

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - HEMOCENTRO

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
DIRIGIDOS CONTRA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
COELHO**

Renan Padron Almeida

Botucatu
2009

Renan Padron Almeida

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS
DIRIGIDOS CONTRA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
COELHO

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP como requisito parcial para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas
– Modalidade Médica.

Orientadora: Dra. Elenice Deffune
Co-orientador: Andrei Moroz

Botucatu
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Almeida, Renan Padron.

Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra células-tronco mesenquimais de coelho / Renan Padron Almeida. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientadora: Elenice Deffune

Co-orientador: Andrei Moroz

1. Imunologia celular 2. Células-tronco

Palavras-chave: Flow cytometry; Mesenchymal stem cell; Monoclonal antibody

Dedico esta monografia às mulheres da minha vida: Rosandra, minha mãe; Auriema, minha avó; e Ana Paula, minha namorada. Por trás de um grande homem não existe uma grande mulher, existem muitas.

Agradecimentos

À minha mãe, Rosandra, meu maior e melhor exemplo de pessoa, de dedicação e força indescritíveis. Sempre me apoiando nas minhas investidas, vibrando pelas conquistas e me recebendo de braços abertos nas derrotas. A melhor mãe que poderia ter, de longe. Obrigado mãe, eu te amo.

Ao meu pai, Manoel, por ser o homem mais guerreiro que conheço, determinado, teimoso e inteligente. Por me guiar nas mais variadas situações, por não me deixar amolecer nunca. Meu molde, me tornou no que sou hoje e sempre lhe serei grato por isso. Tenho orgulho de ser sua réplica, te amo.

Ao meu irmão Rodrigo, por estar sempre ao meu lado nessa jornada, me dando sustos e alegrias. Por ser tão maduro e responsável, por me dar forças apenas por existir, por ser meu irmão. Pessoa que admiro demais e farei tudo que estiver ao meu alcance para ajudar sempre, não se esqueça disso.

Ao meu irmão Rafael, por ter crescido tão rápido que nem percebi, por ser a alegria da casa quando chego em Santos, por me proporcionar momentos e conversas únicos e por me orgulhar de tê-lo como irmão. Seu futuro será brilhante e pode ter certeza que estarei sempre ao seu lado.

À minha avó, Auriema, por se orgulhar tanto de mim e por me fazer ter orgulho dela, por me apoiar incondicionalmente sempre, até mesmo quando estou errado. Por ser minha avó preferida e me amar tanto. É recíproco, obrigado Ema.

Ao meu tio e padrinho, José Carlos “Kco”, pessoa de coração extremamente grande e bondoso, por ser o melhor tio e padrinho que eu poderia pedir, por me proporcionar momentos

inesquecíveis e ensinamentos que designaram todo meu caráter, por ser uma das pessoas mais importantes para mim.

À minha tia-madrinha Neusa, sempre tão amorosa e acolhedora, minha maior fonte de carinho. Obrigado por todos os bolos, doces, colos e, principalmente, por fazer parte da minha vida.

À minha querida namorada, Ana Paula Schreiner, meu “zizipack”. Por me ensinar tanto em tão pouco tempo, por abrir meus olhos e participar ativamente de toda minha evolução, por ser autêntica em todas as situações, por acreditar em mim e me fazer sentir importante quando cuido de você, por me escolher pra ficar ao seu lado, por me fazer entender o que é o amor.

À Dra. Elenice Deffune, minha orientadora, por depositar toda sua confiança em mim acreditando em minhas simples palavras, por toda a autonomia que me foi concebida no desenvolver do projeto, pelo exemplo de profissional dedicada e de sucesso que é e pelos ensinamentos que recebi, que com certeza não serão esquecidos nunca, meu muito obrigado.

À Dra. Rosana Rossi Ferreira, pela gentileza e solicitude em todos os momentos, sempre me auxiliando e oferecendo o apoio que precisei para quaisquer tarefas dentro do laboratório, e, principalmente, pela grande pessoa que é. Sinto-me privilegiado por a ter encontrado em meu caminho.

Ao Andrei Moroz, meu co-orientador e grande amigo, pelo enorme conhecimento compartilhado, pela paciência em me ensinar tudo o que precisei aprender, por ter me acordado pelas tantas vezes que cheguei “dormindo” no laboratório, pelas broncas construtivas e pelos momentos de descontração. Valeu Patrickão!

À toda a equipe do Laboratório de Engenharia Celular: Andrei, Tata, Daniel, Josy, Alexandro, Matheus, Priscila, Armando, Vitória, Gabrielle, Thaianne, Aline, Flávia, Paula, Regina e Juliana, por me suportarem por mais de um ano no laboratório e terem participado de alguma forma no meu desenvolvimento pessoal e profissional, muito obrigado.

Aos meus fiéis companheiros de Botucatu: Bruno (Pelanka), Marcos (Minu) e Raphael (Panda), pela amizade sincera e fiel, sempre do meu lado nos momentos bons e ruins, por me

aceitarem do jeito que sou, pelas grandes ajudas e momentos de descontração, enfim, por representarem minha família nessa cidade tão distante. Com certeza, os irmãos que escolhi.

À Tata, por me tratar sempre com enorme carinho desde o primeiro dia que pisei no laboratório, por ter realizado grande parte do meu projeto com enorme responsabilidade e competência, pela excelente profissional que é e por alegrar qualquer ambiente que esteja ocupando. Uma pessoa que admiro muito e espero levar sempre comigo.

Ao Ednelson, do Laboratório de Cirurgia e Ortopedia, pelas coletas de medula óssea de coelho realizadas sempre com muita destreza.

Ao Carlinhos, do Biotério de Roedores, pela dedicação e cuidado com os camundongos utilizados neste trabalho.

Ao Daniel, companheiro de laboratório e baladas, fazendo ciência ou fazendo arte, sempre trabalhando ao meu lado. Por toda a atenção dispensada, pela grande ajuda no desenvolver do projeto e por me libertar quando fico preso no laboratório.

À Josy, por me auxiliar sempre prontamente quando precisei, pela ajuda indispensável em todos os protocolos finais do trabalho sempre com muita gentileza e paciência, muito obrigado.

Ao Alexandro, pela grande amizade e pelos momentos de enorme descontração, exemplo de profissional e merecedor de muito sucesso! Valeu Monstrinho.

Ao Dr. Matheus Bertanha, pela simplicidade que envolve o verdadeiro grande profissional, pela amizade sincera e parceria proveitosa nos trabalhos com células-tronco.

À Priscila, por me acolher tão bem no que seria minha casa por quase dois anos, pelos ensinamentos que nunca esquecerei e pela grande amizade.

À Dra. Márjorie de Assis Golim, pela grande competência na realização dos testes durante todo o trabalho, pela recepção sempre tão agradável no Laboratório de Citometria de Fluxo e pela excelente profissional que é, sem você este trabalho não estaria aqui. Muito obrigado!

À Léia, do Laboratório de Citometria de Fluxo, pelos momentos de descontração e conversas sobre o nosso querido “Tricolor Paulista”.

Ao Valdir Cruz e Amauri, pela realização das eletroforeses em gel de ágar, sempre com boa vontade e entusiasmo no trabalho, muito obrigado.

À Ana da graduação do IB, por me livrar de enrascadas durante todos esses 4 anos.

À equipe do Laboratório de Telômeros do Depto de Genética: Dra. Maria Isabel, Rita Viveiros e João Augusto (Xiba), pelo auxílio com as eletroforeses em gel de poliacrilamida.

Aos funcionários do Hemocentro de Botucatu: Cléo, Janice, Rita e Esmite, sempre prestativos e dispostos a ajudar.

À República Só-Kanela: Bagaço, Borra-Linguíça, Lacrimoso (Sebinho), Funga-saku, Bogomiu e Sula-Miranda, pelos grandes momentos passados juntos, pela amizade e apoio durante o ano inteiro e por me atrapalhar com muito barulho na hora de escrever esta monografia.

Às meninas do meu coração, Kuentro, Akuzada, Pipinela e Kuby, por me alegrar sempre, pelo apoio incondicional e pela amizade sincera e verdadeira. Sem vocês essa faculdade não seria a mesma!

Aos amigos de classe: Dori, Leila, Azia, Possu e demais, pelos momentos de grande descontração e amizade, por aturarem minhas trapalhadas nas aulas e pelas ajudas extra-oficiais.

Aos amigos de Santos, distantes porém sempre presentes: Duane, Giu, Diego, Felipe “Chininha”, Lidiani, Andressa Rabello e Laura Ruas. Sem vocês eu nem estaria aqui.

À querida Carol Serra, amiga para todas as horas, por me arrancar sorrisos pelo computador e ser grande motivo da minha saudade de casa.

Mais uma vez, à minha família querida: Rosandra, Manoel, Rodrigo, Rafael, Ema, Kco, Rejane e família, Neusa, Mariana, Paulo, Augusto, Cida, Carol e Érika, meu alicerce para toda a vida.

Aos animais sacrificados para a realização deste estudo.

A todos os demais que estiveram presentes em algum momento da minha jornada, meu muito obrigado.

