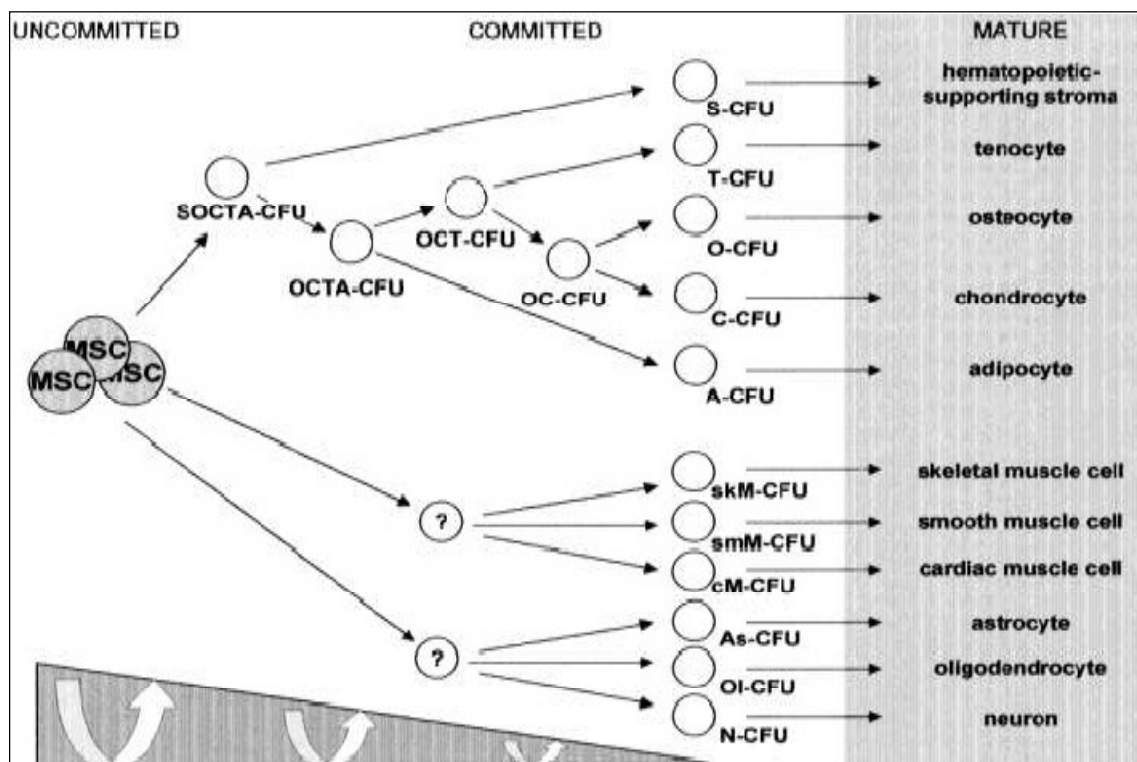


Figura 5 – Diagrama esquemático da hierarquia proliferativa das células progenitoras mesenquimais. (Fonte: Minguell et al., 2000) ⁵⁰.

O tecido adiposo (TA) representa uma fonte alternativa na obtenção de CTMs devido à grande concentração destas células no mesmo. A fração do estroma vascular se tornou foco de investigações após comprovar-se capaz de fornecer CTMs multipotentes, apresentando assim vantagens potenciais para as aplicações na Engenharia de Tecidos. Contudo, a preparação das células em laboratório para a cultura não são idênticas. A maioria dos pesquisadores ao isolar células obtidas de TA através de métodos descritos por Rodbell e colaboradores, os tecidos são picados, digeridos com collagenase e fracionado por centrifugação diferencial e então as células são colocadas em cultura, a população de células podem ser utilizadas para uma variedade de testes, atualmente existem pesquisas quanto a eficácia da obtenção de CTMs de TA pelo método de dissociação mecânica^{51, 52}.

Em cultura e em condições adequadas de cultivo, as CTMs exibem morfologia fibroblastoide, adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos (Figura 6). Podem ser expandidas por mais de 40 gerações mantendo capacidade multipotente, embora reduzam as taxas de mitose e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico, nestas condições^{53, 54}.

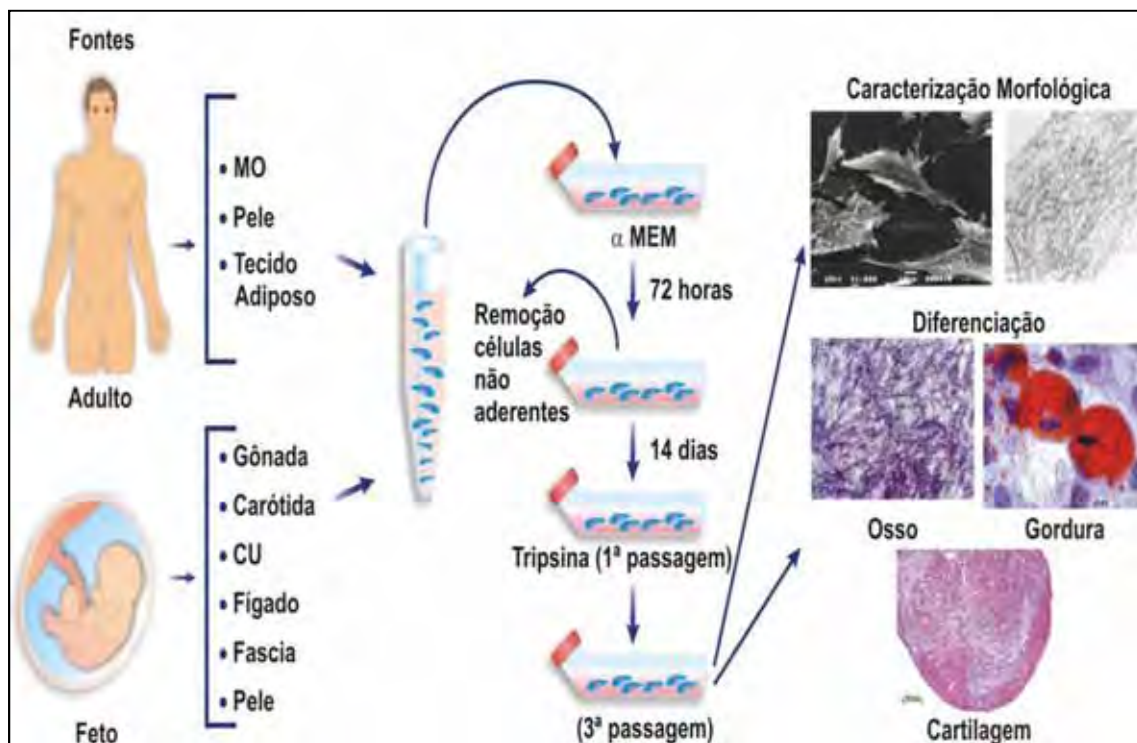


Figura 6 – Diferenciação em cultura das CTMs. (Fonte: Covas, 2006)⁴⁰

As CTMs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual ^{55, 56, 57}.

De todas as linhagens de células-tronco somáticas estudadas até o presente momento, as CTMs apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis. Contudo, os mecanismos de plasticidade não são totalmente compreendidos. Inicialmente acreditava-se que as CTMs originavam linhagens celulares diferentes por transdiferenciação. Segundo essa teoria, elas alterariam sua expressão gênica para a de uma linhagem celular completamente diferente, originando tipos celulares distintos. A transdiferenciação pode ocorrer de forma direta, quando a célula altera seu citoesqueleto e sua síntese protéica para rediferenciar-se em outro tipo celular específico, ou indireta, quando desdiferencia-se em uma célula-tronco mais primitiva para, posteriormente, se rediferenciar em outro tipo celular ⁵⁸.

Existem 3 principais processos envolvidos na diferenciação celular: a Interação célula-célula que faz com que células muito próximas umas das outras passem a secretar substâncias que irão fornecer um ambiente propício a diferenciação; a Divisão Celular, onde as células podem se dividir de duas formas distintas, uma célula dá origem a duas células-filhas que são idênticas entre si e exatamente iguais a célula-mãe, sendo assim não ocorre diferenciação, porém na divisão assimétrica, a distribuição dos componentes celulares no momento da citocinese ocorre de forma desigual, como são células diferentes podem participar da formação de diferentes tecidos; e a Regulação Gênica que envolve a acetilação da cromatina e eucromatina. A diferenciação celular ocorre em um processo chamado organogênese, ainda no útero materno nos primeiros estágios da gestação ^{59, 60}.

1.8 – Marcadores de Superfície

Todas as células do organismo apresentam um conjunto de marcadores de superfície que caracterizam a singularidade biológica e a marca das células que os contêm. Contudo, as MSC apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos, sendo sua caracterização estabelecida pela identificação de um perfil de

marcadores específicos e não específicos. Essa imunofenotipagem é realizada com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem esses antígenos de superfície da membrana celular, conforme demonstrado em estudos contemporâneos^{40, 49, 61, 62}.

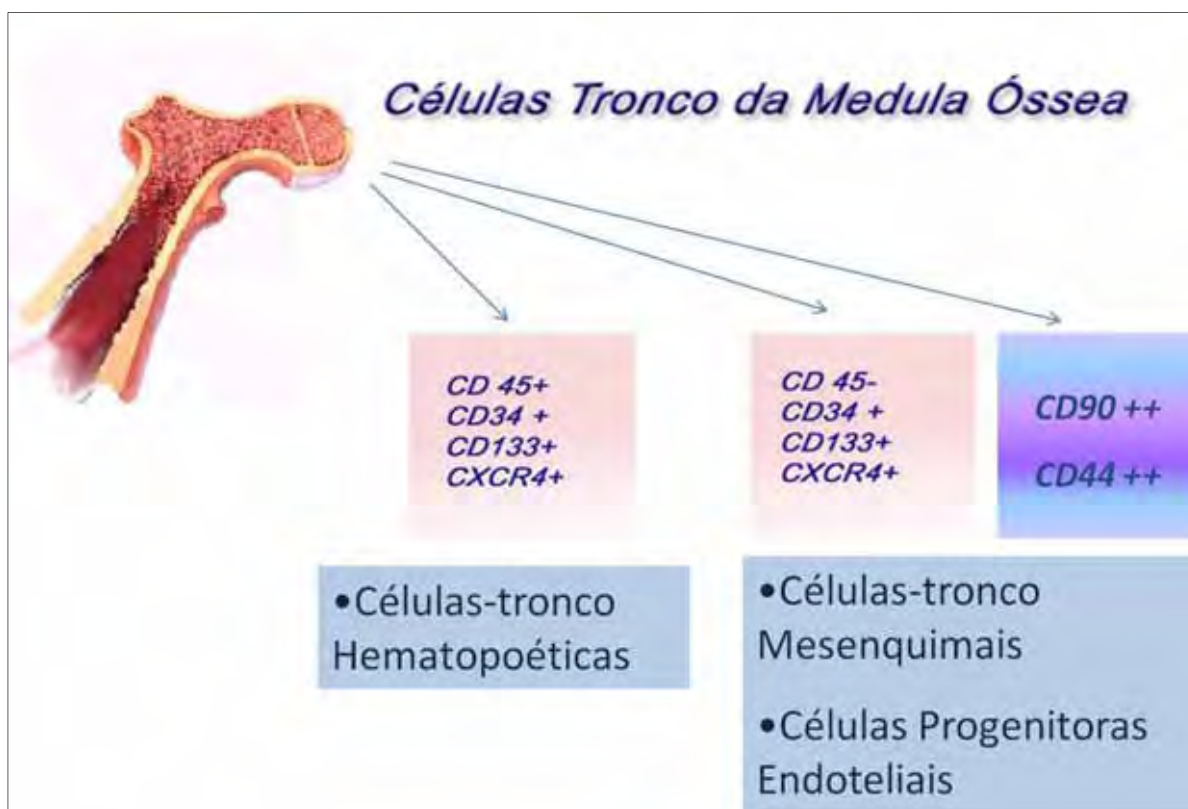


Figura 7 – Marcadores de superfície das CT de MO. (Fonte: Covas, 2008)⁶³

CTMs cultivadas *in vitro* ainda não possuem marcadores únicos e específicos conhecidos. Existe um consenso geral de que CTMs humanas adultas de medula óssea não expressam os marcadores hematopoiéticos CD45 (marcador de todas as células hematopoiéticas), CD34 (um marcador de célula-tronco hematopoiética primitiva, raramente expressa em CTMs humanas, apesar de ser positiva em camundongos), e CD14. Não expressam CD11b (um marcador de célula imune) e glicoforina-A (marcador de linhagem eritróide). CD117 (um marcador de célula-tronco progenitora hematopoiética) está quase sempre ausente de CTMs humanas. Não expressam as moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40, ou as moléculas de adesão CD31 (PECAM-1, expresso em células endoteliais e hematopoiéticas), CD18 (LCAMB), CD56 (NCAM-1). Expressam níveis variáveis de CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 (receptor de transferrina), gangliosídeo GD2 e CD271 (receptor do fator de crescimento nervoso de baixa afinidade), que são

reconhecidos pelo anticorpo monoclonal Stro-1, assim como as moléculas de adesão CD106 (VCAM-1), ALCAM, ICAM-1 e CD29. Estes são alguns dos marcadores expressos ou não descritos por diferentes grupos ^{64, 65, 66}.

Stro-1 não é um marcador geral de CTMs, pois não é exclusivo de CTMs e sua expressão é gradativamente perdida durante a expansão em cultura, limitando o seu uso no isolamento de CTMs ou sua identificação nas passagens iniciais. Talvez, porém, combinações como Stro-1 e CD106 poderiam constituir bons marcadores para a identificação de CTMs humanas ⁶⁷.

A expressão variável de muitos dos marcadores de linhagem pode ser devida não somente aos diferentes métodos de isolamento celular e características da cultura, mas também à variação na origem do tecido e às diferentes espécies. Por exemplo, o tecido adiposo humano é uma fonte de células-tronco multipotentes que podem diferenciar-se em várias linhagens mesenquimais *in vitro*. Mas, há algumas diferenças na expressão de marcadores particulares: expressam CD49d, o que não ocorre com as CTMs de medula óssea, enquanto estas expressam CD106, mas não as de tecido adiposo. CD106, nas CTMs de medula, tem sido associado funcionalmente à hematopoese; assim, a falta de sua expressão nas CTMs de tecido adiposo é consistente com a localização destas células em tecido não-hematopoético ^{66, 67, 68, 69, 70}.

Embora já tenham sido identificados oito marcadores de superfície para identificação de CTMs, a *International Society for Cellular Therapy* concorda que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, quando não estiverem expressos marcadores hematopoéticos, é suficiente para a imunofenotipagem dessas células. Contudo, essa caracterização deve sempre estar acompanhada da demonstração da aderência celular por longos períodos em cultura e da diferenciação destas em pelo menos duas linhagens celulares distintas ⁷¹.

1.9 – Citometria de Fluxo e *Western Blotting*

Atualmente uma ferramenta tecnológica na validação e caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos por técnicas de Engenharia Celular é a Citometria de Fluxo (CF), portanto em diversos casos podemos utilizar a técnica de *Western*

Blotting para rastrear a especificidade do anticorpo monoclonal produzido através da identificação de seu peso molecular.

A CF um método tecnológico que permite verificar características físico-químicas em células ou partículas individualmente, permitindo caracterizar variações destas, é um método rápido e objetivo que permite a determinação de múltiplas propriedades celulares simultaneamente de partículas isoladas em suspensão, pode-se detectar e quantificar antígenos celulares de superfície, citoplasmáticos e nucleares por esse método; a análise pode ser realizada através de sangue periférico, aspirado da medula óssea ou linfonodo, colhido com anticoagulante e as amostras devem ser mantidas à temperatura ambiente e preferencialmente, o material deve ser analisado até 24 horas após a coleta^{72, 73}.