*“O único lugar onde o sucesso vem antes
do trabalho é no dicionário”*

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A multipotencialidade das CTMs. Esta figura mostra a capacidade das CTMs, na cavidade da medula óssea, de autoregeneração (seta curvada) e em se diferenciar (setas retas e contínuas) nos tecidos da linhagem mesodermal. A capacidade de transdiferenciação em outras linhagens (ectoderme e endoderme) é apresentada pelas linhas pontilhadas, já que a transdiferenciação ainda é controversa in vivo..... 19
- Figura 2 - Produção de anticorpos monoclonais. Técnica para obtenção de anticorpos monoclonais desenvolvida por Köhler e Milstein, 1975, modificada por Deffune, 1992..... 25
- Figura 3 - Instalações do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. **A** Área limpa, sala de screening, **B** área limpa, nicho de células-tronco, **C** sala de microscopia e **D** Laboratório de Atividades Complementares..... 27
- Figura 4 - CTMs em aderência inicial.. **A** Objetiva de 5X, **B** objetiva de 10X e **C** e **D** objetiva de 20X, em contraste de fase ph1..... 30
- Figura 5 - Cultura de CTMs após 3 dias do plaqueamento inicial, ainda com a presença de outras linhagens celulares do estroma medular em suspensão. **A** e **B** objetiva de 10X e **C** e **D** objetiva de 20X, em contraste de fase ph1..... 31
- Figura 6 - Cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelho em 2ª passagem. **A** Objetiva de 5X, **B** objetiva de 10X e **C** e **D** objetiva de 20X, em contraste de fase ph1..... 32
- Figura 7 - Cultura de CTMs em plena expansão, atingindo confluência >70% da placa, prontas para tripsinização. **A** objetiva de 5X, **B** objetiva de 10X, **C** objetiva de 20X e **D** objetiva de 40X, em contraste de fase ph1..... 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 8 - Ampolas de CTMs de coelho criopreservadas. **A** Caixa (gaveta) para ampolas de criopreservação e **B** ampolas em descongelamento para realização de testes..... 34
- Figura 9 - CTMs derivadas de tecido adiposo em diferentes estágios de cultura. **A** Colônia de CTMs em aderência inicial em objetiva de 10X, **B** CTMs em confluência >70% em objetiva de 20X, **C** CTMs em segunda passagem, em objetiva de 5X e **D** objetiva de 20X, em contraste de fase ph1..... 35
- Figura 10 - Câmara de Neubauer, utilizada para determinação de viabilidade celular e contagem de células totais..... 36
- Figura 11 - **Linfócitos e mieloma ao microscópio invertido.** **1** Linfócito murino normal não fusionado, **2** mieloma múltiplo NS1 e **3** híbrido em rearranjo cromossômico. Objetiva de 40X em contraste de fase ph2..... 36
- Figura 12 - Citômetro FACSCalibur do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu..... 37
- Figura 13 - **A** Sobrenadante de cultura utilizado para determinação do isotipo de Ig e **B** líquido ascítico criopreservado utilizado para purificação dos anticorpos de interesse..... 39
- Figura 14 - Nanodrop ND1000, aparelho utilizado para determinação de proteínas totais..... 40
- Figura 15 - Aparelho ÄKTA prime plus, utilizado para purificação das amostras de líquido ascítico obtidas..... 41
- Figura 16 - Eletroforese em gel de ágar a 1% em lâmina de vidro, pré-purificação. As setas indicam o pico de gamaglobulina de interesse. Líquido ascítico dos clones **A** MSC1-160 A20, **B** MSC1-160 A41, **C** MSC1-160 A60 e **D** MSC1-160 A63..... 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 17 -	Análise por densitometria das eletroforeses pré e pós-purificação do clone MSC1-160 A63.....	49
Figura 18 -	Determinação de Classe e Subclasse de Imunoglobulinas murinas pelo método <i>CBAFlow</i> (BD Bioscience®). Gráfico <i>dot plot</i> indicando presença de imunoglobulinas IgG1 de cadeia leve <i>kappa</i>	50
Figura 19 -	Gráficos de leitura do aparelho AKTA-PRIME® durante as purificações de líquido ascítico dos clones A MSC1-160 A63, B MSC1-160 A55, C MSC1-160 A41 e D MSC1-160 A20, todos da subclasse IgG ₁	51
Figura 20 -	Análise do controle de autofluorescência e definição do <i>gate</i> celular com CTMs de medula óssea de coelho. Histograma do resultado obtido pelo clone MSC1-160 A69.....	53
Figura 21 -	Análise do controle de autofluorescência e definição do <i>gate</i> celular com CTMs de tecido adiposo de coelho. Histograma do resultado obtido pelo clone MSC1-160 A30.....	53
Figura 22 -	Análise do controle de autofluorescência e definição do <i>gate</i> celular com CTMs de tecido adiposo humano. Histograma do resultado obtido pelo clone MSC1-160 A47.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos dos efeitos de CTMs em modelos pré-clínicos de doença. Relação entre a doença, espécie animal estudada, órgão alvo, mecanismo propriamente dito e via de administração das CTM.....	21
Tabela 2 - Anticorpos monoclonais murinos aprovados até o ano de 2009.....	23
Tabela 3 - Condições para ligação e eluição de imunoglobulinas murinas em proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Tabela 4 – Eficiência das fusões celulares do protocolo MSC.....	45
Tabela 5 - Híbridos obtidos e positividade para IgG e IgM no último reteste.....	45
Tabela 6 – Resultados da clonagem realizada a partir do híbrido MSC1-160.....	46
Tabela 7 - Produção de anticorpos monoclonais por indução de ascite em camundongos BALB/c, volume de líquido ascítico produzido e dosagem de proteínas totais.....	47
Tabela 8 – Determinação de classe e subclasse dos anticorpos monoclonais.....	50
Tabela 9 - Concentração protéica das frações de líquido ascítico purificadas.....	52
Tabela 10 - Desempenho dos anticorpos monoclonais frente a diferentes populações celulares.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - **Custo benefício na obtenção de CTMs de medula óssea e tecido adiposo.** **A)** Tempo de cultura médio necessário para que as CTMs pudessem ser congeladas após a terceira passagem, representado em dias. **B)** Média de células obtidas por frasco de cultura inicial, na potência 10^4 . **C)** Relação entre o tempo médio de cultura celular e a média de células obtidas por cultura inicial, na potência 10^3 , representando a efetividade diferencial entre os tecidos, com superioridade do tecido adiposo..... 43
- Gráfico 2 - Análise comparativa dos anticorpos monoclonais frente a diferentes populações celulares. Os padrões de reconhecimento estão representados em porcentagem..... 55

SUMÁRIO

RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Células-tronco mesenquimais.....	19
1.2 Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais.....	20
1.3 Caracterização de linhagens de células-tronco mesenquimais.....	22
1.4 Anticorpos monoclonais: diagnóstico e terapêutica.....	22
1.5 Produção de anticorpos monoclonais.....	24
1.6 Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Instalações.....	27
3.2 Animais.....	29
3.3 Isolamento e expansão <i>ex vivo</i> de CTMs.....	29
3.4 Criopreservação das CTMs.....	34
3.5 Avaliação de duas diferentes fontes de CTMs.....	34
3.6 Imunização e obtenção de hibridomas secretores de anticorpos.....	36
3.7 <i>Screening</i> dos híbridos secretores por citometria de fluxo.....	37
3.8 Clonagem celular.....	38
3.9 Expansão dos clones secretores por produção de líquido ascítico.....	38
3.10 Controle eletroforético da monoclonalidade.....	39
3.11 Determinação da concentração de proteínas totais.....	40
3.12 Determinação de classe e subclasse de imunoglobulinas.....	40
3.13 Purificação das imunoglobulinas por imunoafinidade à proteína A Sepharose	41
3.14 Validação dos anticorpos monoclonais produzidos.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Avaliação de duas diferentes fontes de CTMs.....	43
4.2 Fusão celular e seleção dos híbridos secretores.....	44
4.3 Clonagem celular.....	46
4.4 Expansão dos clones secretores por produção de líquido ascítico.....	47
4.5 Controle eletroforético da monoclonalidade.....	48

SUMÁRIO

4.6 Determinação de classe e subclasse de imunoglobulinas.....	49
4.7 Purificação das imunoglobulinas por imunoafinidade à proteína A Sepharose..	51
4.8 Validação dos anticorpos monoclonais por citometria de fluxo.....	52
5. CONCLUSÕES.....	56
6. PERSPECTIVAS.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

RESUMO

Células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas multipotentes de população celular heterogênea que se proliferam *in vitro* como células aderentes ao plástico de cultura, de morfologia fibroblastóide e capazes de se diferenciar em células da linhagem mesodermal como osteócitos, condrócitos e adipócitos. O potencial terapêutico de CTMs vem sendo estudado em modelos experimentais, como o coelho, no Laboratório de Engenharia Celular de Botucatu. No entanto, ainda não foram relatados marcadores de superfície específicos para tais células, o que impossibilita o isolamento de linhagens de CTMs de coelho por caracterização imunofenotípica. O fato anterior é a justificativa da realização deste projeto cujo objetivo deste estudo foi produzir anticorpos monoclonais contra CTMs de coelho. Células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de medula óssea (MO) de coelho foram isoladas, cultivadas e expandidas *ex vivo*. As CTMs de MO foram imunógenos para três camundongos da linhagem isogênica BALB/c e os esplenócitos obtidos foram fusionados com células de mieloma múltiplo murino linhagem NS1 gerando hibridomas secretores de anticorpos contra CTMs. Os hibridomas obtidos foram selecionados por citometria de fluxo e as células produtoras de anticorpos foram retestadas. O híbrido MSC1-160 obteve a maior reatividade tendo sido clonado pela técnica de diluição limitante e micro manipulação. Após expansão clonal foi produzido líquido ascítico dos 10 melhores clones. Estas amostras foram purificadas por cromatografia de afinidade à proteína A-sepharose em coluna CL-4B e o controle de purificação realizado por eletroforese em gel de ágar a 1%. O isótipo identificado foi IgG para todos os 10 clones que mantiveram alta reatividade por citometria de fluxo contra CTMs de coelho. Os 10 anticorpos monoclonais murinos obtidos e caracterizados receberam a denominação de MSC1-160 A20, A30, A41, A47, A55, A60, A63, A69, A81 e A82, sendo que todos apresentam grande potencial biotecnológico para aplicado na pesquisa com células tronco mesenquimais de coelho .

Palavras chave: célula-tronco mesenquimal; anticorpo monoclonal; citometria de fluxo.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a heterogeneous population of cells that proliferate *in vitro* as plastic-adherent cells, have fibroblast-like morphology and can differentiate into bone, cartilage and fat cells. Therapeutic potential of MSCs have been studied in experimental models, such as rabbit, in Laboratory of Cell Engineering of Botucatu. However, no specific markers have been reported for expanded rabbit MSCs, which hampers the isolation of pure MSC populations by immunophenotypic characterization. Thus, the objective of this study was to produce monoclonal antibodies (mAbs) to rabbit MSCs. MSCs derived from rabbit bone marrow (BM) were isolated, cultured, expanded *ex vivo*, and immunized into three BALB/c mice, and spleen cells subsequently harvested were used to generate hybridoma cell lines secreting antibodies against MSCs. Hybridoma cells were screened by flow cytometry and antibody-producing cells were subjected to subsequent rounds of retests. MSC1-160 obtained the best positivity for IgG expression and was cloned by limiting dilutions and micromanipulation. Ascitic fluid from ten best clones was purified by affinity chromatography in Protein A-sepharose CL-4B column and purification control was performed by electrophoresis in agarose gels. The purified IgG were tested against rabbit MSCs, obtaining high positivity by flow Cytometry. In conclusion, we developed 10 mAbs, MSC1-160 A20, A30, A41, A47, A55, A60, A63, A69, A81, and A82, that recognize rabbit MSC cell surface antigens showing potential for immunophenotypic characterization of rabbit MSC cell lines.

Keywords: mesenchymal stem cell; monoclonal antibody; flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais (CTM) são células-tronco adultas multipotentes de população celular heterogênea e alto potencial regenerativo¹. CTMs se proliferam *in vitro* como células aderentes ao plástico de cultura, possuem morfologia fibroblastóide e formam colônias em cultura capazes de se diferenciar em células da linhagem mesodermal como osteócitos², adipócitos³ e condrócitos⁴, bem como em outras linhagens embrionárias^{5,6}, revelando alto nível de plasticidade^{7,27} (Figura 1).

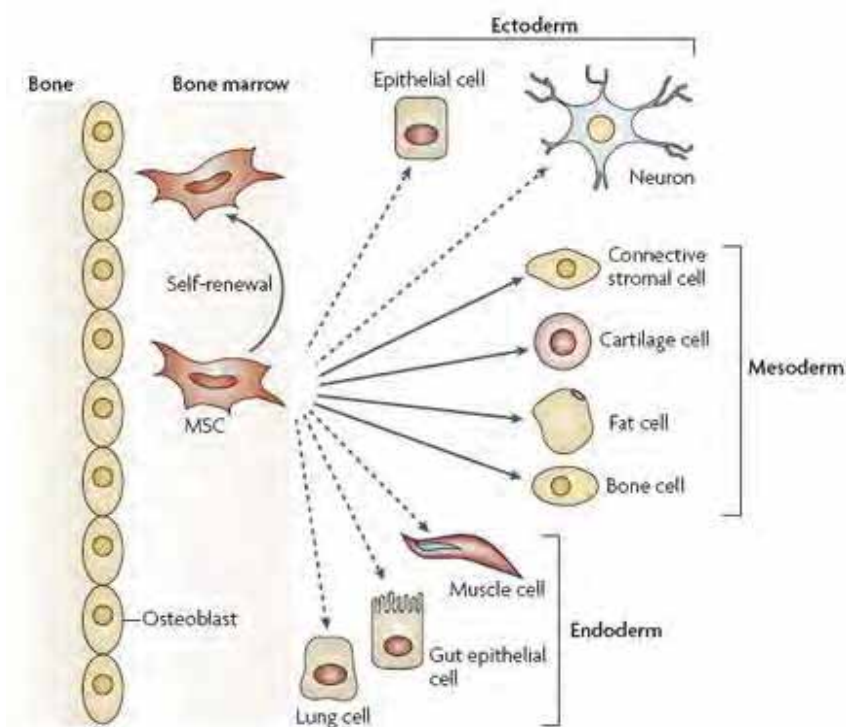


Figura 1. A multipotencialidade das CTMs. Autoregeneração das CTMs da medula óssea (seta curvada); diferenciação nos tecidos da linhagem mesodermal (setas retas e contínuas); transdiferenciação em outras linhagens (ectoderme e endoderme) é apresentada pelas linhas pontilhada. From: Nature 2009²⁶.

CTMs já foram obtidas de quase todos os tipos de tecido conjuntivo⁸ e tem sido caracterizadas majoritariamente após isolamento de medula óssea, sendo esta, portanto, a principal fonte de obtenção. Na medula óssea, até então são conhecidas ao menos cinco populações de células-tronco não-hematopoiéticas adultas: células progenitoras endoteliais, células-tronco mesenquimais, células progenitoras adultas multipotentes, células MIAMI e células-tronco muito

pequenas semelhantes às embrionárias⁹. O tecido adiposo também tem sido muito utilizado para obtenção de CTMs devido à grande concentração destas células no mesmo. A fração do estroma vascular se tornou foco das investigações após comprovar-se capaz de fornecer CTMs multipotentes. O procedimento cirúrgico simples, aliado à confirmação do sucesso destas células em comparação com as de medula óssea, quanto à capacidade de diferenciação, frequência de colônias obtidas e morfologia, conferem as CTMs derivadas do tecido adiposo plena capacidade de serem utilizadas na medicina regenerativa¹⁰.

CTMs cultivadas *in vitro* ainda não possuem marcadores únicos e específicos conhecidos. Existe um consenso geral de que CTMs humanas não expressam os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34 e CD14 ou as moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40, enquanto expressam níveis variados de CD105, CD73, CD44, CD90 (THY-1), CD71 e CD271^{11,12}, além de serem reconhecidas pelo anticorpo monoclonal STRO-1. A variação observada no nível de expressão desses marcadores provavelmente se deve às diferenças entre espécies, fontes de obtenção variadas e condições de cultura a que são submetidas.

Além do evidente potencial para regeneração tecidual, que será descrito mais adiante, trabalhos recentes tem demonstrado efeitos anti-proliferativos¹³⁻¹⁶ e anti-inflamatórios¹⁷⁻²⁵ desempenhados por CTMs. Devido a estas características, o interesse da pesquisa médica nos estudos envolvendo essa linhagem celular é intenso e crescente.

1.2 Potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais

Os efeitos terapêuticos promissores das CTMs se baseiam na sua capacidade de se hospedar e sobreviver durante um longo período de tempo em tecidos alvo distintos. Usando modelos animais, foi demonstrado que logo após o implante as CTMs se integram nos variados tecidos mesenquimais do receptor animal²⁸⁻³¹. Os resultados obtidos por *Ucelli* e colaboradores indicam baixos níveis de expressão de MHC I e nenhuma expressão de MHC II na superfície das CTMs, sugerindo uma baixa rejeição do sistema imune do receptor nos implantes alogênicos e menos complicações³². Sua baixa imunogenicidade *in vitro*³³, em estudos pré-clínicos³⁴ e em humanos³⁵ suporta a possibilidade de utilização de CTMs de doadores alogênicos. Estudos apontam as CTMs como uma real alternativa no tratamento de infarto do miocárdio e outras doenças cardíacas³⁶ na recuperação de animais com diabetes *mellitus* tipo 1³⁷, no auxílio de reparo em ferimentos na pele³⁸,

reconstrução de tecido muscular³⁹ e outros inúmeros tecidos⁴⁰ (Tabela 1). Constatou-se em experimentos com coelhos que a injeção local das células-tronco mesenquimais na cartilagem articular lesada promove o reparo do tecido danificado²⁷.

Tabela 1. Mecanismos dos efeitos de CTMs em modelos pré-clínicos de doença¹. Relação entre a doença, espécie animal estudada, órgão alvo, mecanismo propriamente dito e via de administração das CTM.

Disease	Species	Target organ	Mechanism of MSC effects	Route of MSC administration
Co-transplantation with human HSCs	Sheep	Haematopoietic organs	Support engraftment and increased haematopoiesis	Systemic
Myocardial infarction	Mouse	Heart	Generation of new myocytes and vascular structures	Local
Skin-graft rejection	Monkey	Skin	Inhibition of T cells	Systemic
Stroke	Rat	CNS	Release of trophic factors and induction of neurogenesis	Systemic
Melanoma	Mouse	Skin	Inhibition of tumour-specific T cells by CD8 ⁺ T cells	Local
Acute renal failure	Rat	Kidney	Inhibition of pro-inflammatory cytokine production and induction of anti-apoptotic and trophic factors	Systemic
EAE	Mouse	CNS	Inhibition of myelin-specific T cells and induction of peripheral tolerance	Systemic
Diabetes	Mouse	Pancreas and renal glomeruli	Induction of local progenitor cells and inhibition of macrophage infiltration	Systemic
EAE	Mouse	CNS	Inhibition of production of myelin-specific antibodies and encephalitogenic T cells; decreased axonal loss	Systemic
Rheumatoid arthritis	Mouse	Joint	Inhibition of T cells and of production of pro-inflammatory cytokines; induction of regulatory T cells	Systemic
Retinal degeneration	Rat	Eye	Decreased retinal degeneration through anti-apoptotic and trophic molecules	Local
Acute lung injury	Mouse	Lung	Inhibition of production of pro-inflammatory cytokines	Systemic
Acute lung injury	Mouse	Lung	Inhibition of production of pro-inflammatory cytokines and increased production of IL-10	Local
Acute renal failure	Mouse	Kidney	Tubular-cell regeneration through IGF1 secretion	Systemic
Myocardial infarction	Rat	Heart	Anti-apoptotic and mitogenic effect by the WNT-related molecule SFRP2	Local
Hepatic failure	Rat	Liver	Inhibition of leukocyte invasion through the release of cytokines and chemokines	MSC-conditioned medium
Diabetes	Mouse	Pancreas	Induction of local progenitors and inhibition of β -cell-specific T cells	Systemic

From: Nature 2009 ⁴⁵⁻⁶¹.

Além do potencial em terapia celular, as CTMs também despertam interesse na área de terapia gênica⁴¹⁻⁴³. Reiser e colaboradores demonstram a capacidade de CTMs geneticamente modificadas no tratamento de desordens neurológicas, sanguíneas, vasculares, musculares e retardando o crescimento de tumores⁴⁴. CTMs vem sendo utilizadas clinicamente na última década principalmente na área hemato-oncológica e poucos efeitos adversos foram atribuídos aos tratamentos. No entanto, o número limitado de pacientes submetidos a tais não nos permite firmar conclusões sobre a segurança da utilização terapêutica de CTMs, principalmente pela sua habilidade

de supressão imune, acarretando riscos de promoção de crescimento tumoral e metástase^{62,63}. Por outro lado, estudos revelam que CTMs de medula óssea podem ser cultivadas *in vitro* sem riscos de transformação maligna⁶⁴.

1.3 Caracterização de linhagens de células-tronco mesenquimais

O isolamento destas células pode ser estabelecido por meio da análise morfológica e caracterização de antígenos de superfície celular. A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como célula-tronco mesenquimal: deve ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens, deve ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, deve expressar os marcadores CD73, CD90 e CD105, e não deve expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α e os antígenos leucocitários humanos (HLA-DR)¹⁰. No entanto, o mercado não oferece reagentes específicos para realização dos testes com CTMs em muitas espécies como o coelho, o que inviabiliza a caracterização adequada e exigida da linhagem celular a ser utilizada.

1.4 Anticorpos monoclonais: diagnóstico e terapêutica

A produção de anticorpos monoclonais foi viabilizada pela descoberta de Köhler e Milstein, em 1975, obtendo uma célula com características secretoras herdadas de linfócitos B juntamente com a alta capacidade de multiplicação proveniente de células neoplásicas⁶⁵, proporcionando um dos maiores avanços da biotecnologia e engenharia celular das últimas décadas. Anticorpos homogêneos e específicos capazes de reconhecer determinado epítipo de um antígeno são produzidos por linhagens celulares ou clones obtidos de animais que tenham sido imunizados com antígeno de interesse. Baseando-se no fato de que cada linfócito B produz anticorpos de especificidade única, estes são então fusionados com células tumorais para tornarem-se 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 um tipo de imunoglobulina ou anticorpo monoclonal, geralmente denominado *mAb*⁶⁶⁻⁶⁸ na literatura internacional e AcMm na padronização brasileira. A utilidade dos anticorpos monoclonais se baseia em suas três principais características: sua especificidade de ligação e seletividade a uma estrutura

molecular particular, sua homogeneidade e sua habilidade de ser produzido em quantidades ilimitadas⁶⁹. A produção desses anticorpos possibilita o isolamento de reagentes com especificidade única e desejada⁷⁰, se encaixando perfeitamente nos requisitos necessários para uma ferramenta segura de caracterização de linhagens celulares.

A decisão de *Köhler & Milstein* em não patentear os anticorpos monoclonais acarretou numa rápida disseminação da técnica pelo mundo científico e biotecnológico. A inovação contribuiu para a maximização de muitas metodologias, especialmente no campo da imunologia, como imunofluorescência, ELISA, *Western Blotting*, citometria de fluxo, imunohistoquímica, imunohematologia, entre outros, gerando grandes avanços na pesquisa, diagnóstico e terapêutica. Desde então, o potencial diagnóstico e terapêutico desta ferramenta biotecnológica vem se provando verdadeiro, dado ao número de anticorpos monoclonais existentes no mercado atualmente⁷⁷ (Tabela 2).