A vantagem da CF ao analisar células individualmente, quando estas estão marcadas com fluorocromos que são moléculas próprias para marcar um alvo específico, podendo ser monitoradas em tempo real sem a necessidade de separar células marcadas das não marcadas. Os fluorocromos produzem resposta observável espectroscopicamente após estímulo, porém suas características devem ser compatíveis ao equipamento que será utilizado^{13, 74, 75}.

A avaliação do tamanho relativo da célula (“Forward scatter – FSC”) e da granulosidade ou complexidade interna da célula (“Side Scatter – SSC”) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos. A imunofenotipagem consiste no isolamento de populações de células distintas com diferentes antígenos de superfície marcados com anticorpos fluorescentes específicos. A avaliação da intensidade de fluorescência ocorre para detecção de antígenos de superfície diferentes marcados com anticorpos monoclonais específicos ligados a compostos químicos fluorescentes ou fluorocromos^{76, 77}.

Western blotting é um método em biologia molecular e bioquímica para detectar proteínas em células integras ou em um extrato de um tecido biológico. identifica anticorpos contra proteínas específicas com que foram separados uns dos outros de acordo com o seu tamanho. Essa técnica usa eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde foram usados como sonda anticorpos específicos à proteína. Como um resultado examina-se a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar-se os níveis entre diversos grupos⁷⁸.

O teste é utilizado como um valioso recurso na caracterização de frações antigênicas imunodominantes e identificação da reatividade específica de anticorpos detectados por um teste de triagem utilizando múltiplas frações antigênicas (teste confirmatório ou suplementar). Para a detecção da interação antígeno-anticorpo é necessário em primeiro lugar a obtenção da membrana com as frações da mistura antigênica, onde as proteínas são separadas de acordo como o seu tamanho, através de eletroforese em gel. Depois de separadas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose onde ficam inertes e posteriormente serão utilizadas como suporte para a detecção da interação antígeno-anticorpo ^{79, 80}.

O importante avanço da TC em diferentes espécies animais tem alavancado à produção de anticorpos monoclonais para a caracterização fenotípica das células tronco, sejam de origem hematopoiéticas ou de outros tecidos, por exigentes critérios de qualidade. Para o sucesso terapêutico há que se definir o perfil fenotípico das células a serem utilizadas na TC, bem como proceder à quantificação das mesmas.

Tendo em vista a inexistência no mercado de reagentes para coelhos e o elevado custo de aquisição para a espécie humana, optou-se em delinear um projeto que desenvolvesse a ferramenta diagnóstica explorando seu potencial de uso.



Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

- ✓ Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos expressos por células-tronco adultas de duas diferentes espécies.

2.2 – Objetivos Específicos:

- ✓ Caracterizar 2 clones de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos expressos em CTMs de coelhos pelo método de Citometria de fluxo e *Western Blotting*.
- ✓ Produzir anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos expressos em CTMs-TA humano.
- ✓ Avaliar a presença de dano de DNA nas CTMs de tecido adiposo humano utilizadas como antígeno para produzir o anticorpo monoclonal através do Ensaio Cometa.



Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

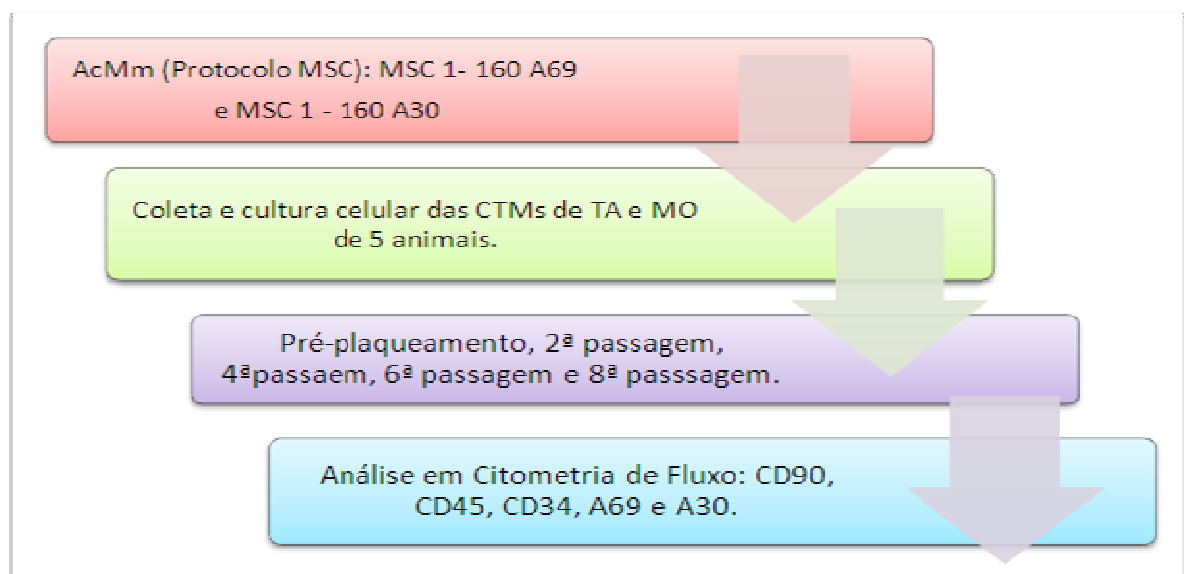
Para facilitar a disposição dos métodos utilizados, este trabalho foi dividido em 2 etapas: **Etapa 1:** Caracterização de 2 clones de AcMm dirigidos contra antígenos de CTMs de coelhos, produzidos por Moroz e Almeida, 2009; **Etapa2:** Produção de AcMm dirigidos contra antígenos de CTMs de origem humana.

3.1 - Caracterização de Anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos expressos em CTM de coelho (ETAPA 1)

3.1.2 – Levantamento dos anticorpos utilizados e protocolo de caracterização dos AcMm anti-CTM de coelho.

Através de arquivos de protocolos do Laboratório de Engenharia Celular do hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, escolheu-se para a análise 2 clones de anticorpos monoclonais murinos (protocolo MSC) dirigidos contra antígenos expressos em CTM de coelhos. Foram selecionados 5 animais (coelhos) para a obtenção das células utilizadas para a validação dos clones, de cada animal foram coletadas amostras de tecido adiposo (TA) e medula óssea (MO), as amostras foram cultivadas e analisadas nas seguintes fases: Pré-plaqueamento, 2ª passagem, 4ª passagem, 6ª passagem e 8ª passagem, afim de observarmos a expressão de CD90, CD45, CD34 e afinidade com os clones do protocolo MSC de acordo com *fluxograma 1*.

Fluxograma 1. Protocolo de caracterização dos AcMm anti-CTM de coelho.



3.1.2 – Animais

A utilização de animais neste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, como consta no protocolo n.741/2009, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo COBEA. Foram utilizados cinco coelhos da raça *New Zealand* linhagem Botucatu para obtenção das amostras de tecido adiposo e medula óssea provenientes do Biotério de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu.

3.1.3 – Isolamento e expansão *ex vivo* de CTMs

Amostras de medula óssea foram obtidas por punção de crista ilíaca de coelhos. As células foram plaqueadas em frascos de cultura de 25cm² e então selecionadas com base em sua habilidade de aderir ao frasco de cultura. As células hematopoiéticas não aderentes foram removidas da cultura durante a troca do meio. O meio de cultura utilizado foi o DMEM Knockout (Invitrogen™), suplementado por: 5mL de antibiótico/antimicótico (Invitrogen™), 5mL de L-glutamina (Invitrogen™), 5mL de aminoácidos essenciais (Invitrogen™), 2,5mL de aminoácidos não essenciais (Invitrogen™) e 50mL de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen™). As células permaneceram em estufa a 37.C, com 5% de CO₂ (Thermo Class 100.).

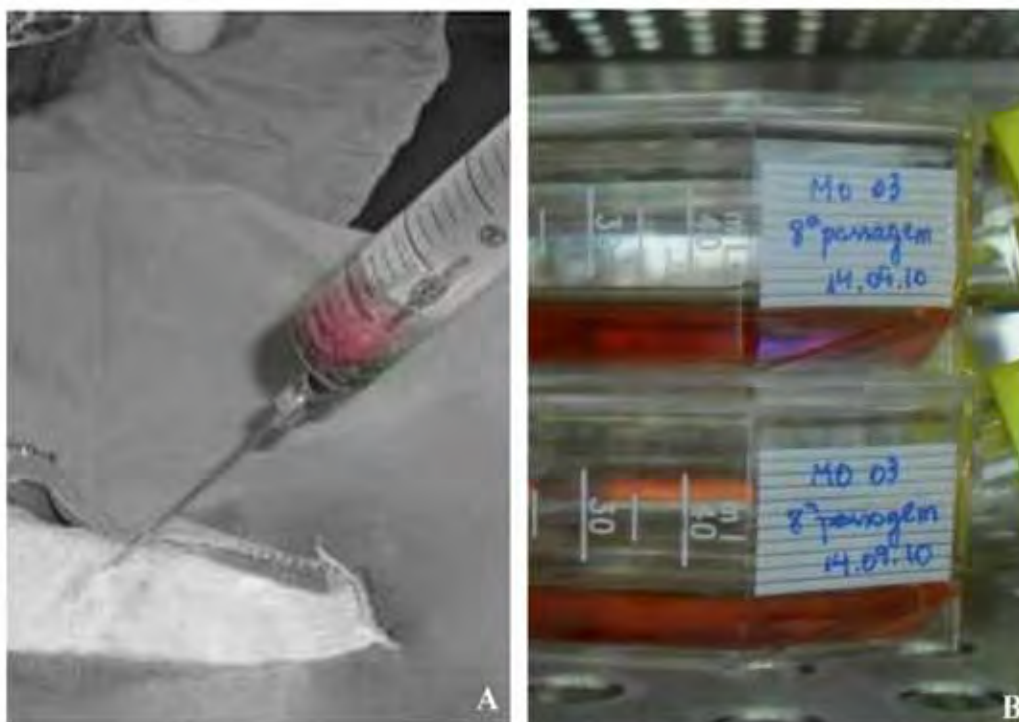


Figura 8. Isolamento e expansão das CTMs de coelho provenientes de Medula Óssea. A Coleta do aspirado de Medula Óssea de Coelho B Plaqueamento e cultura das células em frascos de 25cm².

A determinação do número de células viáveis totais foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer. Primeiramente a troca do meio foi realizada três dias após o procedimento, quando se tornaram evidentes várias colônias das células do estroma medular, espalhado pelo frasco. Após 14 e 21 dias do estabelecimento da cultura primária, observou-se a predominância de células ocupando 70% da área de aderência. Estas foram ressuspensas utilizando 0,25% tripsina-EDTA (Invitrogen™) e congeladas para posterior utilização. A cultura foi mantida até a 8ª passagem, foi congelada uma alíquota de $1,0 \times 10^6$ células de cada passagem de interesse para a posterior análise em Citometria de Fluxo.

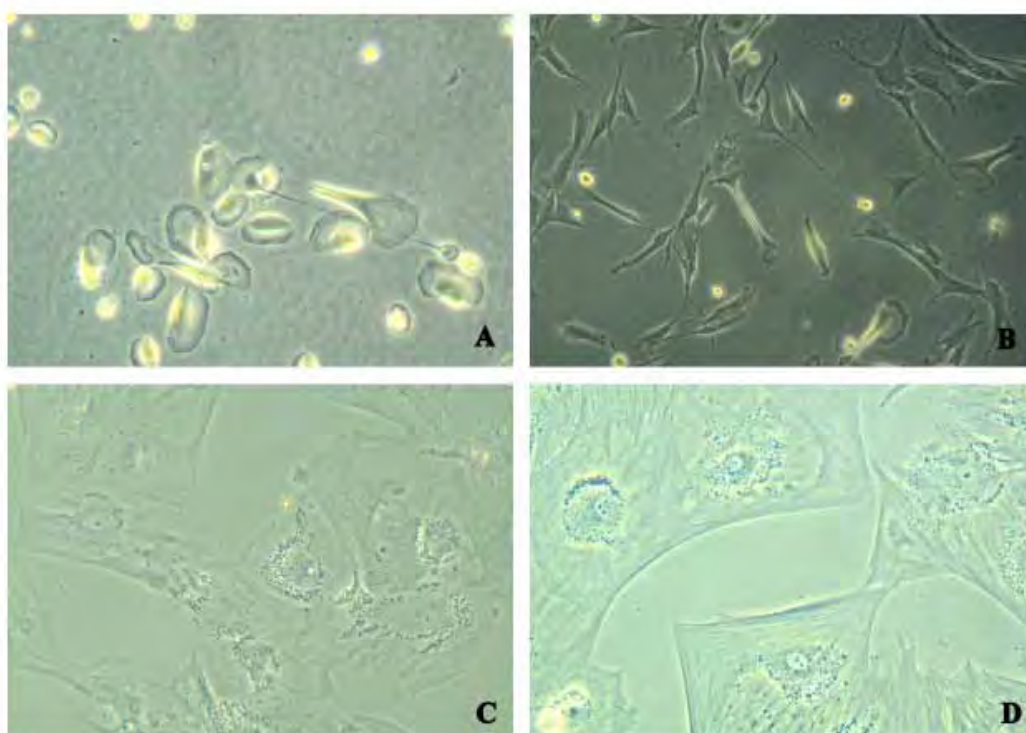


Figura 9. CTMs provenientes de Medula Óssea de Coelho – Objetiva de 20X.
A 3 dias pós-plaqueamento, B 7 dias pós-plaqueamento, início da expansão celular, C 14 dias pós-plaqueamento, apresentando 30% de confluência no frasco, D 17 dias pós-plaqueamento, células integras de grandes dimensões.

Após coleta, os tecidos adiposos foram transportados ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. O processo de dissociação mecânica foi realizado com *cell scraper* para desprendimento das células do tecido. As células foram transferidas para seringas, as quais foram colocadas na posição vertical por 10 minutos com o bisel voltado para baixo, com o intuito de separação de debris. Em seguida, o conteúdo da seringa foi transportado para tubo Falcon® e centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. O *pellet* obtido foi ressuspensão em

meio de cultura e uma alíquota foi separada para contagem das células. A viabilidade foi realizada com azul de trypan.



Figura 10 - Isolamento e expansão das CTMs de provenientes de Tecido Adiposo - A, B, C Coleta do fragmento em diferentes etapas; D Dissociação Mecânica.

As células obtidas foram plaqueadas em frascos de 25cm² (Corning) a concentração de 10⁴ cels/cm². O meio de cultura utilizado foi o DMEM F12 com 10% de soro fetal bovino, suplementado com aminoácidos essenciais e não-essenciais, L-glutamina e antibiótico/antimicótico. O meio foi trocado a cada dois dias e a inspeção ao microscópio realizada diariamente. Após a cultura alcançar 80% de confluência, as células foram ressuspensas com uso de tripsina a 0,25% em EDTA. As células foram novamente plaqueadas, na mesma concentração celular. Em todos os momentos de tripsinização as células foram avaliadas quanto à viabilidade pelo método de exclusão de células não-viáveis pelo azul de trypan. Somente nas passagens que necessitavam de posterior análise em Citometria de Fluxo (2^a passagem, 4^a passagem, 6^a passagem e 8^a passagem) foi utilizada a tripsina para a ressuspensão das células, quando era necessário apenas ressuspender as células aderidas para manter a próxima passagem da cultura, foi utilizado o método de despreendimento celular por *cell scraper* (em ambos os materiais: Medula óssea e Tecido adiposo).