Tabela 2. Anticorpos monoclonais murinos aprovados até o ano de 2009⁷⁷.

Anticorpo Monoclonal	Nome Comercial	Alvo	Tipo	Uso
Fanolesomab	NeutroSpec	CD15	Mouse	appendicitis (diagnosis)
Pemtumomab	Theragyn	MUC1	Mouse	Cancer
Nofetumomab merpemtán	Verluma	?	Mouse	Cancers
Imciromab	Myoscint	cardiac myosin	Mouse	cardiac imaging
Altumomab pentetate	Hybri-ceaker	CEA	Mouse	colorectal cancer (diagnosis)
Edrecolomab	Panorex	EpCAM	Mouse	colorectal carcinoma
Arcitumomab	CEA-Scan	CEA	Mouse	gastrointestinal cancers (diagnosis)
Besilesomab	Scintimum	CEA - related antigen	Mouse	inflammatory lesions and metastases (detection)
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	CD20	Mouse	non-Hodgkin's lymphoma
Sulesomab	LeukoScan	NCA-90 (granulocyte antigen)	Mouse	osteomyelitis (imaging)
Oregovomab	OvaRex	CA-125	Mouse	ovarian cancer
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	CD3	Mouse	prevention of organ transplant rejections
Capromab pendetide	Prostascint	prostatic carcinoma cells	Mouse	prostate cancer (detection)
Biciromab	FibriScint	fibrin II, beta chain	Mouse	tromboembolism (diagnosis)
Ertumaxomab	Rexomun	HER2/neu, CD3	rat/mouse hybrid	breast cancer

1.5 Produção de anticorpos monoclonais

A produção de AcMm pela técnica de *Köhler & Milstein*⁷² envolve procedimentos *in vivo* e *in vitro*. A geração de células secretoras requer o uso de animais, habitualmente camundongos. Sob condições apropriadas os hibridomas secretores de AcMm sobrevivem indefinidamente, possibilitando a produção contínua de anticorpos. Em suma, a produção de AcMm requer uma série de etapas, incluindo imunização, fusão, triagem preliminar, clonagem, caracterização, determinação de isotipo, especificidade e potencial epítipo alvo⁷¹.

Como imunógeno, pode-se utilizar células intactas, membranas totais, frações de membranas, proteínas purificadas, proteínas carregadas, microorganismos, etc. A escolha do agente de imunização, sua via e agenda de imunização determinam em parte o sucesso do protocolo de obtenção do determinado anticorpo monoclonal. Processos decisórios pré-protocolo são imprescindíveis para este sucesso: qual o anticorpo desejado (especificidade)? Em que técnica este AcMm será empregado: citometria de fluxo, hemaglutinação, ELISA, *blotting*? Qual o tipo de imunoglobulina de interesse: IgG, IgM?. Respondidas as questões preliminares, a segunda etapa do processo de imunização é definir a forma menos denaturante de obter o antígeno em questão e qual será o controle da reação⁷¹.

Comprovando-se a eficácia da imunização animal através da titulação de anticorpos no soro dos animais, a etapa subsequente é a fusão celular. Os métodos de fusão celular são: químico, virais e elétricos. O mais corrente ainda é o químico com uso de polietilenoglicol, substância que causa fusão de membranas celulares. Para obtenção das células a serem fusionadas, o baço é extraído e usado como fonte de células B. Esta fusão é realizada com células de mieloma murino (NS-1), originando os hibridomas, capazes de crescer indefinidamente sob condições ideais. As células mielomatosas, com gene hipermetilado têm capacidade de multiplicar-se indefinidamente *in vitro*, sem produzir imunoglobulina e são deficientes da enzima hipoxantina-fosforibosil-transferase-HGPRT, deficiência esta que será usada como meio de seleção dos hibridomas gerados. Os linfócitos não têm essa capacidade, mas por sua vez, produzem imunoglobulina. Células híbridas de boa qualidade são aquelas que herdaram a capacidade de multiplicação *in vitro* do mieloma e o gene de Ig do linfócito B⁷¹.

As células cultivadas em meio seletivo HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) promovem a proliferação dos hibridomas, ou seja, apenas as fusões desejadas (linfócitos B/NS-1),

cujo hibridoma herdou o sistema HGPRT dos linfócitos (HGPRT+) e usa a via alternativa para síntese de nucleotídeos, fato este impossível para o mieloma que não se fusionou (HGPRT-). As demais células fusionadas serão eliminadas juntamente com as células não fusionadas⁷¹.

A cultura dos híbridos deve ser mantida para obtenção de sobrenadante de cultura contendo anticorpos, estes são então testados quanto à especificidade frente à célula imunógena. Vários testes podem ser aplicados (ELISA, radioensaio, *dot plot*, *immunoblotting*, imunofluorescência, citometria de fluxo, hemaglutinação, etc), no entanto, a escolha deverá ser estrategicamente definida com base na aplicação que se deseja dar ao monoclonal⁷¹.

1.6 Justificativa

O Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu produz anticorpos monoclonais de acordo com a técnica de *Köhler & Milstein*⁷² de 1975 modificada por *Deffune* em 1992⁷³ (Figura 2). A produção do anticorpo monoclonal proposto no estudo lançaria a primeira ferramenta de caracterização específica para células-tronco mesenquimais de coelho, linhagem celular muito visada pela pesquisa médica e altamente promissora na terapia celular.

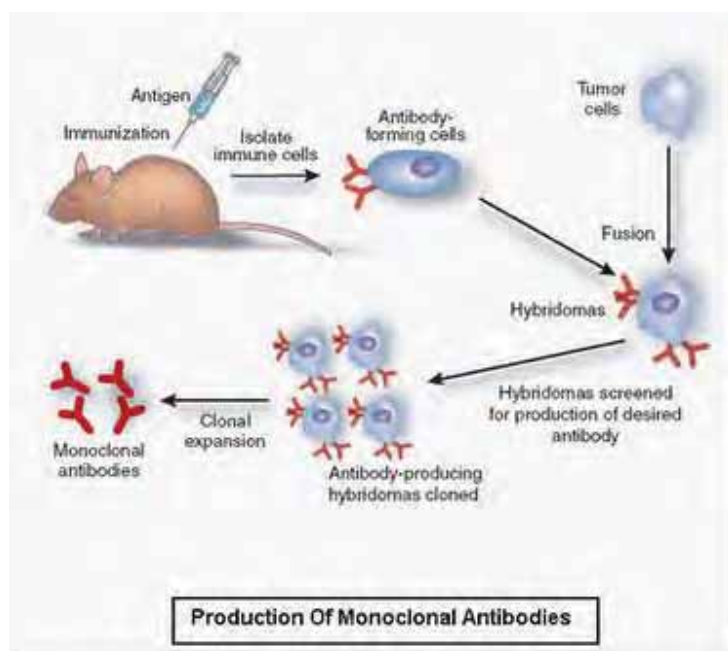


Figura 2. Produção de anticorpos monoclonais. Técnica para obtenção de anticorpos monoclonais desenvolvida por *Köhler e Milstein*, 1975, modificada por *Deffune*, 1992.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície de CTMs de coelho.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e expandir CTMs de coelho obtidas por punção de medula óssea.
- Avaliar a melhor fonte de obtenção de CTMs de coelho: medula óssea ou tecido adiposo.
- Produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos de superfície de membrana de células-tronco mesenquimais de coelho.
- Clonar e isotipar todos os anticorpos produzidos.
- Caracterizar imunoquimicamente os anticorpos produzidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações

Este trabalho foi desenvolvido em dois laboratórios da Faculdade de Medicina de Botucatu: Laboratório Experimental de Cirurgia, onde foi realizada a etapa de coleta de medula óssea dos animais; Laboratório de Engenharia Celular, pertencente ao Hemocentro de Botucatu, onde foram realizadas todas as demais etapas (Figura 3).



Figura 3. Instalações do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. *A* Área limpa, sala de screening, *B* área limpa, nicho de células-tronco, *C* sala de microscopia e *D* Laboratório de Atividades Complementares.

O Laboratório de Engenharia Celular é integrante da seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu tendo iniciado suas atividades em dezembro de 1992. Durante este período, graças às fontes de financiamento de pesquisa vigente no país, em especial FAPESP, CNPq, FINEP, BNDES e FNS que foram entidades de suporte à pesquisa, as atividades cresceram dando hoje vazão a três diferentes linhas de atuação: obtenção de anticorpos monoclonais murinos, diferenciação de células-

tronco de diferentes espécies e mais recentemente a linha de produção de curativos bioativos com foco em terapêutica humana. Estas linhas de pesquisa ocupam uma área correspondente a 1200 m² classificados em três categorias:

1. Laboratório convencional ou *standard* onde encontra as atividades do Laboratório de Atividades Complementares (LAC) tais como: contagem de células, viabilidade, preparo de tampões, técnicas ELISA, eletroforese de proteínas em gel de agarose ou poliacrilamida, purificação de proteínas pela técnica de cromatografia de afinidade, entre outras (Figura 3.D).
2. Área limpa classificada 10.000. Esta área possui ar filtrado sob pressão positiva com filtros do tipo HEPA, contém vestiário específico com ducha na entrada e colocação de EPIs de circulação interna para diferenciar de aventais de circulação convencional em corredores ou outros laboratórios. Dentro desta área encontra-se equipado e em funcionamento a área de *screening* (Figura 3.A) que funciona tecnicamente como antecâmara dos três nichos de cultura celular com ar filtrado individualizado. Em todos os nichos existem dois ambientes: microscopia (Figura 3.C) seguida de área de manipulação estéril (Figura 3.B) propriamente dita. No primeiro nicho são desenvolvidas atividades relacionadas à pesquisa de curativos bioativos, no nicho 2 pesquisas com a produção de novos anticorpos monoclonais murinos e no primeiro, a diferenciação de células tronco.
3. Laboratório de contenção de nível III de segurança, P3 ou BSL-3 dentro da classificação internacional da matiz da OMS de laboratórios segundo a periculosidade, presença ou não de medidas preventivas e de vacinação além do risco para o homem e o meio ambiente. Nesta área o conceito laboratorial diferenciado recebe tem sistema de ar filtrado com filtros *bag in – bag out* e pressão negativa. A contenção de entrada começa pela existência de outro laboratório, que corresponde ao LAC, seguido de vestiário de barreira com colocação de roupas insufláveis e uso obrigatório de ar comandado. Todo o ar respirado pela equipe de pesquisadores deve vir exclusivamente do sistema de ar no dorso do manipulador. A totalidade do ar interno passa por filtros de saída que garantem a filtração do tipo ULPA. Esta área ainda está em fase final de acabamento. Terá o destino de cultivo de células-tronco de pacientes que possam ter algum vírus do tipo

Hepatite B, C ou mesmo HIV e que tenham a necessidade de se beneficiar da terapia celular com diferenciação *ex vivo*.

3.2 Animais

A utilização dos animais neste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, como consta no protocolo nº741/2009, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo COBEA. Foram utilizados seis coelhos da raça *New Zealand* linhagem Botucatu para obtenção das amostras de medula óssea. Para as etapas de clonagem e produção de líquido ascítico foram utilizados 46 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.

3.3 Isolamento e expansão *ex vivo* de CTMs

Amostras de medula óssea foram obtidas por punção de crista ilíaca de coelhos *New Zealand* provenientes do Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais da FMB, com prévia aprovação da Comissão de Ética da Experimentação Animal. As células linfomononucleares (LMN) foram isoladas pela técnica de gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque (Sigma®), 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®). 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, espalhadas pelo frasco. Após 14 a 21 dias do estabelecimento da cultura primária, observou-se a predominância de células com aparência fibroblastóide, ocupando 70% da área de aderência (Figuras 4, 5, 6 e 7). Estas foram ressuspensas utilizando 0,25% tripsina-EDTA (Invitrogen™) e congeladas para posterior utilização^{74,75}.

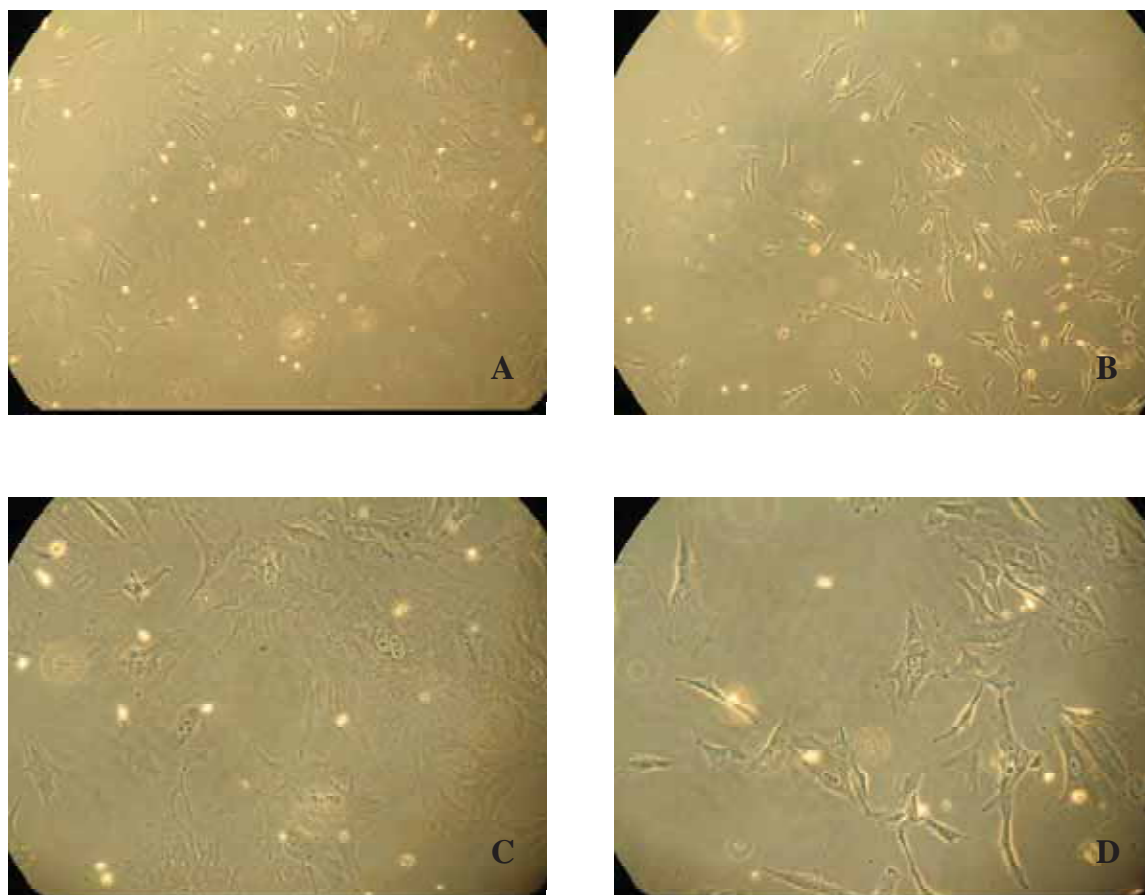


Figura 4. CTMs em aderência inicial.. *A* Objetiva de 5X, *B* objetiva de 10X e *C* e *D* objetiva de 20X, em contraste de fase ph1.

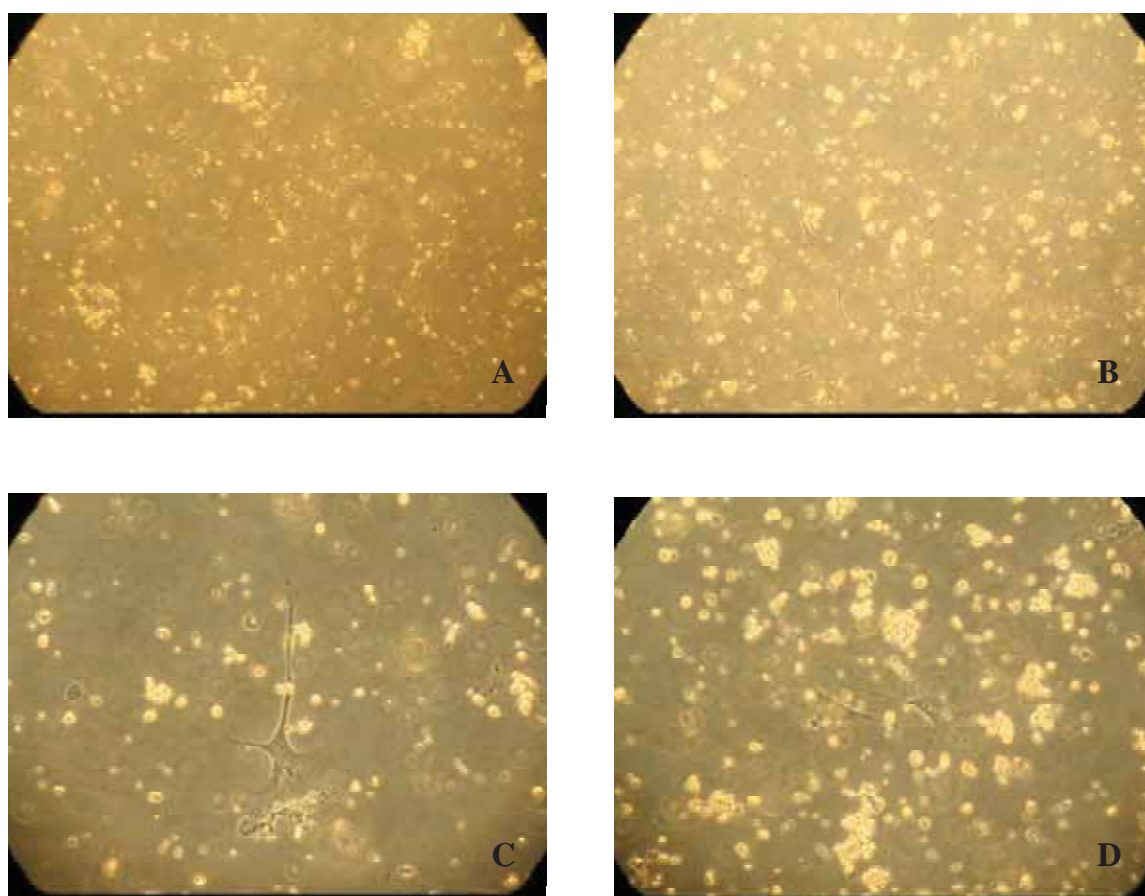


Figura 5. Cultura de CTMs após 3 dias do plaqueamento inicial, ainda com a presença de outras linhagens celulares do estroma medular em suspensão. A e B objetiva de 10X e C e D objetiva de 20X, em contraste de fase *ph1*.

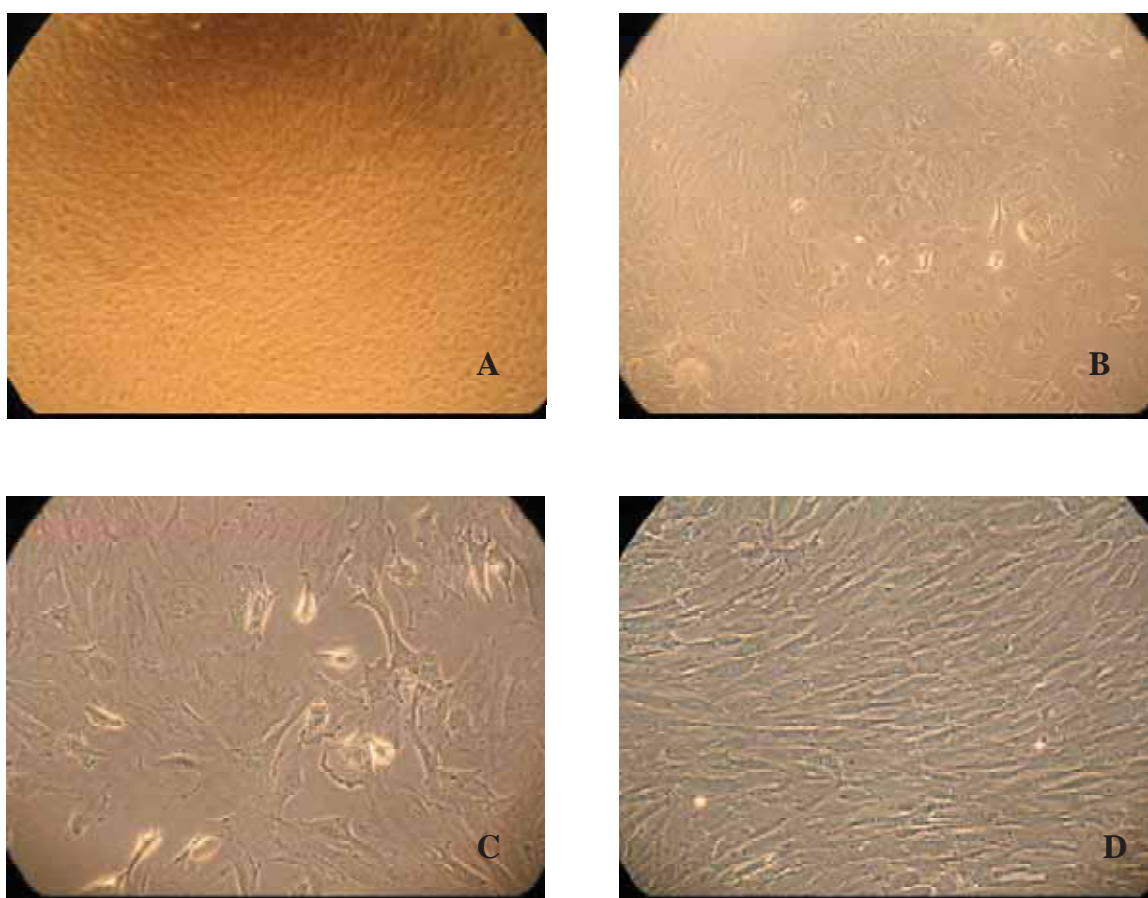


Figura 6. Cultura de células-tronco mesenquimais de medula óssea de coelho em 2ª passagem. *A* Objetiva de 5X, *B* objetiva de 10X e *C* e *D* objetiva de 20X, em contraste de fase ph1.