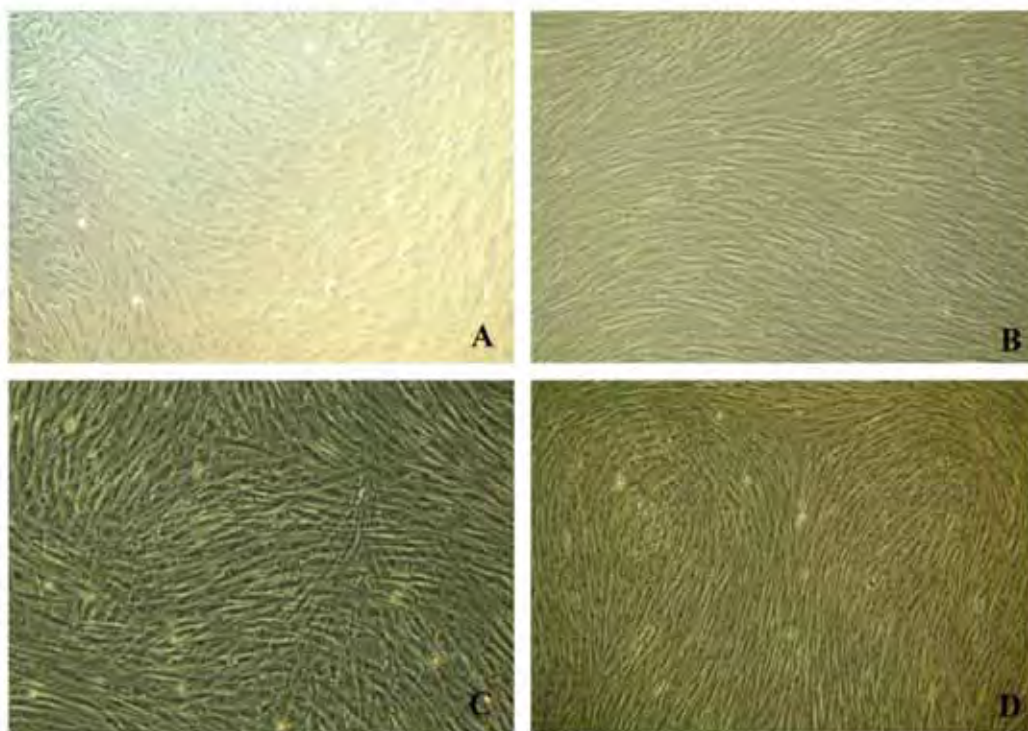


Figura 11 - Cultura de CTMs (Tecido adiposo de Coelho). *Comportamento celular da mesma amostra nas quatro principais passagens que foram posteriormente submetidas a análise na Citometria de Fluxo (A 2ª passagem, B 4ª passagem, C 6ª passagem, D 8ª passagem).*

3.1.4 – Caracterização por Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo mede as propriedades de células em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de *laser*. As modificações ocasionadas nesse feixe de luz devidas à presença serão então detectadas e mensuradas por sensores (detectores). A luz é dispersa e coletada. Os diferentes fluorocromos que marcam cada antígeno absorvem a luz e emitem-na num comprimento de onda maior e específico.^{24, 22} Os parâmetros primários adquiridos pelo citômetro são: tamanho da partícula e complexidade interna (granulosidade).

O protocolo consiste em incubar 1×10^6 células (no caso deste trabalho, utilizamos células provenientes de medula óssea e tecido adiposo de coelho) com o anticorpo murino primário sem marcação (2 clones do protocolo MSC). Os anticorpos

IgG foram incubados a temperatura de 20°C por 30 minutos. Então nova incubação foi necessária para revelar o complexo antígeno-anticorpo, os clones foram marcados com anticorpo fluorescente secundário Goat Anti-Mouse IgG FITC, Invitrogen® e incubados por 40 minutos no escuro.

As leituras em FL1 e análises via histograma foram feitas pelo software Cell Quest™ da BD. Para validação dos AcMm produzidos no protocolo MSC, foram testados contra células de 5 animais diferentes, providas de duas fontes: medula óssea e tecido adiposo (células utilizada como antígeno para a produção dos AcMm deste protocolo), afim de comprovar a eficácia da obtenção de células tronco mesenquimais a partir da dissociação mecânica de tecido adiposo.

3.1.5 - Caracterização pelo método de Western Blotting

Esta metodologia caracteriza-se por ser imunoquímica. A corrida de BJAB foi realizada em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE de tamanho 9cm x 8cm e 0,75mm de espessura, com gel de separação 12% e empilhamento de 5%, foi realizada a transferência para membrana de nitrocelulose de 0,45μ em sistema semi-seco (Biorad Trans-Blot™ SD Semi-Dry Transfer Cell™) nas condições padrões descrito por Vicentini-Oliveira, 2009 ⁸¹. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução tamponada acrescida de leite em pó desnatado. As tiras foram incubadas com os sobrenadantes de culturas dos clones A69 e A30 dirigidos contra antígenos expresso em células-tronco de coelhos adultas provenientes da medula óssea.

Para a produção do extrato de membrana celular (apresentado como antígeno) foram utilizadas células-tronco de coelho, provenientes da medula óssea, cultivadas até a 2ª passagem com inibidores de protease comercial PhosSTOP™, utilizando protocolo de Tolosa, 2007 ⁸², com 8 ciclos de sonicação mecânica, com um tempo de descanso entre os ciclos de 1 minuto.

3.2 – Produção de Anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos expressos em CTM humana (ETAPA 2)

3.2.1– Obtenção de tecido adiposo humano e protocolo de produção do AcMm.

A obtenção de tecido adiposo humano foi realizada através de processo cirúrgico, em que pacientes foram submetidos à cirurgia plástica reparadora pós intervenção bariátrica. Estes pacientes foram convidados a doar parte do material que seria descartado na cirurgia. Apenas os pacientes que estiveram de acordo e assinaram o Termo de Consentimento de Descarte Consentido foram incluídos na pesquisa. As amostras utilizadas no trabalho foram as mesmas utilizadas em trabalho já em andamento, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da aluna de Iniciação Científica Aline Garcia Aun. Título do trabalho: Padronização da expansão ex-vivo de fibroblasto dermóide para aplicação terapêutica (Protocolo CEP: 3307-2009). A produção do AcMm seguiu sequencia de acordo com o Fluxograma 2 e denominou-se CTMh como identificação deste protocolo.

Fluxograma 2. Protocolo CTMh.



3.2.2 – Cultura das células do tecido adiposo humano

Após coleta, os tecidos adiposos foram transportados ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. O processo de dissociação mecânica foi realizado com *cell scraper* para desprendimento das células do tecido. Essas células foram transferidas para seringas, as quais foram colocadas na posição vertical por 10 minutos com o bisel voltado para baixo, com o intuito de separação de debris. Em seguida, o conteúdo da seringa foi transportado para tubo Falcon® e centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm. O *pellet* foi ressuspensão em meio de cultura e uma alíquota foi separada para contagem das células. A viabilidade foi realizada com azul de trypan. A caracterização das células foi realizada por Citometria de Fluxo, (Flow Cytometry BD-Facscalibur, com laser de argônio a 480nm, de 15 mW) com os marcadores CD34 e CD90.

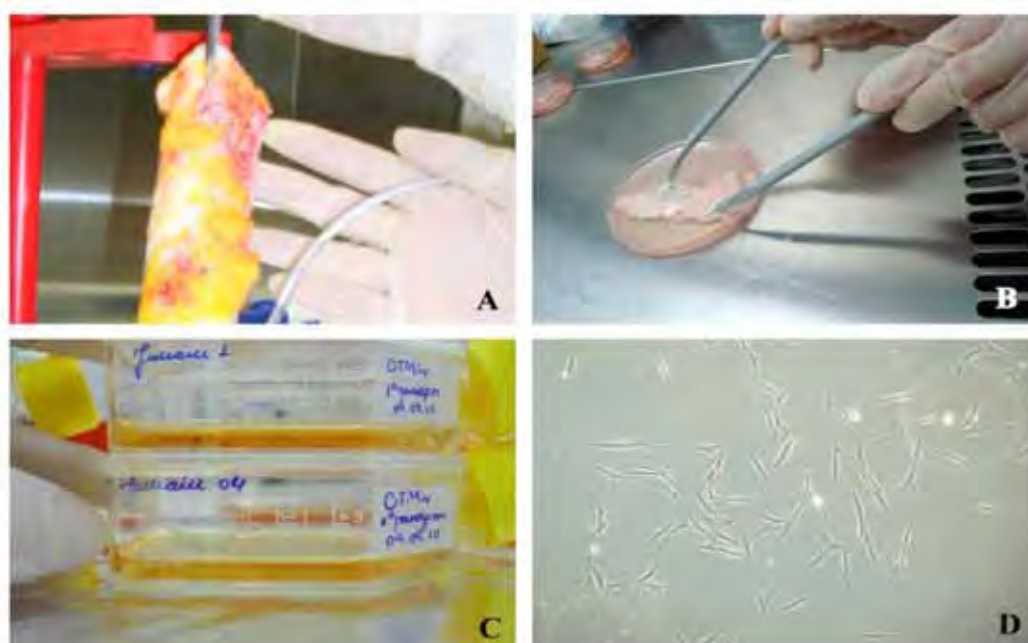


Figura 12 – Isolamento e expansão das CTMs provenientes de TA Humano. *A Manipulação do fragmento, B Dissociação mecânica, C Plaqueamento em frascos de cultura aderente, D Células em expansão (7º dia de cultura).*

As células obtidas foram plaqueadas em frascos de 75cm² (Corning) na concentração de 10⁴ cels/cm². O meio de cultura utilizado foi o DMEM F-12 com 20% de soro fetal bovino, suplementado com aminoácidos essenciais e não-essenciais, L-glutamina e

antibiótico/antimicótico. O meio foi trocado a cada dois dias e a inspeção ao microscópio foi realizada diariamente. Após a cultura alcançar 80% de confluência, as células foram ressuspensas com uso de tripsina a 0,25% em EDTA. Neste momento (1ª passagem) uma alíquota das células foi caracterizada novamente com os marcadores CD34 e CD90.

As células foram novamente plaqueadas, na mesma concentração celular, e novamente ao alcançarem 80% de confluência, foram tripsinizadas (2ª passagem). Em todos os momentos de tripsinização as células foram avaliadas quanto à viabilidade pelo método de exclusão de células não-viáveis pelo azul de trypan em câmara de Neubauer.

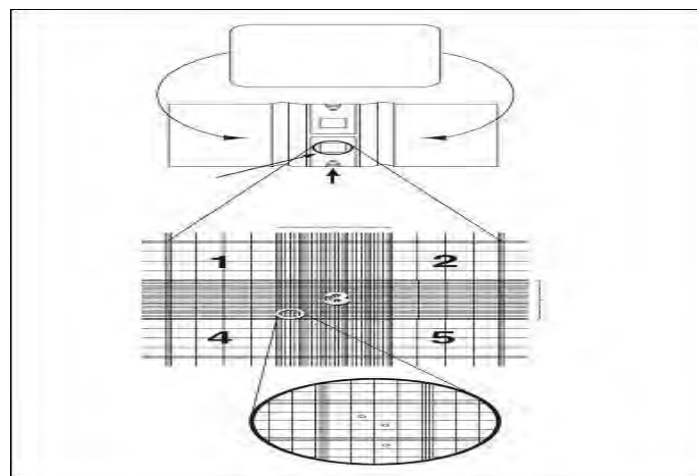


Figura 13. Câmara hemocitométrica de Neubauer. A lamínula é colocada sob a superfície da câmara e a suspensão celular depositada na câmara de contagem. Os quatro quadrantes dos extremos (1, 2, 4 e 5) e o quadrante central (3) são utilizados para a contagem das células (Fonte:Phelan, 2006).

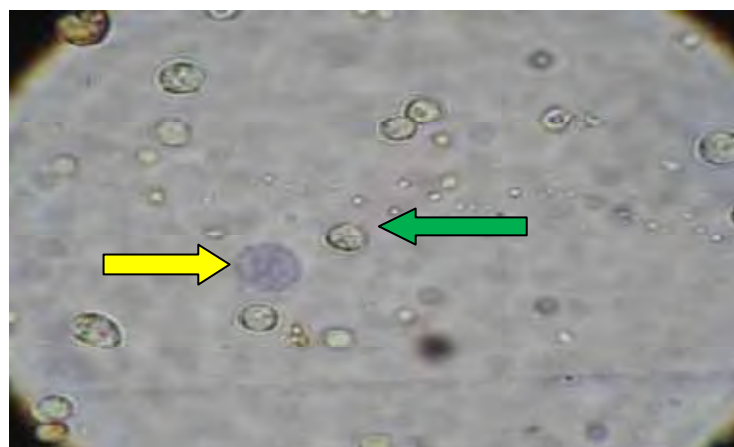


Figura 14. Imagem da câmara hemocitométrica em microscopia de luz. As células viáveis estão representadas pelas setas verdes, já as células inviáveis apresentam o citoplasma corado com azul de Trypan (seta amarela) (aumento 100x). (Fonte:Oliveira, 2009).

3.2.3 – Teste adicional de Viabilidade Celular: Comprovação da ausência de danos no DNA pelo Teste Cometa.

Esta etapa foi realizada em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular, responsável Prof^a. Dra. Daisy Maria Favero Salvador, a fim de assegurar que as células expandidas não sofreram mutações ou danos no DNA. Para o monitoramento de eventuais mutações, foram enviadas amostras em 2 diferentes momentos: Pré – plaqueamento e após primeira passagem em cultura;

Após preparação do material celular (descongelamento ou tripsina), homogeneizamos 20 µl de células em 100µl de agarose (baixo ponto de fusão), pingamos lentamente o material diluído sobre as lâminas previamente preparadas com agarose ponto de fusão normal, colocamos uma lamínula para proteção e então as lâminas foram incubadas em geladeira por 5 minutos. Após o período de incubação, foi retirada cuidadosamente a lamínula de todas as lâminas e todas foram mergulhadas em solução de lise (Triton-X, DMSO, M-NaCl, EDTA, Tris e N-Lauroyl – Sarcosine) dentro de um berço coberto com papel alumínio para proteger da luz permanecendo incubado a 4°C *over night*.

Após o período de incubação as lâminas foram retiradas da solução de lise lavadas com PBS e em seguida colocadas na cuba de eletroforese, que foi realizada em 300 mili amper/20 minutos.

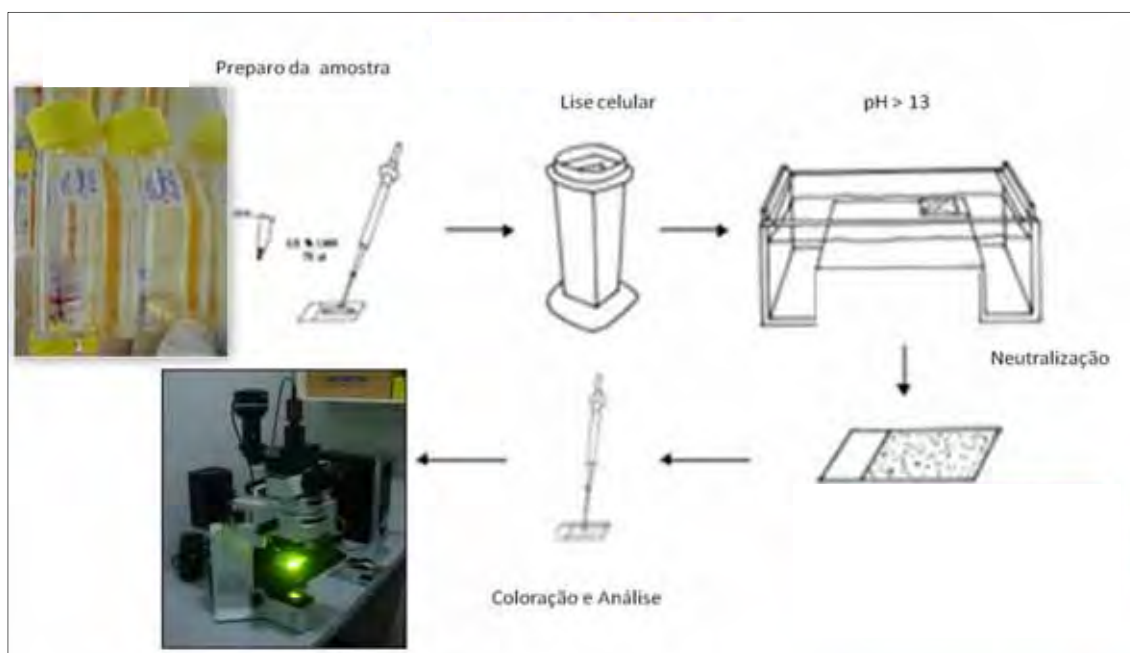


Figura15 – Protocolo do Teste Cometa. Etapas desde a preparação do material celular até a análise dos resultados.