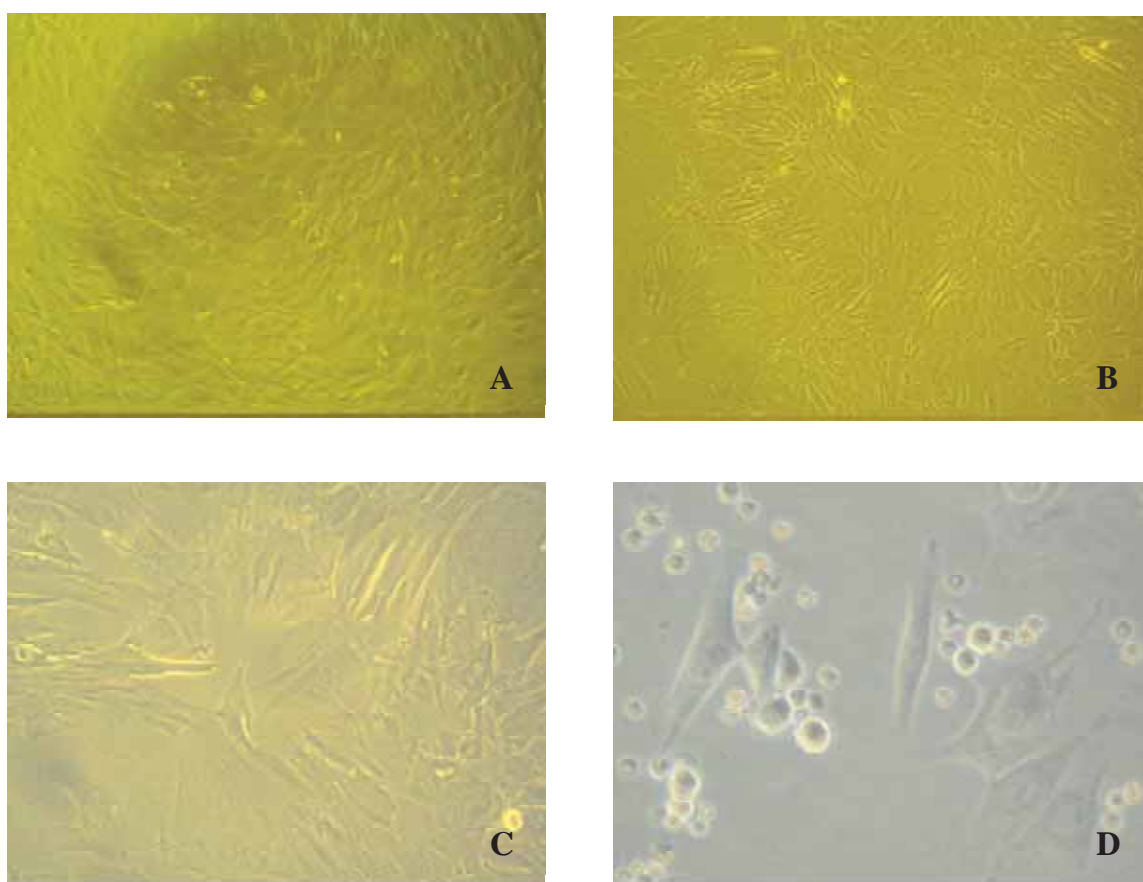


Figura 7. Cultura de CTMs em plena expansão, atingindo confluência >70% da placa, prontas para tripsinização. **A** objetiva de 5X, **B** objetiva de 10X, **C** objetiva de 20X e **D** objetiva de 40X, em contraste de fase *ph1*.

3.4 Criopreservação das CTMs

Após três passagens por tripsina as CTMs foram congeladas para posterior utilização no *screening* por citometria de fluxo. Após devidamente lavadas com PBS e centrifugadas, foi adicionado às células DMSO (LGC Biotecnologia™) 10% SFB. A amostra foi homogeneizada, transferida para o criotubo e rapidamente armazenada a -80°C. Desta forma, as ampolas foram registradas no Banco de Células do Laboratório de Engenharia Celular e utilizadas nas várias etapas do trabalho (Figura 8).

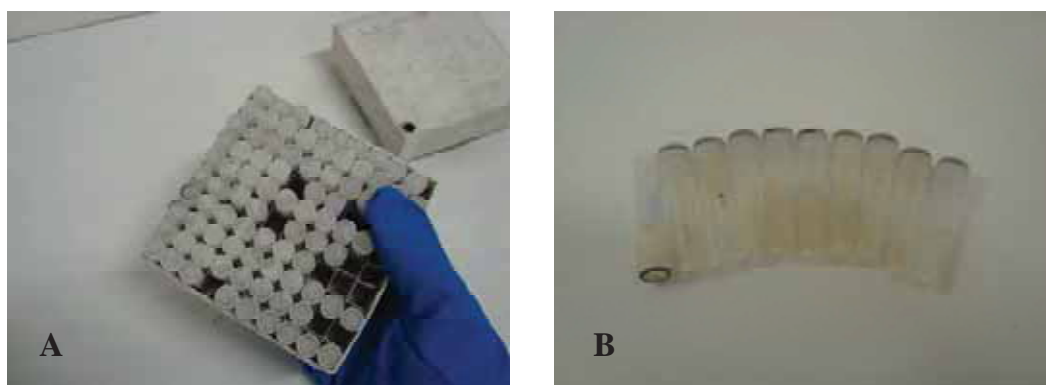


Figura 8. Ampolas de CTMs de coelho criopreservadas. **A** Caixa (gaveta) para ampolas de criopreservação e **B** ampolas em descongelamento para realização de testes.

3.5 Avaliação de duas diferentes fontes de CTMs

Finalizando as etapas de coleta, isolamento e expansão das células, foi realizado um levantamento de dados a fim de se comparar as duas principais fontes de obtenção de CTMs: medula óssea (a fonte utilizada no trabalho) e tecido adiposo (Figura 9). Conforme já estabelecido na literatura, CTMs de ambos os tecidos mostram ser seguras quanto à aplicação clínica, apresentam produção de fatores de crescimento, promovem imunomodulação e possuem semelhante expressão dos marcadores de superfície. Desta forma, nos restou analisar em CTMs dos dois diferentes tecidos o potencial de proliferação da população, também denominado *PDT* (do inglês, *Population Doubling Time*)⁷⁶ e o tempo de cultura necessário para que estas pudessem ser utilizadas efetivamente, bem como os custos envolvidos. *Population Doubling Time* foi calculado utilizando a fórmula $PDT = 2 \times t \times \log(N_f/N_i)$, onde *t* é o tempo de cultura em dias necessário para

atingir confluência >70%, Ni é o número de plaqueamento inicial e Nf é o total de células obtidas ao final da cultura.

Amostras de medula óssea e tecido adiposo de seis diferentes coelhos foram obtidas com média de 15mL de medula óssea e 5g de tecido adiposo por coelho. Foram plaqueadas inicialmente 5×10^3 células LMN por frasco de 25cm^2 e assim que atingiram confluência >70% do frasco, foram tratadas com tripsina-EDTA (Invitrogen™), ressuspensas e contadas na câmara de Neubauer (Figura 10). Os dados obtidos foram utilizados na fórmula PDT e o potencial de proliferação foi calculado.

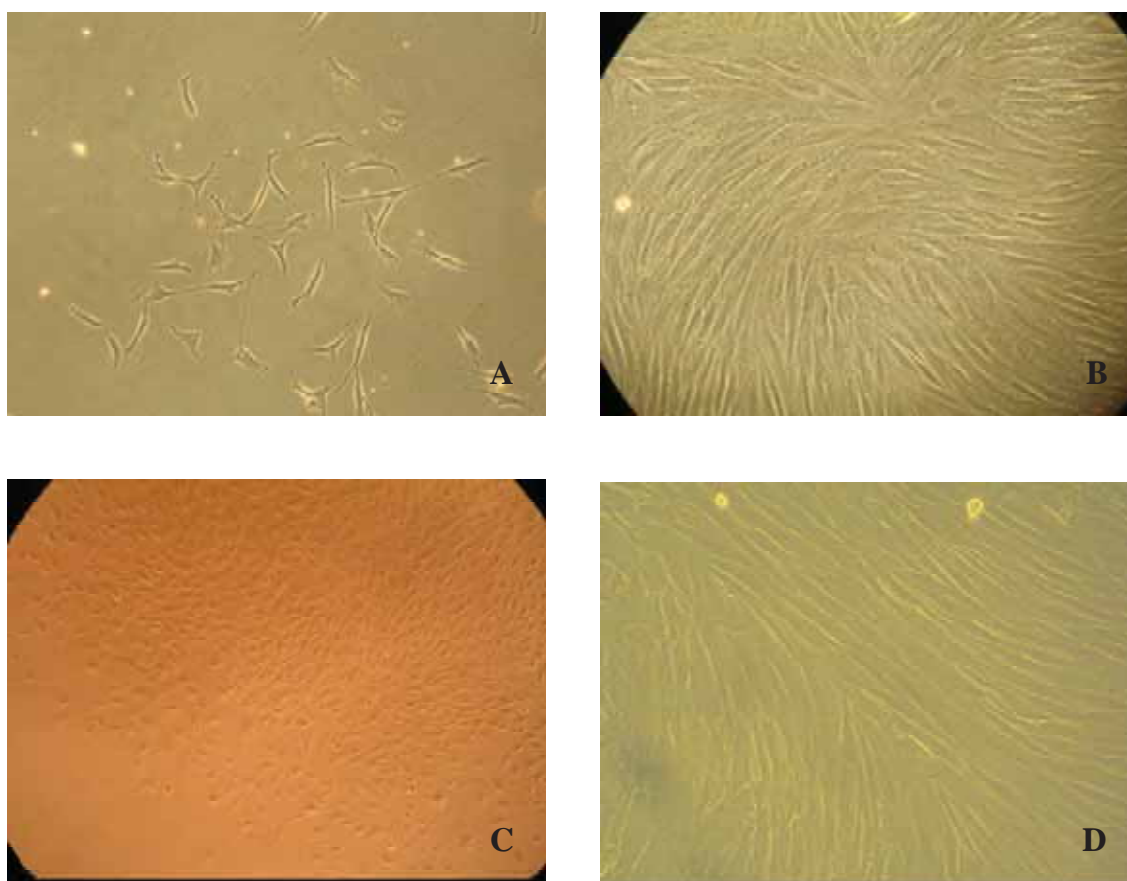


Figura 9. CTMs derivadas de tecido adiposo em diferentes estágios de cultura. **A** Colônia de CTMs em aderência inicial em objetiva de 10X, **B** CTMs em confluência >70% em objetiva de 20X, **C** CTMs em segunda passagem, em objetiva de 5X e **D** objetiva de 20X, em contraste de fase ph1.



Figura 10. Câmara de Neubauer, utilizada para determinação de viabilidade celular e contagem de células totais.