As lâminas foram analisadas com microscópio de fluorescência, que permite a visualização das seguintes imagens microscópicas: com contorno circular (sem danos no DNA) ou estruturas em forma de “cometa” (com danos no DNA). A extensão de cada imagem significa a distância de migração da fita de DNA danificada. As células foram classificadas em cinco categorias (0 – 4) correspondentes as seguintes quantidades de danos na cauda do DNA: 0 – sem danos (< 5%), 1 – baixo nível de danos (5 – 20%), 2 – médio nível de danos (20 – 40%), 3 – alto nível de danos (40 – 95%) e 4 – dano total (> 95%). Os resultados foram obtidos através do cálculo de porcentagem de dano “tail intensity”.

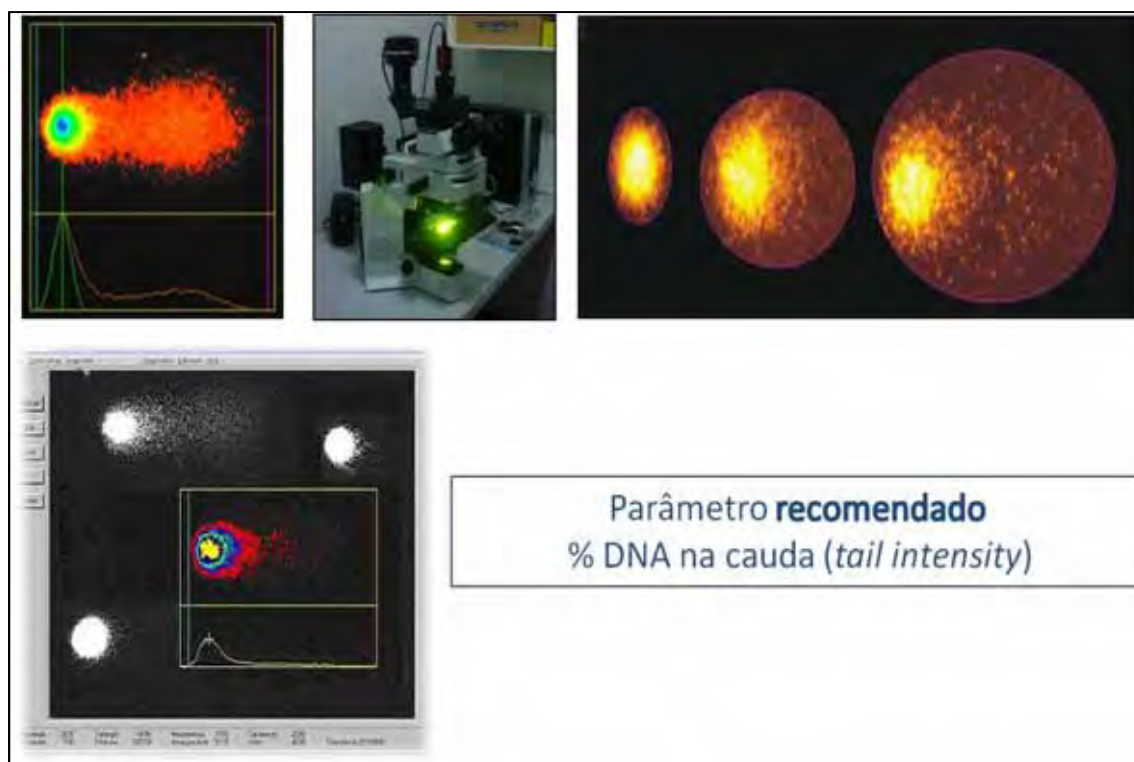


Figura 16 – Análise do Ensaio Cometa. *Parâmetro recomendado de análise: Porcentagem de dano de DNA na cauda (Tail intensity).*

3.2.4 – Protocolo de produção dos AcMm anti-CTM humana

A obtenção dos anticorpos seguiu rigorosa agenda incluindo imunização, fusão celular e screening dos híbridos obtidos, de acordo com protocolo ilustrado na Figura 1. Para as etapa de imunização foram utilizados 5 camundongos da linhagem isogênica BALB/c provenientes do Biotério de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, mantidos em gaiolas individuais, com sala climatizada mantida por meio

de ar-condicionado e exaustão, com temperatura programada para 22°C. Os antígenos foram apresentados como proteínas de membrana de CTMs previamente isoladas de tecido adiposo humano expandidas *ex vivo*.

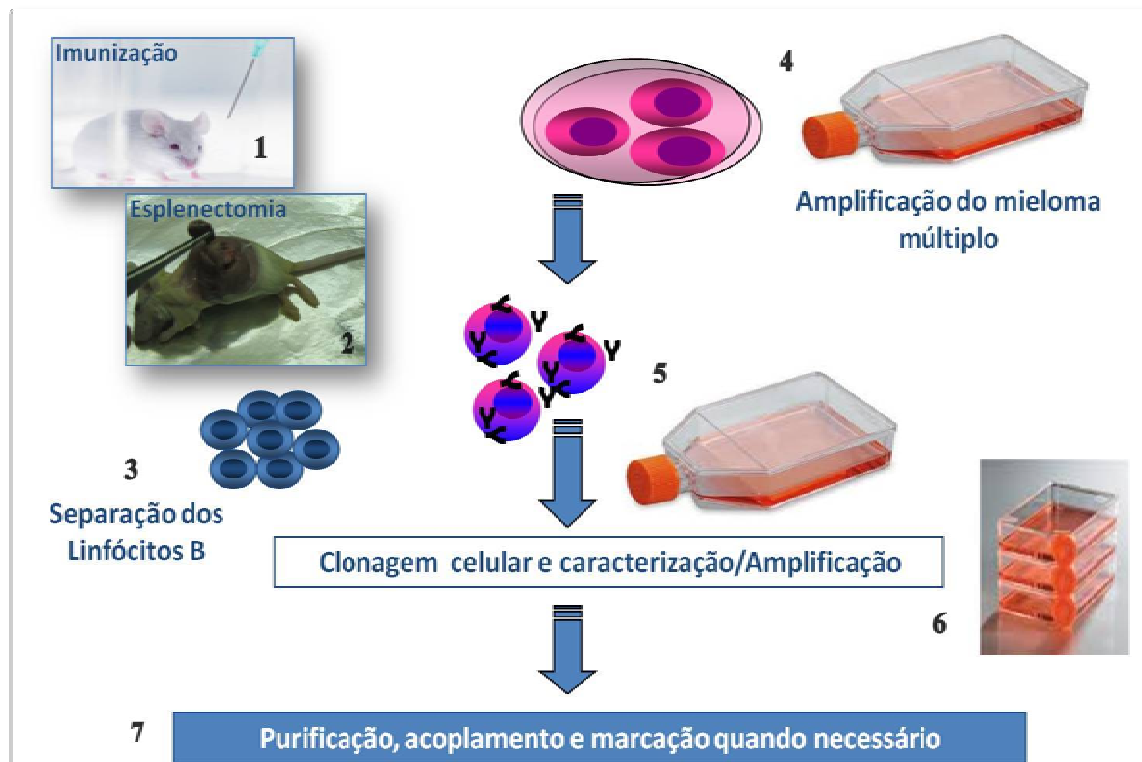


Figura 17 – Protocolo de Produção do AcMm anti-CTMh. 1 e 2 Imunização e esplenectomia para a remoção do baço, 3 Separação dos Linfócitos B, 4 Amplificação das Células de Mieloma Múltiplo Murino, 5 Fusão celular, 6 Clonagem e caracterização do AcMm produzido e 7 Purificação, acoplamento e marcação com imunofluorescência.

A imunização foi feita com cinco doses de 1×10^7 células/ml incluindo o booster. O protocolo de fusão celular consistiu na fusão de linfócitos B extraídos dos animais imunizados às células de mieloma múltiplo murino linhagem NS, utilizando polietilenoglicol e meio de cultura seletivo HAT.

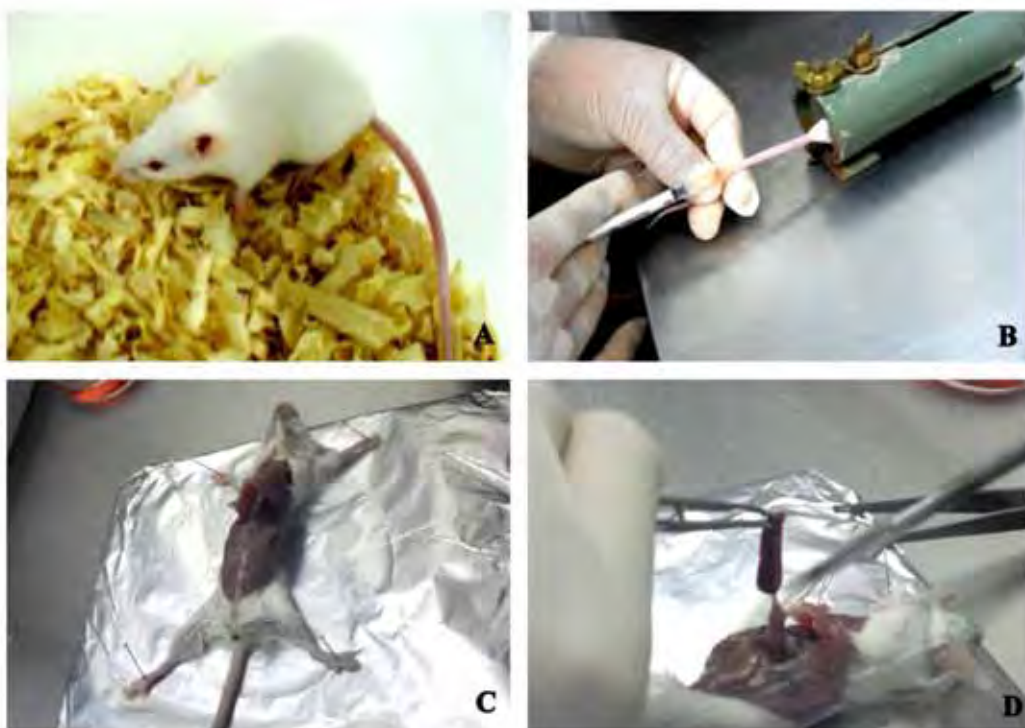


Figura 18. Etapas in vivo da produção do AcMm. *A Camundongo BALB/c. B 5ª imunização – Booster intra-venoso. C Dissecção do animal. D Extração do*



Figura 19. Etapas in vitro da produção do AcMm. *A e B Baço coletado em meio Hepes C e D Dissociação para extração dos linfócitos B.*

Para a fusão foram utilizadas as células de mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidas por Kohler e Milstein (1975), provenientes do *Laboratoire de Genie D'Institute National de Transfusion Sanguine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido (Deffune et al, 1996⁸³).

As células NS/1 foram descongeladas 8 dias antes da fusão segundo Deffune (1992)⁸⁴ e mantidas em crescimento com meio de cultura, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado até que ela apresentasse viabilidade celular igual ou superior a 90%.

As fusões celulares foram realizadas segundo a técnica descrita por Kohler e Milstein (1975) modificado por Deffune (1992). Foram realizadas duas imunizações com intervalos de 21 dias (protocolo longo), o booster (reforço final da imunização por via venosa), foi realizado 21 dias após a 2ª imunização, e três dias antes da fusão.

Para a fusão, os camundongos foram anestesiados com anestésico tipental sódico para a esplenectomia e em seguida, eutanasiados com o mesmo fármaco na dose de 60-80mg/kg de peso animal. Cada baço retirado foi manipulado separadamente em capela laminar para a perfuração da cápsula esplênica e remoção dos linfócitos. O protocolo de fusão foi realizado por co-centrifugação dos linfócitos recém-coletados de cada animal imunizado juntamente com células NS/1 na proporção de 1/10 e o agente fusionante polietilenoglicol PM 4000 (PEG) (1mg de PEG para cada 100 x 10⁶ células – NS1 + linfócitos). Em seguida, as células foram distribuídas em microplacas de cultura celular de 96 cavidades, contendo meio enriquecido (ME) em aminoácidos essenciais e não essenciais, e soro fetal bovino (SFB) a 20%.

A seleção enzimática dos híbridos foi realizada dentro do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT) pela utilização de meio seletivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) a partir do dia seguinte à fusão. Este meio possibilita a seleção através da proliferação dos hibridomas (Linfócito B+NS/1) e a eliminação das células não fusionadas. Após um período de 3 dias pós-fusão, foram adicionadas as células de companhia (*feeders cells*), células oriundas do timo de camundongos de até 20 dias de vida, na quantidade de 1x10⁶ células por cavidade da placa. De acordo com Vicentini-Oliveira (2009)⁸¹ a finalidade é suplementar o meio de cultura com fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento dos híbridos recém construídos, além disso os timócitos facilitam a visualização do crescimento dos hibridomas por possuírem um tamanho menor.

Para a seleção dos híbridos secretores, foi utilizada a técnica de Citometria de Fluxo. Foram utilizadas as CTMs isoladas, previamente expandidas e congeladas. O *screening* foi realizado com o sobrenadante de cultura (SNC) coletado dos poços mediante observação microscópica do crescimento celular, iniciada 72h pós-fusão e continuada diariamente por 14 dias. Quando os híbridos recobriram 80% da área de cultura, o sobrenadante foi coletado em tubo para citômetro (BD Biosciences™). O protocolo de preparo dos SNC para análise em Citometria de Fluxo consiste em incubar 1×10^6 células (CTMs provenientes de tecido adiposo humano) com o anticorpo murino primário sem marcação (SNC) a temperatura de 20°C por 40 minutos. Após esse período de incubação as amostras foram lavadas com Isoton e marcadas com anticorpo secundário fluorescente Goat Anti-mouse IgG+IgA+IgM (H+L) FITC conjugate - Caltag® e novamente incubadas por 40 minutos no escuro, afim de preservar a fluorescência do anticorpo secundário. As leituras em FL1 e análises via histograma foram feitas pelo software Cell Quest™ da BD.

Os híbridos positivos no *screening* foram mantidos em cultura. Após crescimento exponencial em placas de 96 poços, foram repicados em placas de 24 poços e posteriormente em frascos de 25cm².

A clonagem dos hibridomas reagentes foi realizada por dois diferentes métodos. Primeiramente realizou-se o método de diluição limitante em microplaca com *feeder cells* de timocitos obtidos de camundongos BALB/c de 15 a 20 dias de idade.

A partir dos mesmos híbridos, foi realizada a clonagem por micro manipulação, que consiste na captura celular sob observação direta ao microscópio por meio de micropipetas e microagulhas. A finalidade das clonagens é garantir que houvesse uma única célula (hibridoma) em cada poço da placa de cultura. Através da observação por microscopia invertida, cada poço foi identificado sob a condição de clone único ou múltiplo, sendo que somente os clones oriundos de poços denominados nicos foram considerados potenciais monoclonais.

Para a seleção dos melhores clones a serem mantidos em cultura, foi utilizado o mesmo método de *screening* através de análise em Citometria de Fluxo como o realizado para a seleção dos híbridos, contudo, alguns indicadores de seleção de clones foram considerados após o resultado do desempenho dos mesmos:

- Quantidade de células e aspecto das mesmas em cultura;
- Não ter aderência ao plástico;
- Escolher $\neq$ faixas de positividade na Citometria de Fluxo:

*Mais fortes ($\geq 40\%$)

*Médios (entre 30% - 40%)

*Baixos (20% - 30%)

Os clones selecionados foram expandidos em volumes crescentes de meio de cultura até que alcançassem densidade adequada para congelamento e para inoculação em camundongos visando uma futura produção de ascite. As células foram congeladas em solução de SFB contendo 10% de DMSO a 4°C, seguido de congelamento em nitrogênio líquido.



Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão dos resultados e da discussões, estes serão apresentados conforme a metodologia, em duas etapas: **Etapa 1:** Caracterização de 2 clones de AcMm dirigidos contra antígenos de CTMs de coelhos, produzidos por Moroz e Almeida, 2009; **Etapa2:** Produção de AcMm dirigidos contra antígenos de CTMs de origem humana.

4.1 - Caracterização dos clones MSC – 160 A69 e MSC – 160 A30 dirigidos contra antígenos expressos em CTM de coelho (ETAPA 1).

Como descrito no material e métodos, os clones de AcMm produzidos *in house* A69 e A30, foram testados com um painel de CTMs – TA, de 5 animais em diferentes momentos da cultura celular: Pré-plaqueamento, 2ª passagem, 3ª passagem, 4ª passagem, 6ª passagem e 8ª passagem.

Nas figuras 20, 21 e 22, observa-se o desempenho dos anticorpos produzidos *in house*, e dos 3 marcadores comerciais frente a este painel de células constituídos, sendo a expressão de CD90, CD45 e CD34 praticamente inexistentes e superponíveis, resultados estes não esperados, enquanto que os 2 clones A69 e A30 tiveram resultados superiores.

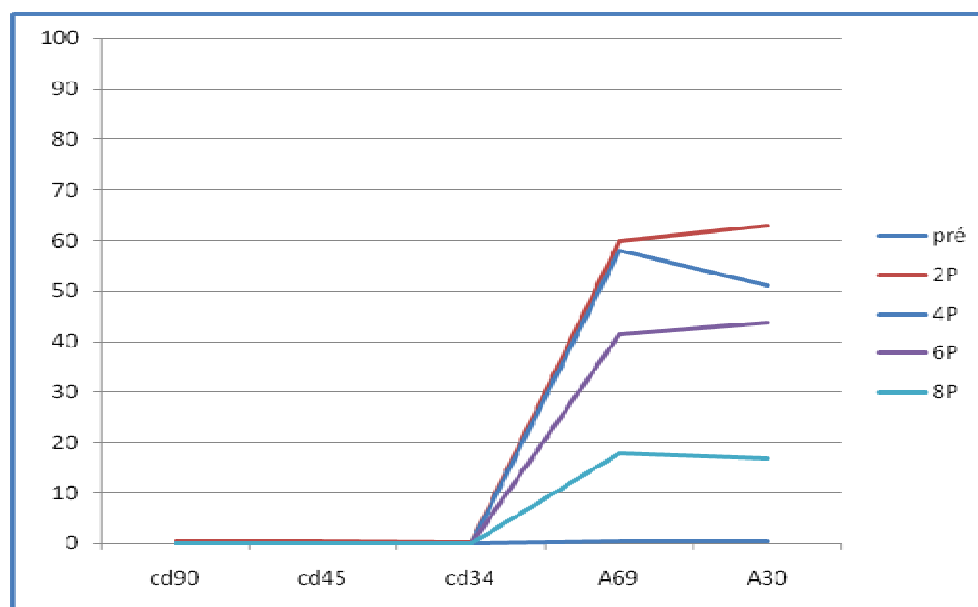


Figura 20. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 1.

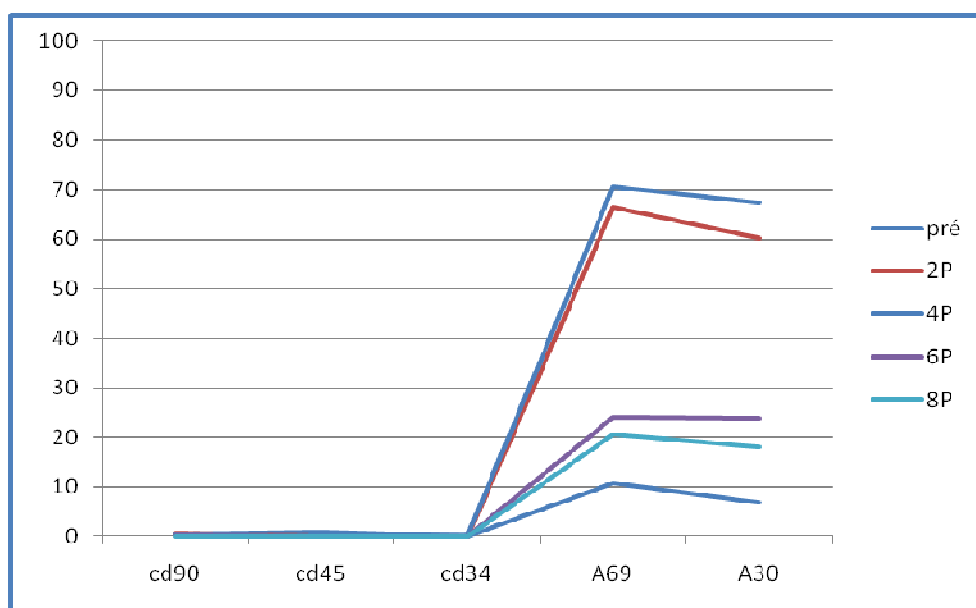


Figura 21. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 2.

Nestes primeiros resultados, identificam-se padrões de reconhecimento de fraca expressão mediante anticorpos comerciais, podendo ser justificado pela denominada curva de aprendizagem, onde a medida de destreza de cultura celular foi aumentando, melhorando também o domínio da técnica diminuindo o espaço de tempo em cada etapa, principalmente no congelamento das células.

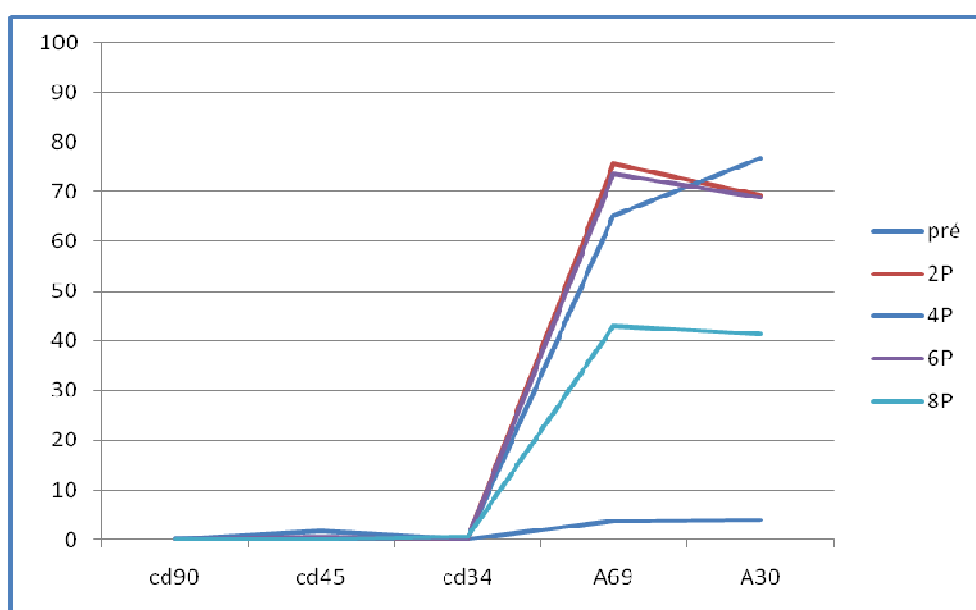


Figura 22. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 3.

Na figura 23, observa-se reconhecimento dos anticorpos comerciais um pouco melhor, onde o resultado do CD90 mostra aumento da expressão na 2ª passagem, enquanto o CD45 e CD34 decrescem progressivamente até nenhum reconhecimento, fato este esperado levando em consideração que a cultura é um método de purificação das CTMs.

Os dois clones A69 e A30, reconhecem de forma expressiva as células da 2ª e 3ª passagem, decrescendo na 6ª e 8ª passagem. Podendo indicar, que se trata realmente de AcMm de especificidade anti-CD90.

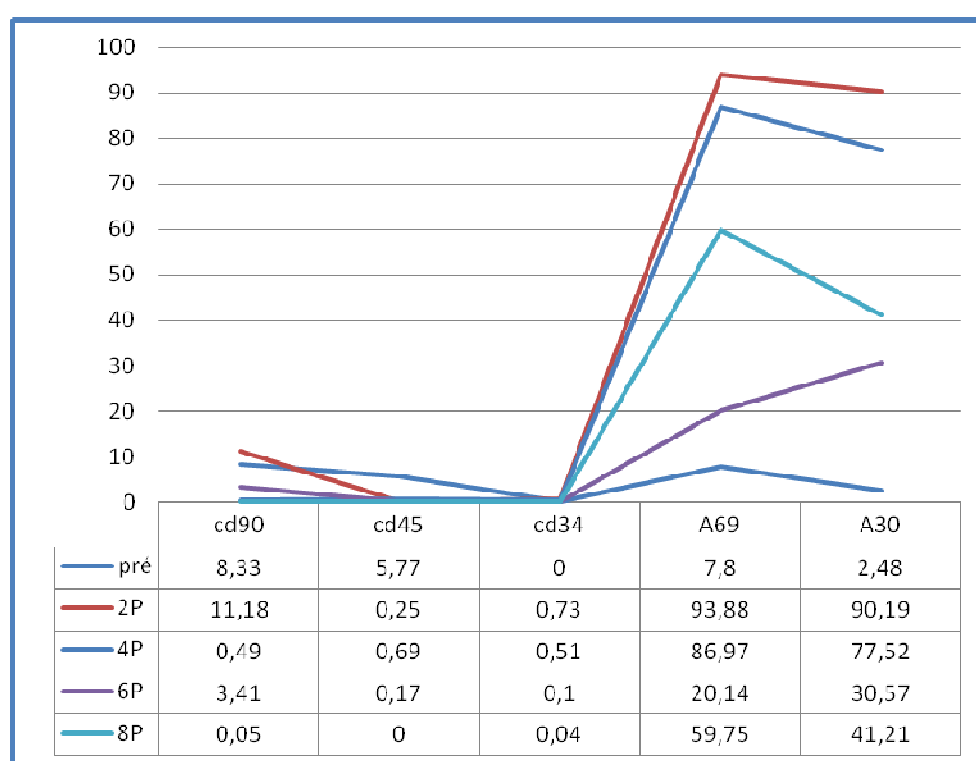


Figura 23. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 4.

A figura 24, apresenta o comportamento fenotípico do animal 5, onde os clones A69 e A30 tiveram curvas superponíveis na CF, incluindo os marcadores CD34, 45 e 90. A amostra do animal 4 teve um desempenho com marcadores comerciais ligeiramente superior:

- 2ª passagem 11,18% - CD90
- Perdendo a expressão na 8ª passagem;
- A69 93,68% na 2ª passagem e 59,75% na 8ª passagem

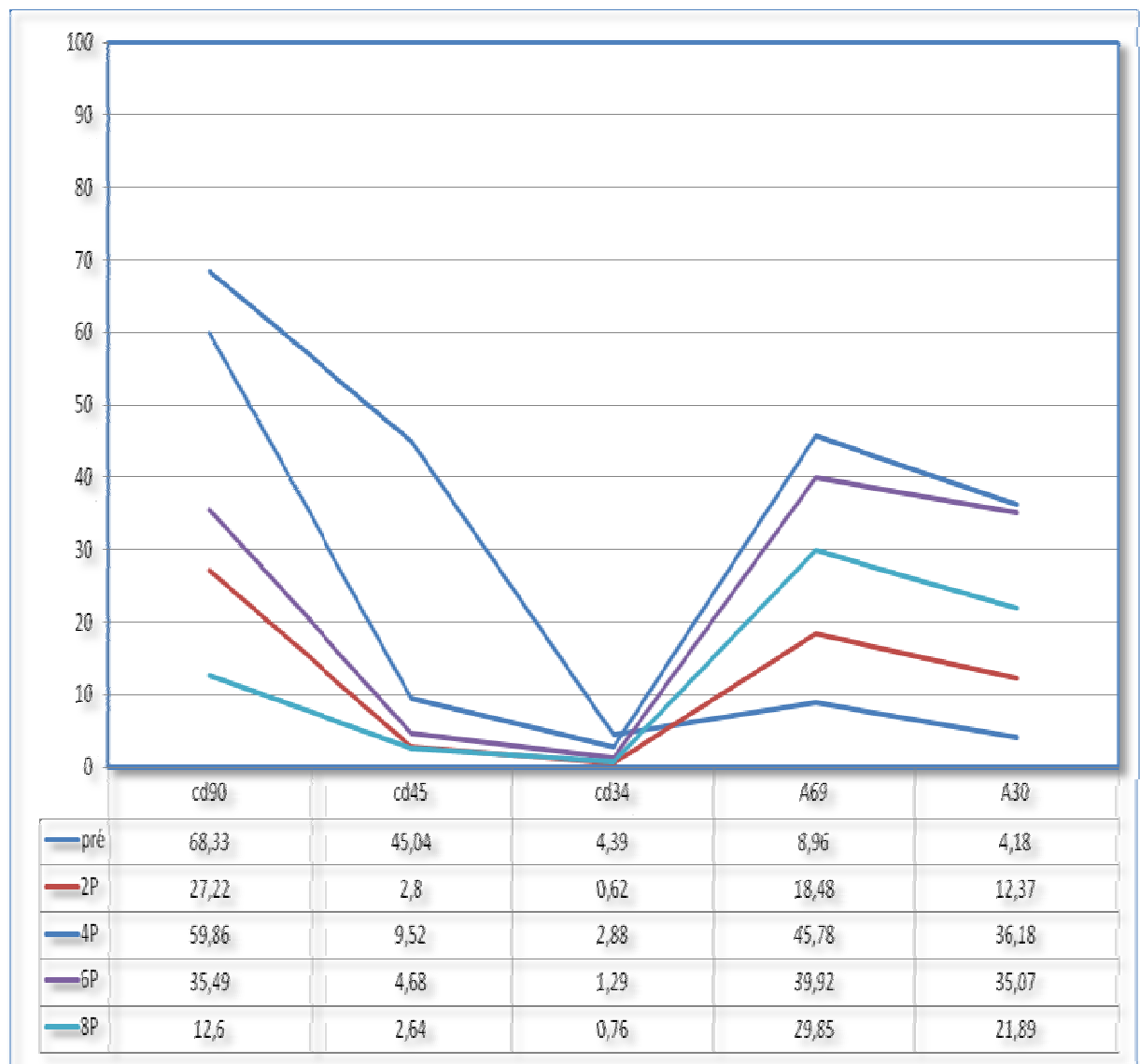


Figura 24. Gráfico: Resultado da Análise em Citometria de Fluxo do desempenho dos marcadores de superfície celular das CTMs do Animal 5.

A amostra do animal 5 teve desempenho ainda melhor com CD90 comercial (pré-plaqueamento 68,33%, 4ª passagem 59,86% e na 8ª passagem 12,6%) e não perdeu a expressão com com anticorpos produzidos *in house*.

- Hipótese 1 - o CD90 comercial não é específico para a espécie e portanto tem pouca positividade → confirmar a hipótese por *W. blotting* de extrato membranário de CTM de coelho;
- Hipótese 2 – Os anticorpos *in house* reconhecem outro epítipo do CD90, ou mesmo outro antígeno de superfície com proximidade ao CD90

- CD90 está situado na GPI que ancora outras proteínas, tais como CD55, CD59 e CD31.

Para descartar ou confirmar a hipótese de reconhecimento dos antígenos CD55 e CD59 (DAF e MIRL) – antígenos expressos em todas as hemácias humanas, exceto de indivíduos portadores de Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN), foi realizado teste em CF para avaliar o reconhecimento dos clones A69 e A30 frente a 3 amostras de indivíduos saudáveis (doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu) analisando o comportamento em gate de hemácias e para descartar ou confirmar a hipótese de CD31, antígeno expresso em granulócitos, monócitos e plaquetas (antígeno da família de proteínas adesivas PECAM – 1) foram analisados no mesmo teste os gates de leucócitos, linfócitos, monócitos e neutrófilos, os resultados estão ilustrados na figura 25.