3.6 Imunização e obtenção de hibridomas secretores de anticorpos

A obtenção de anticorpos seguiu rigorosa agenda incluindo imunização, fusão celular e screening dos híbridos obtidos. Para o protocolo de imunização foram utilizados três camundongos isogênicos da linhagem BALB/c. Os antígenos foram apresentados como proteínas de membrana de CTMs previamente isoladas de medula óssea de coelho e expandidas *ex vivo*. Como se almejava obtenção de anticorpos da classe IgG, para utilização em citometria de fluxo, adotou-se protocolo longo de imunização com cinco doses de imunização 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 NS1 (Figura 11), utilizando polietilenoglicol e meio de cultura seletivo HAT.

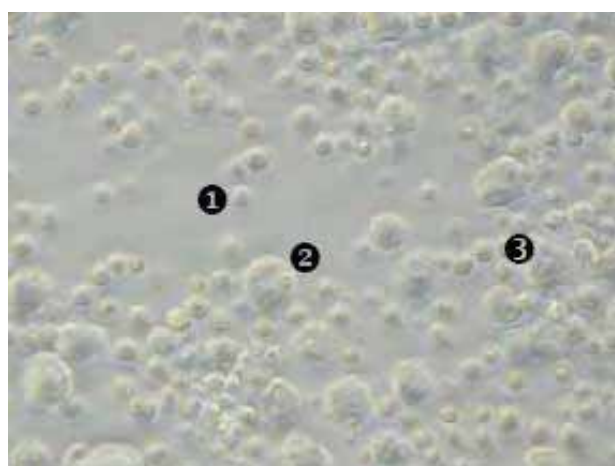


Figura 11. Linfócitos e mieloma ao microscópio invertido. 1 Linfócito murino normal não fusionado, 2 mieloma múltiplo NS1 e 3 híbrido em rearranjo cromossômico. Objetiva de 40X em contraste de fase ph2.

3.7 *Screening* dos híbridos secretores por citometria de fluxo

Para a seleção dos híbridos secretores, foi adotada a técnica de citometria de fluxo. Foram utilizadas as CTMs isoladas de medula óssea de coelho, 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 recobriam 80% da área de cultura, o sobrenadante foi coletado em tubo para citômetro (BD Biosciences™). A cada tubo, devidamente identificado com a nomenclatura do híbrido, foram adicionadas 1×10^5 células em alíquotas de 100uL, descongeladas em banho Maria a 37°C. Procedeu-se à incubação do provável anticorpo primário (SNC), adicionado 100uL de SNC a cada tubo, por 1h sob leve agitação em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com Isoton® e foi adicionado o anticorpo secundário, *goat anti-mouse* IgG-FITC (Invitrogen™), na diluição 1:200. Os híbridos “positivos” foram retidos e retestados três vezes, seguindo-se o mesmo protocolo no primeiro teste de *screening*. Somente os que mantiveram o perfil de positividade em todos os retestes foram retidos. As análises foram realizadas em citômetro FACSCalibur (Figura 12).

Estes híbridos foram expandidos *in vitro* e foram congeladas cinco ampolas de cada em DMSO (LGC Biotecnologia™) 10% SFB e estocadas no banco de células em nitrogênio líquido. Destaca-se que no terceiro reteste as amostras foram avaliadas em duplicatas, em que cada amostra recebeu um tipo de anticorpo: *goat anti-mouse* IgG-FITC (Invitrogen™); ou *goat anti-mouse* IgM-FITC (Invitrogen™).



Figura 12. Citômetro FACSCalibur do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu.

3.8 Clonagem celular

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 foi realizado o método de diluição limitante em microplaca⁶⁹ com *feeder cells* de timócitos 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 foi 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 únicos foram considerados potenciais monoclonais^{70,78}.

Os clones foram selecionados pelo aspecto morfológico e grau de crescimento e em seguida testados por citometria de fluxo. Aqueles que obtiveram reação positiva na avaliação imunógeno *versus* anticorpo foram expandidos em volumes crescentes de meio de cultura até que atingissem densidade adequada para congelamento e para inoculação em camundongos visando a indução de ascite. As células foram congeladas em DMSO (LGC BiotecnologiaTM) 10% SFB a 4°C, seguido de congelamento em nitrogênio líquido.

3.9 Expansão dos clones secretores por produção de líquido ascítico

Para a obtenção dos anticorpos em maior concentração foi realizada a produção de líquido ascítico em fêmeas de camundongos BALB/c de 2 a 3 meses de idade. Foi injetada via intraperitoneal 1mL de óleo mineral puro (Cristália®), para causar irritação no peritônio do animal. Após isto, 15 dias injetou-se 1mL de suspensão celular contendo 5x10⁵ clones. Ao observar o intumescimento do abdômen dos camundongos, o líquido ascítico foi puncionado utilizando agulha e seringa estéreis. Procedeu-se a clarificação do líquido ascítico, através de centrifugação a 12.000g a 4°C por 30 minutos. Células e gordura remanescentes foram eliminadas, o sobrenadante aliquoteado e armazenado a -80°C (Figura 13).

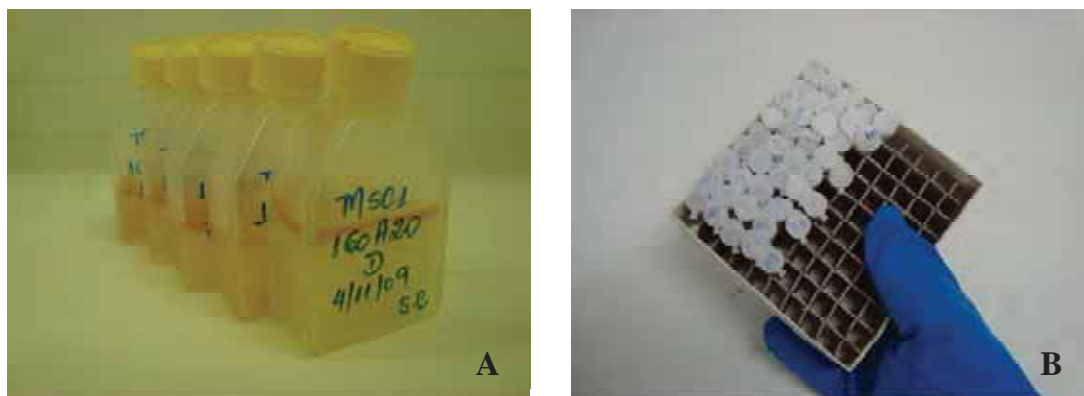


Figura 13. **A** Sobrenadante de cultura utilizado para determinação do isotipo de Ig e **B** líquido ascítico criopreservado utilizado para purificação dos anticorpos de interesse.

3.10 Controle eletroforético da monoclonalidade

A confirmação da monoclonalidade foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de ágar nos períodos pré e pós-purificação. Foi realizada a eletroforese sobre lâminas de vidro em gel de ágar a 1%, diluído em tampão Veronal (pH 8.9). As lâminas foram cobertas pelo gel e após secagem foram formadas finas canaletas de aproximadamente 1,2 cm de comprimento. Em cada lâmina de vidro foram aplicados 5uL da amostra. As lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, aplicando-se 80mA e 180V durante 60 minutos. Após a corrida, as lâminas foram deixadas em solução contendo 70% de álcool, 5% de ácido acético e 25% de água, durante 20 minutos para fixação, cobertas por papel filtro e deixadas em estufa a 37°C por 12h para secagem. Para evidenciar a separação das proteínas, utilizou-se o corante negro de amido e a leitura em scanner com o software SDS-60 para eletroforese (CELM[®]).

3.11 Determinação da concentração de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais presentes no líquido ascítico pré e pós-purificação foi realizada com auxílio de espectrofotômetro NanoDrop[®] ND-1000 (Figura 14), segundo especificações do fabricante, e visualizada por meio do *software* acoplado ao aparelho. O módulo *ProteinA280* do *software* determina a concentração protéica da amostra medindo a absorbância a 280nm, fornecendo o resultado em mg/mL.



Figura 14. Nanodrop ND1000, aparelho utilizado para determinação de proteínas totais.

3.12 Determinação de classe e subclasse de imunoglobulinas

As determinações de classe e subclasse das imunoglobulinas murinas secretadas pelos clones foram realizadas através de citometria de fluxo no equipamento FACSCalibur[™], com uso do kit CBA[™] (*Cytometric Bead Array Analysis*) *Isotype Murine Immunoglobulins*, ambos da marca BD[®]. O princípio da técnica baseia-se em micropartículas de polimetileno (beads) marcadas com intensidade de fluorescência distintas e ligadas a anticorpos monoclonais específicos para imunoglobulinas murinas (IgA, IgE, IgM, IgG₁, IgG2_a, IgG2_b e IgG₃). As amostras de líquido ascítico foram incubadas junto às *beads* e posteriormente reveladas com anticorpo secundário marcado com fluorocromo diferente. Os dados foram adquiridos pelo *BD CellQuest Software[™]* e analisados automaticamente no *BD CBA Software[™]*.

3.13 Purificação das imunoglobulinas por imunoafinidade à proteína A Sepharose

A proteína A é um polipeptídeo de 2.000 daltons isolado de *Staphylococcus aureus*, dotada de grande capacidade de se ligar à fração Fc de IgGs com alta afinidade e especificidade^{79,80}. A sepharose é uma matriz com capacidade de adsorver proteínas. No processo de purificação, a proteína A se liga à matriz e as imunoglobulinas se ligam à proteína A. As demais proteínas e impurezas contidas no líquido ascítico, por não terem afinidade à proteína A, não são adsorvidas, sendo primeiramente eluídas no processo de purificação. Em seguida, a mudança do pH da coluna de afinidade permite a quebra da ligação entre imunoglobulinas e proteína A, eluindo especificamente a subclasse de interesse⁸¹ (Tabela 3). A purificação dos líquidos ascíticos foi realizada no equipamento ÄKTA prime plus GE[®] (Figura 15) em colunas *Hi-Trap*[™].

Tabela 3. Condições para ligação e eluição de imunoglobulinas murinas em proteína A de *Staphylococcus aureus*.

Subclasse IgG	Ligação	Eluição
IgG ₁	pH > 8.0	pH < 6.0
IgG _{2a}	pH > 7.0	pH < 4.5
IgG _{2b}	pH > 7.0	pH < 3.5
IgG ₃	pH > 7.0	pH < 4.5



Figura 15. Aparelho ÄKTA prime plus, utilizado para purificação das amostras de líquido ascítico obtidas.