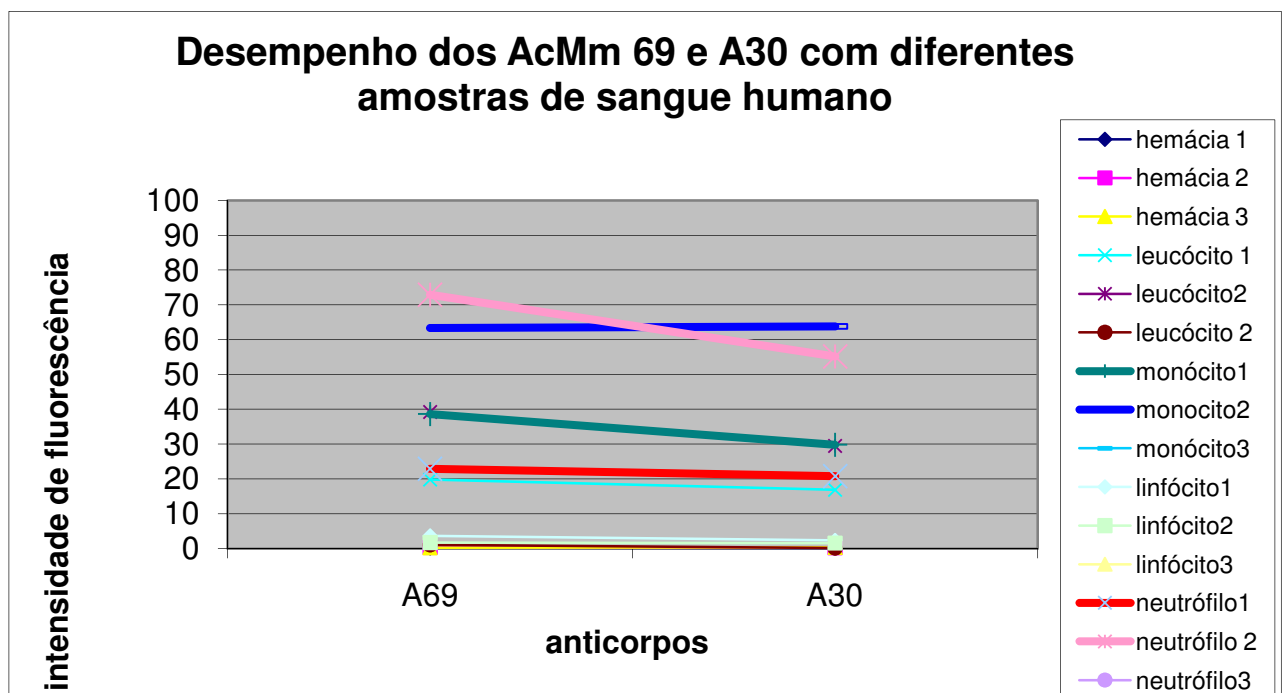


Figura 25. Gráfico de desempenho dos AcMm A69 e A30 com diferentes amostras de sangue humano.

Os resultados em todos os gates demonstram positividade, ou seja, o AcMm reconhece determinado tipo de antígeno que provavelmente é ligado a GPI, diante desse resultado optou-se por complementar o estudo com análise do peso molecular do antígeno em questão através do método de *Western Blotting* (em andamento).

A fim de complementar o estudo fenotípico das CTM provenientes do TA de coelhos realizamos fenotipagem de 4 animais incluindo o marcador CD44, o resultado é ilustrado através do gráfico na figura 26.

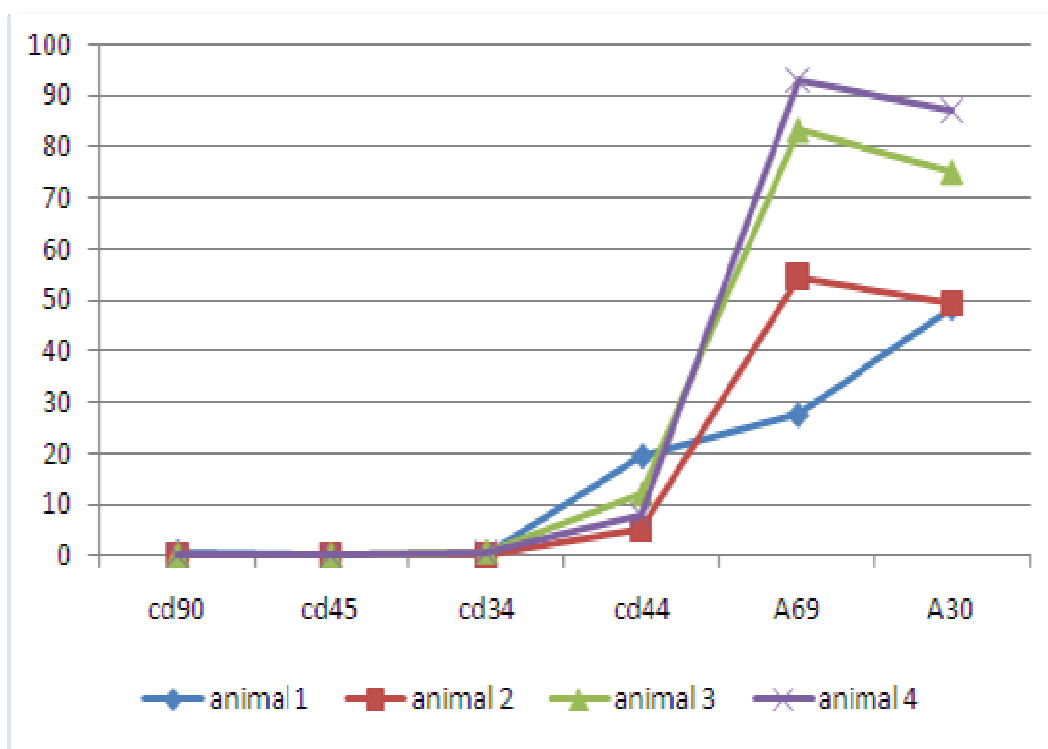


Figura 26. Gráfico de desempenho fenotípico das CTMs – TA de 4 animais frente ao CD44.

Optou-se em realizar a análise com CD44 tendo em vista os dados obtidos por Kolf 2007⁸⁵ como demonstrado na Tabela 1, que relata a instabilidade do CD90 na membrana celular, destacando a positividade e integridade do CD44 independente das condições de cultura.

As amostra dos 4 animais, foram cultivadas e analisadas na 2ª passagem, observamos que os marcadores CD90, CD45 e CD34 não apresentaram expressão significativa, confirmando assim o mesmo perfil dos animais anteriormente analisados, o que nos leva a concluir que esses antígenos por apresentarem grande sensibilidade e instabilidade de seus receptores, foram se perdendo durante a cultura e também pelo processo de congelamento e descongelamento das amostras. O CD44 apresentou uma baixa expressão (pico máximo de 19,44% de intensidade de fluorescência na amostra 1), o que não condiz com o perfil de reconhecimento apresentados pelos clones A69 e A30 que mantiveram alta taxa de reconhecimento em todas as amostras (Pico máximo na

amostra 4: A69 = 93,02% e A30= 86,93% de intensidade de fluorescência). No entanto, esta baixa expressão do CD 44 pode estar relacionada à baixa expressão de epítomos na célula, ou até mesmo pela inespecificidade do anticorpo comercial (anti-humano).

Tabela 1. Relação de antígenos identificados durante isolamento de CTMs

Surface antigens commonly identified during isolation of mesenchymal stem cells (MSCs)							
Marker type	Surface antigen ^a	Number of populations reported with specified antigen levels ^b					
		Human MSCs ^c			Murine MSCs ^c		
		+	+/-	-	+	+/-	-
Positive	Stro-1	7	1	2	0	0	0
	CD13	5	0	0	1	0	1
	CD29	5	0	0	11	0	0
	CD44	11	0	1	10	1	0
	CD73	5	0	0	0	0	0
	CD105	7	0	0	1	0	0
	CD106	4	0	2	4	1	0
Negative	CD11b	0	0	3	0	1	5
	CD31	0	3	10	0	0	6
	CD34	1	1	10	5	6	3
	CD45	0	0	11	0	0	6
	CD117	0	2	3	1	1	13
Variable	Sca-1	0	0	0	6	5	4
	CD10	6	0	5	0	1	0
	CD90	11	1	1	2	4	10
	Flk-1	2	1	1	0	0	5

Existem diferenças entre as células cultivadas a partir de TA e MO como mostra a tabela 3, que são de grande importancia para o trabalho com cultura celular, principalmente quanto a escolha do antígeno para a produção de um AcMm.

Tabela 2. Características de cultura das CTMs.

	Medula Óssea	Tecido adiposo
Tempo de Aderência	Tardio	Precoce
Forma	Poliédrica	Fibroblastóide
Tamanho	Grandes	Alongadas (estreitas)
Citoplasma	Abundante (grande)	Pequeno
Tempo de Confluência – 80%	Mais lento	3,5% mais rápido
Auto-fluorescência	↑	↓
Fluidez (capacidade de análise no CF)	↑ ↑ ↑	↓ ↓ ↓

Ao cultivar as CTM provenientes de Medula Óssea, observamos uma morfologia celular diferente das células cultivadas em trabalhos anteriores como mostra a figura 27.

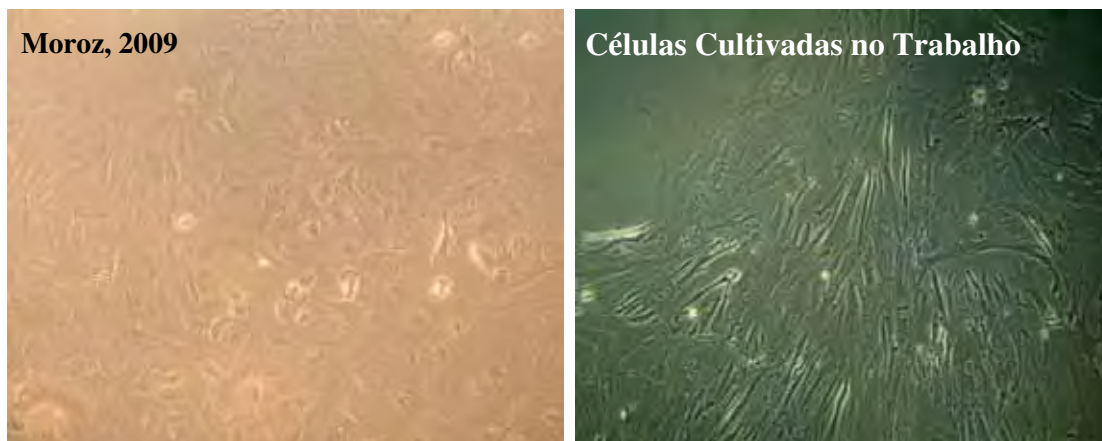


Figura 27. Morfologia das células de MO cultivadas no protocolo MSC.

Uma consideração é que ao tentarmos realizar as análises das amostras de MO em CF, encontramos uma grande dificuldade devido às características morfológicas das células (células grandes, figura 28). Estas quando descongeladas conforme protocolo estabelecido no laboratório, preparadas e ressuspensas em Isoton® para testar no citômetro de fluxo, encontrou-se a dificuldade da formação de agregados indissociáveis incompatíveis com a fluidez necessária no capilar de aspiração do citômetro.

Em posterior análise, visando testar o comportamento dos clones frente à interação com células-tronco de outras espécies, obtivemos células provenientes de cordão umbilical, previamente dissociado e mantido em cultura até a 2ª passagem, percebemos o mesmo comportamento das amostras de MO, lembrando que a manutenção das culturas de células-tronco de cordão umbilical apresentavam aspecto gelatinoso como um excesso de proteínas eliminadas durante a expansão das mesmas, essa análise também não foi realizada por não conseguir ser aspirada pelo capilar do citômetro.

- A primeira hipótese é de que essas células sejam células-tronco estromais.

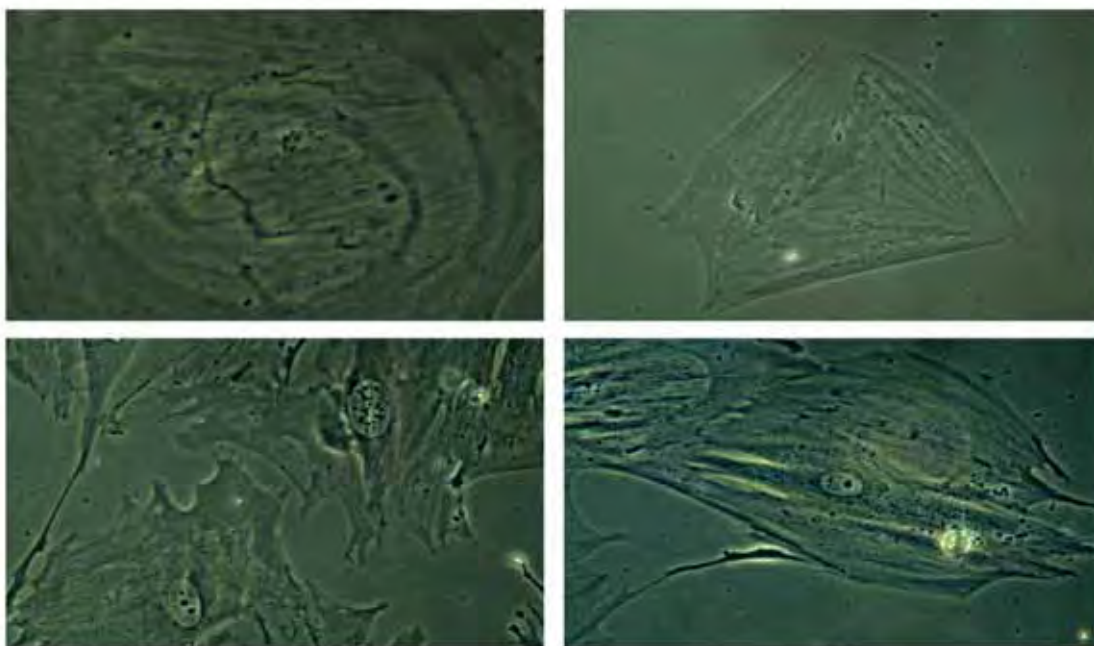


Figura 28. Morfologia das células de MO cultivadas para a etapa de caracterização dos clones do protocolo MSC.

As células do estroma são células não sanguíneas derivadas a partir de órgãos do sistema sanguíneo, tais como a medula óssea ou o fígado fetal, que são capazes de auxiliar o crescimento de células do sangue *in vitro*. As células de estroma que constituem a matriz dentro da medula óssea derivam de células estaminais mesenquimais, na medula óssea cerca de 4,5 a 5% da população celular é de CTMs estromais.

Estudos mostram que existe uma população CTMs estromais, pois não apresentam a mesma capacidade de diferenciação das CTMs porém são responsáveis pela produção da matriz da medula óssea. Essa população possui uma característica importante quanto ao fenótipo, segundo Bianco, 2001⁸⁶ e Zannettino, 2007⁸⁷ são negativas quanto a expressão de CD34, CD45 e Glicoforina-A (marcador de células eritróides). De acordo com esses dados, optamos em analisar as células provenientes da MO previamente preparadas e marcadas para análise em Citometria de fluxo (que não foi realizada devido as condições das amostras) através do microscópio de Imunofluorescência.

Ao observarmos a expressão de CD90, CD45 e CD34 nas CTMs de MO ao microscópio de imunofluorescência, não observamos intensidade de luz, considerando assim essas análises como negativas. Os clones A69 e A30 apresentaram grande

intensidade de fluorescência, sendo ainda maior na 8ª passagem nos 5 animais, confirmando assim o mesmo perfil fenotípico observado nas amostras de TA (Figuras 29, 30 e 31).

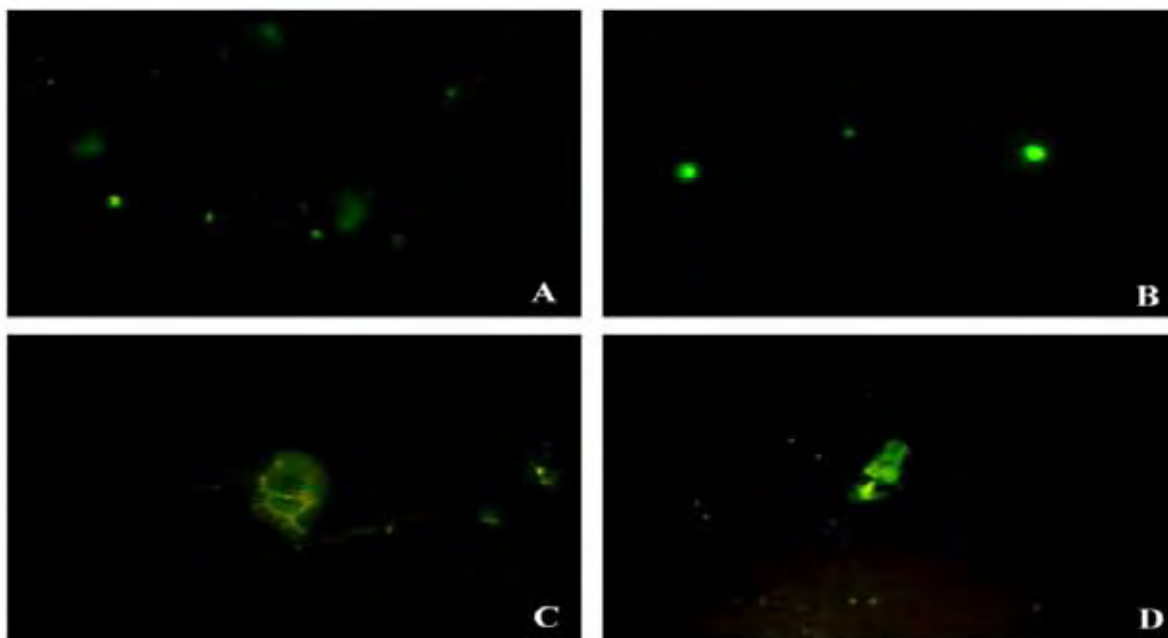


Figura 29. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (Pré-plaqueamento e 2ª passagem): **A** Pré-plaqueamento + A69, **B** Pré-plaqueamento + A30, **C** 2ªpassagem +A69, **D** 2ªpassagem + A30.

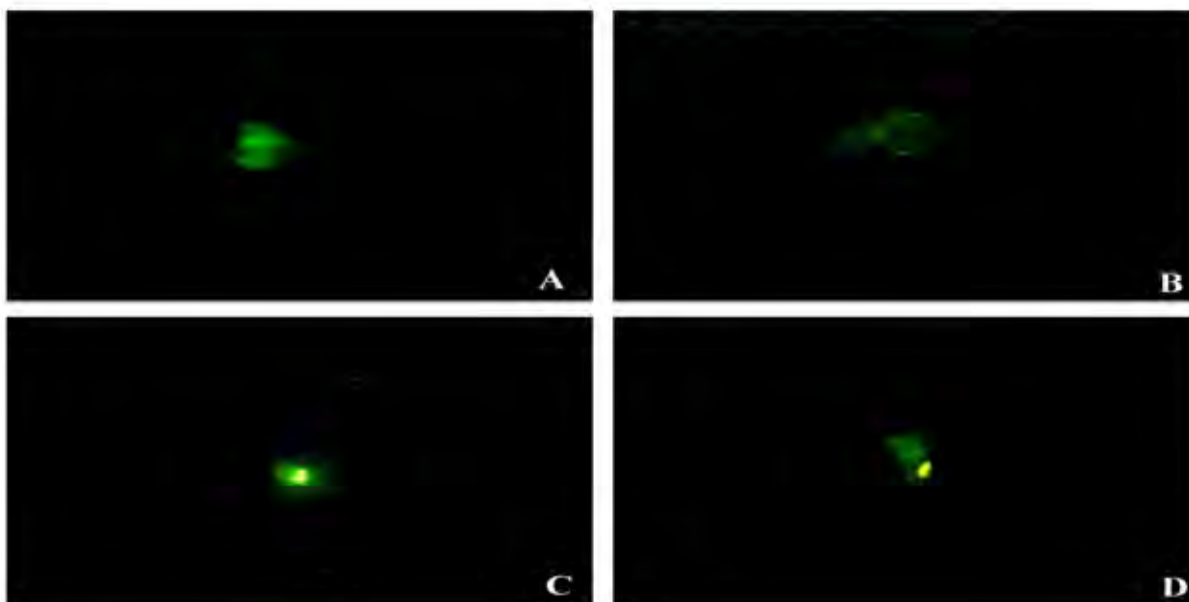


Figura 30. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (4ª e 6ª passagem). **A** 4ª passagem + A69, **B** 4ª passagem + A30, **C** 6ªpassagem +A69, **D** 6ªpassagem + A30.

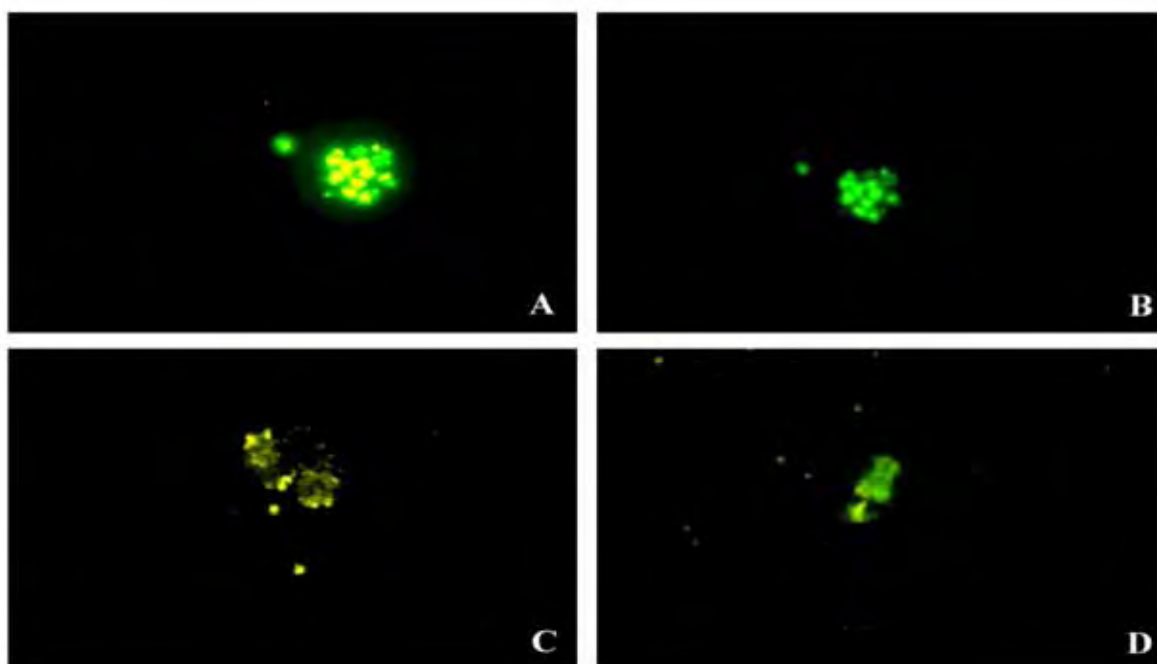


Figura 31. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (8ª passagem) **A e B** 8ª passagem+ A69, **C e D** 8ªpassagem + A30.

A fim de confirmar a característica das células de MO obtidas em cultura como sendo CTM estromais e sabendo que as mesmas são Glicoforina-A negativas, realizamos a análise em microscópio de imunofluorescência quanto ao comportamento destas células frente a AcMm produzidos no Laboratório de Engenharia Celular em 2009 dentro do protocolo DIVS, caracterizados por Inácio *et al.*, 2010⁸⁸ como anticorpos de especificidade Anti-N quando utilizados em testes de hemaglutinação, e anticorpos de especificidade Anti-Glicoforina quando utilizados em Citometria de fluxo e outros testes que utilizam imunofluorescência. Realizamos a análise com os dois melhores clones do protocolo DIVS (DIVS 1 e DIVS 3) e as 5 amostras de MO apresentaram resultados negativos ilustrados na figura 32.

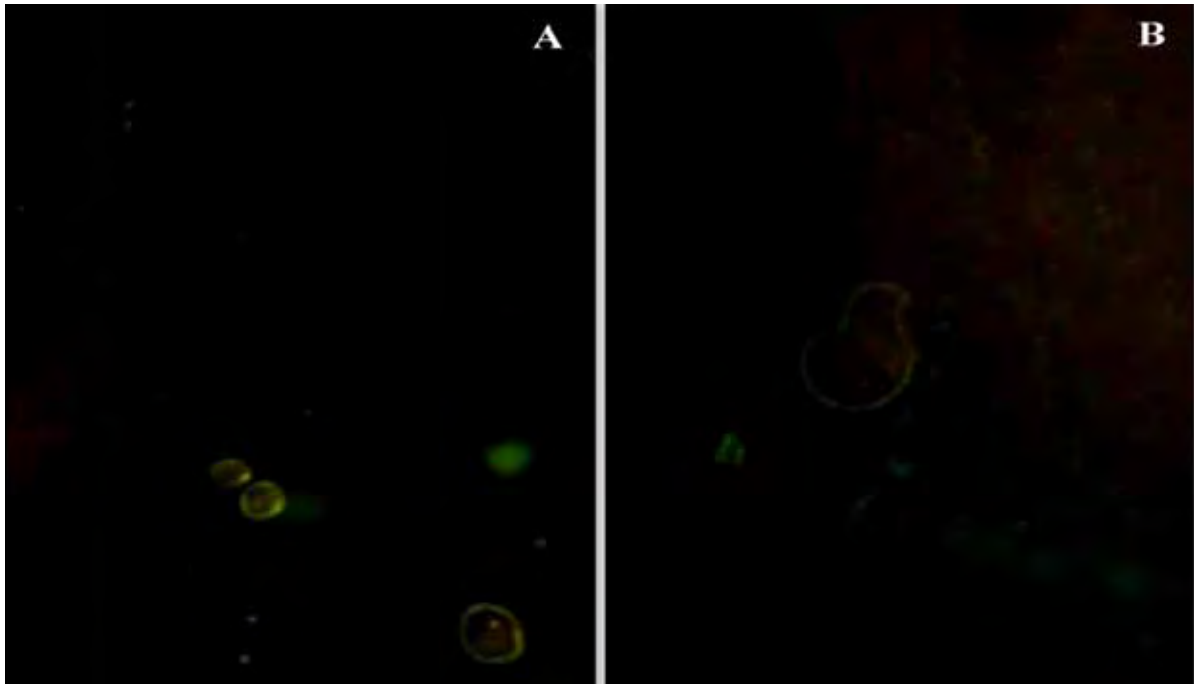


Figura 32. Amostras marcadas com FITC observadas ao microscópio de Imunofluorescência (DIVS). **A** Células da 8ª passagem + DIVS 1 (resultado negativo) , **B** Células da 8ª passagem + DIVS 3 (resultado negativo).

A fim de encontrar o caminho mais próximo da especificidade dos AcMm anti-CTMs de coelhos, optou-se em realizar uma análise em Citometria de Fluxo com amostra de sangue periférico de doadores de medula óssea após receberem estímulo de GM-CFS para realizar a doação, após este estímulo o doador apresenta em sua circulação sanguínea Células-tronco indiferenciadas, para que pudéssemos evidenciar a não relação destas células circulantes com os anticorpos em estudo. Após análise dos resultados obtidos pudemos observar que não houve expressão significativa.

4.2 - Protocolo CTMh: Produção de AcMm dirigidos contra antígenos expressos em CTM humano (ETAPA 2).

4.2.1 – Comprovação da ausência de danos no DNA pelo Teste Cometa.

O ensaio cometa comprova que as células utilizadas na imunização animal como antígenos para a produção do anticorpo monoclonal não apresentaram danos de material genético (Figura 31) mesmo após sofrerem expansão em cultura e ação enzimática da tripsina. Este teste foi realizado com o objetivo de prevenir a imunização animal com células danificadas o que poderia levar a formação de neo-anticorpos, os quais não poderiam ser utilizados para fim diagnóstico e terapêutico. Como parâmetros de análise para esse ensaio, utilizamos como controle positivo (Ctrl +) uma droga que induz dano de DNA (MMS), apresentando uma intensidade de dano de aproximadamente 70%, como controle negativo (Ctrl -) utilizamos CTMs em condições pré-plaqueamento, ou seja, logo após a remoção das mesmas do TA, o material foi analisado, apresentando assim uma porcentagem de 11,5% de dano de DNA, o que é considerado negativo para este teste.

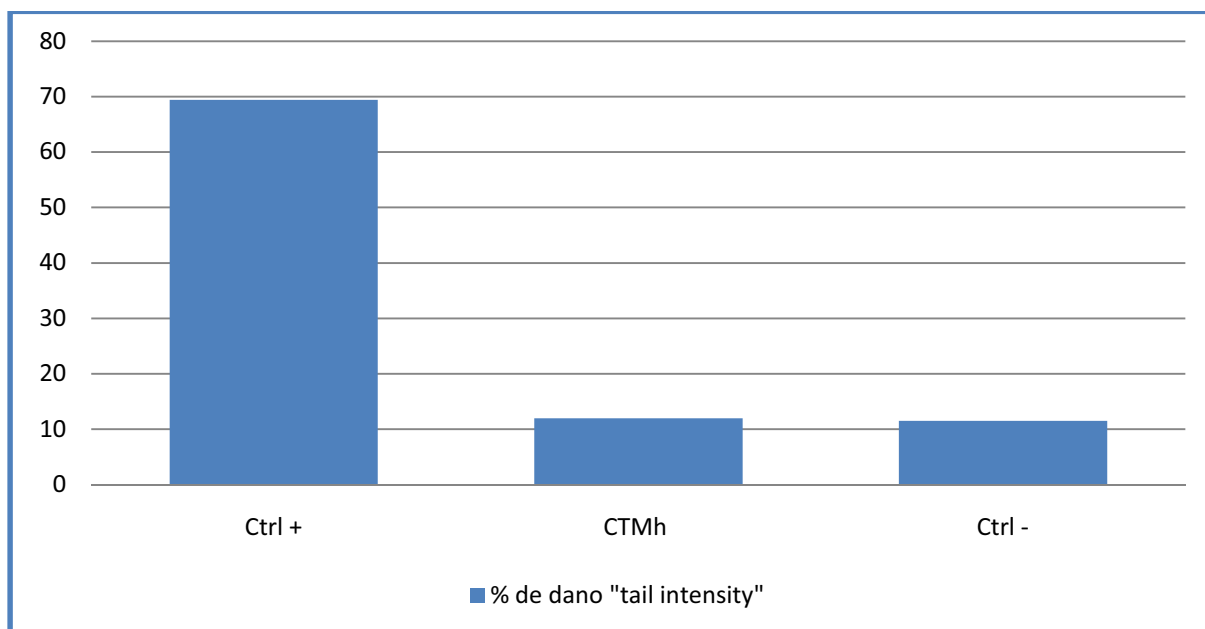


Figura 33. Gráfico de análise da viabilidade das CTMh utilizadas na produção do AcMm pelo Ensaio Cometa.

4.2.2 - Produção de AcMm dirigidos contra antígenos expressos em CTM humano

Foram imunizados 5 animais para a produção do anticorpo monoclonal, porém durante a última imunização que foi realizada por via venosa puncionando a cauda (*booster*) o animal de número 5 morreu por insuficiência pulmonar, um quadro relativamente comum durante imunizações por se tratar de um procedimento delicado, este animal foi eliminado do experimento. Os baços de 4 animais foram extraídos 15 dias após o *booster* e após a retirada dos linfócitos e da fusão o protocolo CTMh foi dividido em: CTMh1, CTMh 2, CTMh3 e CTMh4 e a eficiência da fusão destes protocolos esta ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Eficiência da fusão no protocolo CTMh

FUSÃO	No placas de 96 poços	Nº de híbridos distribuídos	Nº de híbridos obtidos	Eficiência de fusão
CTMh 1	3	206	0	0%
CTMh 2	3	256	0	0%
CTMh 3	12	1150	354	31%
CTMh 4	8	766	337	44%

CTMh 1 e CTMh 2 não apresentaram eficiência na fusão, portanto foram excluídos do protocolo de *screening*. CTMh 3 e CTMh 4 apresentaram um número de 354 e 337 híbridos obtidos respectivamente, estes foram testados em Citometria de Fluxo e analisado o perfil de reconhecimento de cada híbrido frente a antígenos expressos por células-tronco mesenquimais humanas, foram selecionados aqueles que apresentaram grande intensidade de fluorescência e porcentagem de células reconhecidas, dos híbridos selecionados foram clonados por duas técnicas: Diluição limitante e Micromanipulação que foram observadas e analisadas quanto a eficiência dentro da dissertação de mestrado do aluno Daniel Basseto Jenuino (2011).

Foram obtidos um total de 70 clones, dos quais neste trabalho foram testados 21 clones, observando o perfil de reconhecimento individual frente a antígenos expressos em células-tronco mesenquimais humanas, provenientes de tecido adiposo. Os clones foram selecionados mediante análise e consideração de critérios de seleção de clonagem e 8 clones foram retidos.



Conclusões

5. CONCLUSÕES

- ✓ Os anticorpos produzidos no protocolo MSC, apresentam provável especificidade anti-CD90 ou anti-CD44, resultados estes a serem confirmados com testes adicionais.
- ✓ O antígeno celular específico reconhecido pelos clones A69 e A30 estão expressos na GPI, devido sua estrutura morfológica.
- ✓ As CTMs de MO utilizadas para a caracterização dos clones do protocolo MSC foram caracterizadas como CT estromais.
- ✓ As células apresentadas como antígenos para a produção do AcMm anti-CTM humana não apresentaram danos de DNA *in vitro*.
- ✓ Foram retidos 691 híbridos e produzidos 70 clones anti-CTM humano que serão caracterizados em estudos posteriores.



Perspectivas

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Caracterizações dos AcMm anti-CTM de coelho, produzidos no protocolo MSC, pela técnica de *Western Blotting* e validação posterior com anticorpo comercial correspondente.
- ✓ Análise complementar da co-expressão de CD44 e CD90 em CTM de coelho por Citometria de Fluxo.
- ✓ Caracterizações dos clones anti-CTM humana produzidos no protocolo CTMh, frente a painel de anticorpos comerciais.
- ✓ Funcionalização de nanopartículas com os AcMm caracterizados conforme previsto no projeto de NanoBiotecnologia – Edital 04/2009 em andamento.



Referências

7. REFERÊNCIAS

- 1 – Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-5, 2002.
- 2 – Curi, C.M.P. Como cultivar células. 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- 3 - Claude, A. The coming of age of the cell. *Science*.189:433-435, 1975.
- 4 - De Duve, C. Exploring cells with a centrifuge. *Science*.189:186-194, 1975.
- 5 - Rasmussen, S.K. *et al.* Manufacture of recombinant polyclonal antibodies. *Biotechnology Letters*. **29**, 845-852, 2007.
- 6 – Guilherme, G.R.B. Caracterização e validação de anticorpo monoclonal murino anti-linfócitos B humanos para uso em citometria de fluxo e imunoquímica [dissertação de mestrado]. Botucatu. Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – Júlio Mesquita Filho, 2010.
- 7 – Strome, S.E., Sausville, E.A., Mann, D.A. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target – redefining effects. *The Oncologist*. **12**, p:1084-95, 2007.
- 8 – Waldmann T A. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*. **9**; 269 – 277, 2007.

9 – Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 495 – 7, 1975.

10 – Hudson P J, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med*. 9: 129 – 34, 2003.

11 – Strome S E, Sansville E A, Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal in 81redef therapy beyond target – related effects. *The Oncologist*.12: 1084 – 95, 2007.

12 – K.hler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of 81redefined specificity. *Nature*. 256(7), 495-497, 1975.

13 – Golim, M.A., Deffune, E., Rossi-Ferreira, R., Oliveira, A.P.E., Padovani, C.R., Machado, P.E.A.M. Conjugação e validação de controle isotipico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. **29**, 361-368, 2007.

14 – Kravchenko I V, Feiralyov V A, Khotchenkov V P, Popov V O. Monoclonal antibodies to mechano – growth factor. *Hybridoma*. 25: 875 – 7, 2006.

15 – Renukaradhya J G, Shiram V, Polakova K, Russ G, Brutkiewicz R R. Development of a quantitative cell-based intracellular ELISA for the screening of B cell hybridoma supernatants: A novel rapid assay to detect positive clones. *Hybrid Hybridomas*. 23: 373 – 9, 2004.

16 - Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*.4:140-13, 1997.

17 - Carrel, A. On the permanence of tissues outside the organism. *Journal of Experimental Medicine*. 15:516-28, 1912.

18 - Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubieck, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 12: 364-5, 1952.

19 - Hayflick, L., Moorhead, P. S. The serial cultivations of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 25:585-621, 1961.

20 - Freshney, R. I. Culture of animal cells: A manual of basic technique. 3ed. New York, Willy-Liss.1994.

21 - Acton, R. T., Barstad, P. A., Zwerner, R. K. Propagation and scalling-up of suspension cultures. *Methods Enz.* 50:211-21, 1979.

22 - Cotellet, S. & Féraud, J.F. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255, 1999.

23 - Fairbairn, D.W., P.L. Olive & K.L. O'Neill. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37-59, 1995.

24 - Mckelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo & A. Collins. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. *Mutation Research* 288: 47-63, 1993.

25 - Da Silva, J., Erdtmann, B. & Henriques, J.A.P. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, 1:424, 2003.

26 - Da Silva, J.; Freitas, T.R.O.; Marinho, J.R.; Speit, G.; Erdtmann, B. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental in vivo biomonitoring with native rodents. *Genetics and Mol. Biol.* 23: 241-245, 2000.

27 – Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. *Imunologia de Kuby*. São Paulo: Artmed; 53-54:610, 2008.

28. Ucelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature* **8**, 726-736; 2008.

29 - Wilson, E. B. *The Cell in development and inheritance*. New York, Mec Millan, 1896.

30 - Lajtha, L. G. Halmopoietic Stem cells: Conceptand definitions. *Blood Cells*, 5(3): 447-55, 1979.

31 - Loeffler, M., Potten, C.S. *Stem cell*. Academic Press, 1997.

32 - Quesenberry, P. J., Colvin, G. A., Lambert, J. F. The chiaroscuro stem cells: A unified stem cell theory. *Blood*. 100(13): 4266-71, 2002.

33 - Paulus, U., Potten, C. S., Loeffler, M. A model of the control of cellular regeneration in the intestinal crypt after perturbation based solely on local stem cell regulation. *Cell Prolif*. 25(6): 559-78, 1992

34 – Voltarelli, J.C. *Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas*. São Paulo: Editora Atheneu; 2009.

35 – Abdelhay, E.S.F.W., Braga, F.H.P., Binato, R., Bouzas, L.F.S. Células tronco de origem hematopoiética: Expansão e perspectivas de uso terapêutico. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 31(1), 2-8, 2009.

36 – Cabrita, G.J., Ferreira, B.S., da Silva, C.L., Gonçalves, R., Almeida-Porada, G., Cabral, J.M. Hematopoietic stem cells: from the 84red to the bioreactor. *Trends Biotechnol.* 21(5), 233-40, 2003.

37 – Vigorito, A.C., Souza, C.A. Hematopoietic stem cell transplant and recovery of hematopoiesis. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 31:4, 280-284, 2009.

38 – He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 25(1):69-77, 2007.

39 – Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E.K., Machlinski, B., Kucia, M. Bone-marrow-derived stem cells-our key to longevity? *J Appl Genet.* 48(4), 307-319, 2007.

40 – Covas, D.T. Células-tronco mesenquimais. In: Zago, M.A.; Covas, D.T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, 35-48, 2006.

41 – Suga, H. *et al.* Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/ progenitor cells. *Stem Cells and Development.* 18, 1201-1209, 2009.

42 – Sodré, L.P. Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 obtido *in house* para utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica. [dissertação]. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista – Julio Mesquita Filho. Botucatu, 2009.

43 - Friednstein, A. J.; Piatetzky-Shapiro, I.I.; Petrajova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, Cambridge, v.16, n.3, p.381-390, 1966.

44 - Kirschstein, R. Stem cells: scientific progress and future research. Bethesda: The Nacional Institute of Health. Department of Health and Human Services. 2001.

45 – Schwindt, T.T.; Barnabé, G.F.; Mello, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.13-19, 2005.

46 – Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Mol Méd.* 8(3), 301-316, 2004.

47 - PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.

48 - Caplan, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*. 217:318-324, 2009.

49 – Meirelles, L.S. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*.119:2204-2213, 2006.

50 - Minguell, J.J.; Conget, P.; Erices, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*,. São Paulo. 33; 8:881-887, 2000.

51 – Mitchell, J.B. *et al.* Immunophenotype of human adipose – derived cells: Temporal changes in stromal – associated and stem cell – associated markers. *Stem Cells*. 24, 376-385, 2006.

52 – Fraser, J.K., Wulur, I., Afonso, Z., Hedrick, M.H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 24, 150-154, 2006.

53 – Mendelow, B.D. et al. Characterization of bone marrow stromal cells in suspension and monolayer cultures. *British Journal of Haematology*. 46, p.15-22, 1980.

54 - Nardi, N.B; Meirelles, L.S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 174:249-282, 2006.

55 - Huss, R. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem. *Stem Cells*. 18:1;1-9, 2000.

56 - Bobis, S. et al. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiological*. 44:215-230, 2006.

57 - Wan, C.D et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 7:29-33, 2008.

58 - Herzog, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 102:3483-3493, 2003.

59 - Sadler TW. Langman Embriologia Médica. 9ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.131-137, 2005.

60 - Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, Shiohara M, Kamijo T, Taniguchi S, et al. Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *J Clin Invest*. 8:1195-204, 2008.

61 – Alhadlaq, A.; Mao, J.J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem CellsDevelopment*. 13:436-448, 2004.

62 - Lojudice, F.H. Identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco progenitoras mesenquimais. 173f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Bioquímica) - Universidade de São Paulo. SP, 2008.

63 – Covas, D.T.; Panepucci, R.; A. Fontes, A.M.; Silva Jr., W.A.; Orellana, M.D.; Freitas *et al.*, M.C. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts, *Exp Hematol* . **36**: 5, 642–654, 2008.

64 – Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 25:2739-2749, 2007).

65 – Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284, 143-147, 1999.

66 - Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 106(6):984-91, 2009.

67 - Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 9(1):204, 2007.

68 - Gibbons RJ. Histone modifying and chromatin remodeling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum Mol Genet*.14 Spec No 1:R85-92, 2005.

69 - Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* 9(10):606-12, 2009.

70 - Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(1):11-20, 2001.

71 – Horwitz E, Le BK, Dominici M et al . Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 7:393-5, 2005.

72 – Meirelles, L.S., Caplan, A.I., Nardi, N.B. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 26, 2287-2299, 2008.

73 – Araújo, M.A., Deffune, E., Carlos, L.M.B., Magalhães, S.M.M., Golim, M.A., Câmara, L.M.C. Avaliação das subclasses IgG1 e IgG3 na doença hemolítica perinatal. *Ver Bras Hematol Hemoter.* 25(4): 201-206, 2003.

74 - Bruin HG, Leur-Ebeling I, Aaij C. Quantitative determination of number of FITC-molecules bound per cell in immunofluorescence flow cytometry. *Vox Sang.* 45:373-7, 1983.

75 - Waller A, Pipkorn D, Sutton KL, Linderman JJ, Omann GM. Validation of flow cytometric competitive binding protocols and characterization of fluorescently labeled ligands. *Cytometry.* 45:102-14, 2001.

76 - Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotech.* 2:37-53, 1999.

77 - Bacal, N.S., Faulhaber, M.H.W. Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo: Atheneu; 2003.

78 - Bolt, M. W., Mahoney, P. A. High-Efficiency Blotting of Proteins of Diverse Sizes Following Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 247:2.185 – 192, 1997.

79 - Harlow, Ed, and David Lane. Using Antibodies. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

80 - BD Hames and D. Rickwood. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach 3rd Edition, The Practical Approach Series. Oxford University Press, 1998.

81 – Vicentini-Oliveira, J.C. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos de metacestóides de *Taenia saginata*. 103 f. Mestrado – UNESP, Botucatu, 2009.

82 – Tolosa, J.M., *et al.* Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the sample. *Bio Techniques*. 43: 799-804, 2007.

83 – Deffune, E. *et al.* Manual GMP – BPL dos laboratórios de Imunohematologia – Botucatu, HC, FMB, UNESP, 2^a versão, 134, 1996.

84 – Deffune, E. Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Intérêt en immunohématologie. Paris. Tese Doutorado – Area Imunologia. Universidade Pierre et Marie Curie – VI, 1992.

85 – Kolf, C.M.; Cho, E.; Tuan, R.S. Biology of adult mesenchymal stem cell: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9:204.1-10, 2007.

86 – Bianco, P.; Riminnuci, M.; Gronthos, S.; Robey, P. G. Bone marrow stromal cell: Nature, Biology and potential applications. *Stem Cells*. 19:180-192, 2001.

87 – Zannettino, A. C. W. *et al* . Human multipotential mesenchymal/stromal stem cells are derived from a discrete subpopulation\ of STRO-1bright/ CD34–/ CD45–/glycophorin-A- bone marrow cells. *Haematologica*. 92: 1707-1708, 2007.

88 – Inácio, J.C.; *et al*. Characterization of mABs anti-N: phenotypic analysis by Flow Cytometry. *Transfusion*. 50(2):273, 2010.



Anexos



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de abril de 2.010

OF. 125/2010-CEP

Ilustríssima Senhora
Profª Drª Elenice Deffune
Divisão Técnica de Hemocentro da
Faculdade de Botucatu

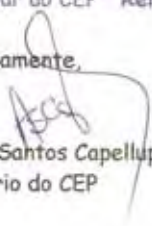
Prezada Drª. Elenice,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3497-2010) "Caracterização de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células troncohematopoiéticas e mesenquimais inter-espécies", a ser conduzido por Juliane de campos Inácio, orientado por Vossa Senhoria, Co-orientado por Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, com a colaboração e Josy Campanha Vicentini de Oliveira, Juliana Ravelli Baldassarre Martins, Marjorie de Assis Golim e Michele Janegitz Acorci Valério, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 05 de abril de 2.010.

OBS: Apresentar ao CEP parecer aprovatório da Comissão de Ética em Experimentação Animal, tão logo o mesmo seja obtido.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Programa de Pós Graduação em PESQUISA E DESENVOLVIMENTO –
BIOTECNOLOGIA MÉDICA.



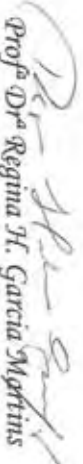
unesp



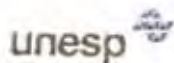
Certificado

Certificamos que o Protocolo n.º 798 sobre o projeto de pesquisa "Caracterização e validação de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos entrocitários e leucocitários humanos para uso em imunocitoquímica", de autoria de Michele Janegitz Acorci Valério, orientada pela Prof.ª. Dr.ª. Elenice Deffune, com a colaboração de Flávia Clene Maciel da Cruz Alves, Marjorie de Assis Gólm, Priscila Murador, Sidney José Lima Ribeiro e Carlos Roberto Gonçalves Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongos", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 28/04/2010.


Prof.ª Dr.ª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretaria: capelluppi@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 14 de Setembro de 2.009

OF. 337/2009-CEP

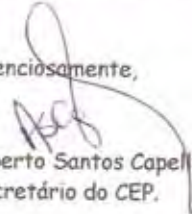
Ilustríssima Senhora
Profª. Drª. Elenice Deffune
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Profª Elenice,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3307-2009) "Padronização da expansão ex-vivo de fibroblasto dermóide para aplicação terapêutica" que será conduzido por Aline Garcia Aun, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 14/09/09.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.