3.14 Validação dos anticorpos monoclonais produzidos

Os anticorpos monoclonais produzidos e purificados foram submetidos a testes em citometria de fluxo para verificar sua reatividade com as linhagens celulares em questão. Foram utilizadas, além de CTMs de medula óssea de coelho, CTMs de tecido adiposo de coelho e CTMs de tecido adiposo humano, todas derivadas de cultura celular em 3ª passagem. A análise do desempenho dos AcMm produzidos frente à diferentes populações celulares visa caracterizar a especificidade do anticorpo, bem como possíveis reações cruzadas contra antígenos presentes em CTMs de diferentes espécies animais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de duas diferentes fontes de CTMs

A análise dos registros da cultura celular identifica que o tempo de cultura médio necessário para que as CTMs pudessem ser utilizadas efetivamente, a partir da 3ª passagem, foi de 28 dias quando derivadas de medula óssea e de 8,4 dias quando derivadas de tecido adiposo. A média de células obtidas por cultura individual realizada foi de $4,9 \times 10^5$ e medula óssea e $3,9 \times 10^5$ em tecido adiposo. A relação entre os dois dados nos informa que para cada dia de cultura realizada, a medula óssea nos oferece em média $1,75 \times 10^4$ CTMs enquanto o tecido adiposo nos oferece $4,65 \times 10^4$ CTMs (Gráfico 1). Desta forma, a obtenção de CTMs a partir de tecido adiposo determina maior quantidade de células em menor intervalo de tempo. Conseqüentemente, os gastos com reagentes e meios de cultura são menores no processamento a partir de tecido adiposo, e a “agressão” que o processo de cultura determina sobre as células, é menor com conseqüente menor dano de DNA. Esta fonte, portanto, demonstra ser a de eleição para as opções de terapia celular.

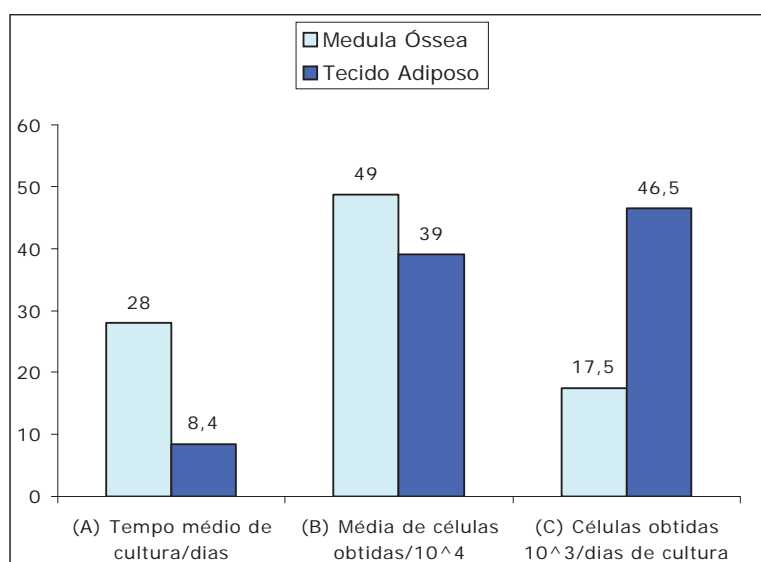


Gráfico 1. Custo benefício na obtenção de CTMs de medula óssea e tecido adiposo. **A)** Tempo de cultura médio necessário para que as CTMs pudessem ser congeladas após a terceira passagem, representado em dias. **B)** Média de células obtidas por frasco de cultura inicial, na potência 10^4 . **C)** Relação entre o tempo médio de cultura celular e a média de células obtidas por cultura inicial, na potência 10^3 , representando a efetividade diferencial entre os tecidos, com superioridade do tecido adiposo.

A partir da fórmula *PDT* calculamos o potencial de proliferação celular das duas diferentes populações celulares. CTMs derivadas de medula óssea obtiveram $PDT = 0,57$, enquanto CTMs de tecido adiposo apresentam $PDT = 0,22$, ou seja, proliferam 2,6 vezes mais rapidamente que CTMs de medula óssea.

4.2 Fusão celular e seleção dos híbridos secretores

Foram realizadas três fusões celulares pelo método de polietilenoglicol, adotando protocolo de imunização longo visando a obtenção de anticorpos da classe IgG. O antígeno apresentado foram CTMs de coelho íntegras, previamente isoladas e expandidas *ex vivo*. Os animais foram anestesiados com pentobarbital, removeu-se o baço seguido da extração dos esplenócitos. Estes foram fusionados com células de mieloma múltiplo murino (NS/1) gerando um total de 2592 híbridos.

Na etapa de investigação ao microscópio, na procura por híbridos, foram selecionados 587 híbridos para *screening* em função destes poços possuírem colônias em plena expansão, com células morfológicamente arredondadas, translúcidas e não-aderentes. Destes últimos, os híbridos MSC1-1 a MSC1-282, MSC2-1 a MSC2-200 e MSC3-1 a MSC3-105 foram selecionados como tendo provável atividade anti-CTM de coelho. A diferença entre os híbridos obtidos (2592) e os testados (587) corresponde aos poços cujos híbridos não foram viáveis por provável exclusão enzimática que envolve a técnica de hibridomas. Sabidamente, o mieloma múltiplo não secretor NS1 utilizado possui um gene hipermetilado que lhe confere a característica de ser Hipoxantina-Ribosina-Fosforibosil-transferase (HGPRT) negativo e que o impede de usar a via alternativa para a síntese de nucleotídeos enquanto que linfócitos B de camundongos imunizados possuem gene normal, com a característica de ser HGPRT positivo. O híbrido ideal é aquele que no momento da fusão guarda suas características HGPRT+ e usam a via alternativa. No dia seguinte da fusão, adicionou-se ao meio de cultura hipoxantina-aminopterin e timidina que obrigam as células a usarem a via alternativa. As células com gene hipermetilado são incapazes e morrem. Outra justificativa além da seleção enzimática genética para esta diferença entre híbridos construídos e testados fica por conta da habilidade técnica. Quanto mais agressiva for a obtenção das células esplênicas, maior a prevalência de fibroblastos na cultura. Os fibroblastos tornam o híbrido e futuro clone inviável economicamente e mesmo em termos de pesquisa. Os híbridos não podem ter a característica de

aderência em plástico para facilitar os processos de ampliação em *batch* de cultura, biorreatores ou pelo método de produção de líquido ascítico.

O método escolhido para testar os 587 híbridos com provável atividade anti-CTM foi a citometria de fluxo, método que também será utilizado na caracterização imunológica dos anticorpos produzidos. O resultado do *screening* inicial e dos três retestes daqueles identificados como “positivos”, significa que o sobrenadante de cultura contém uma imunoglobulina que se fixou na superfície das CTM de coelho. Após três retestes, seis híbridos foram selecionados como os híbridos retidos finais (Tabela 4). A cobertura de *screening* obtida mostrou-se satisfatória segundo Campbell, 1984⁸². O protocolo MSC1 obteve a maior cobertura de *screening*, e, conseqüentemente, o maior número de híbridos retidos.

Tabela 4. Eficiência das fusões celulares do protocolo MSC.

Fusões	Nº placas de 96 poços	Nº híbridos obtidos	Nº híbridos testados	Cobertura de <i>Screening</i>	Híbridos retidos finais
MSC-1	10	480	282	58,75%	3
MSC-2	8	480	200	41,66%	2
MSC-3	9	384	105	27,34%	1
Total	27	1344	587	43,67%	6

O último reteste foi realizado com anticorpos secundários tanto para IgG quanto IgM. O híbrido que obteve maior positividade para IgG, MSC1-160, foi selecionado para etapa de clonagem e amplificação dos clones e imunoglobulinas produzidas (Tabela 5).

Tabela 5. Híbridos obtidos e positividade para IgG e IgM no último reteste.

Híbrido	3º <i>Screening</i> para IgG	3º <i>Screening</i> para IgM
MSC1-132	-----	51,24%
MSC1-160	67,26%	0,38%
MSC1-193	46,11%	81,21%
MSC2-13	32,03%	82,78%
MSC2-91	56,30%	71,51%
MSC3-5	46,50%	79,16%

4.3 Clonagem celular

As clonagens por diluição limitante e micromanipulação tiveram por objetivo isolar apenas uma única célula em cada poço da placa de cultura, produzindo populações celulares homogêneas, derivadas de um clone único. Esta população monoclonal produzirá apenas um tipo de imunoglobulina, denominada agora anticorpo monoclonal. Estas populações foram testadas em citometria de fluxo para verificar a reatividade desejada contra CTMs de coelho. Com o *gate* celular definido, foram lidos no citômetro primeiramente o controle de autofluorescência e controle secundário. O controle de autofluorescência contém apenas células e tem por objetivo determinar a fluorescência natural da linhagem testada. O controle secundário tem além das células o anticorpo secundário IgG-FITC, porém sem o anticorpo primário (sobrenadante), a fim de garantir que os resultados nas análises posteriores sejam obtidos exclusivamente pela presença de IgGs no sobrenadante de cultura contra CTMs. O híbrido submetido à clonagem apresentou desempenho ideal, gerando ao todo 68 clones, mantidos em cultura e observados por aproximadamente 15 dias. Após crescimento exponencial e produção de imunoglobulinas em níveis detectáveis, novo teste de screening foi realizado para verificar a manutenção da especificidade da imunoglobulina secretada pelos clones. Dos 68 clones, 20 foram altamente positivos no screening, sendo então selecionados como produtores de anticorpos monoclonais com a especificidade desejada (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da clonagem realizada a partir do híbrido MSC1-160.

Método de Clonagem	Nº clones obtidos	Nº clones testados	Clones selecionados
Diluição Limitante	20	10	MSC1-160 A20, MSC1-160 A30, MSC1-160 A41, MSC1-160 A60, MSC1-160 A81
μ -Manipulação	48	10	MSC1-160 A47, MSC1-160 A55 MSC1-160 A55, MSC1-160 A63, MSC1-160 A82

4.4 Expansão dos clones secretores por produção de líquido ascítico

Os clones selecionados foram submetidos à expansão por meio da técnica de ascite, para obtenção de alta concentração das imunoglobulinas produzidas por estes.

A média de volume de líquido ascítico obtido foi de 13,7 mL, quantidade satisfatória para execução de experimentos posteriores, inclusive purificação do monoclonal, visto que além do volume a concentração de proteínas também foi relevante, perfazendo média de 28,4 mg/mL⁸² (Tabela 7). A produção de anticorpos monoclonais por indução de ascite fornece altas concentrações de imunoglobulinas, preserva propriedades moleculares, afinidade e especificidade do anticorpo, além de não requerer procedimentos de concentração, os quais podem desnaturar o anticorpo diminuindo sua efetividade. Deve-se ressaltar também que o método possui desvantagens, como as várias proteínas murinas e outros contaminantes presentes no líquido ascítico, exigindo purificação das amostras.

Tabela 7. Produção de anticorpos monoclonais por indução de ascite em camundongos BALB/c, volume de líquido ascítico produzido e dosagem de proteínas totais.

Identificação dos clones	Nº de animais	Volume obtido (mL)	Proteínas totais (mg/mL)
MSC1-160 A20	4	11,0	26,53
MSC1-160 A30	4	23,0	29,62
MSC1-160 A41	4	8,0	28,06
MSC1-160 A47	4	14,0	27,25
MSC1-160 A55	4	9,0	34,36
MSC1-160 A60	6	12,0	27,91
MSC1-160 A63	4	9,0	30,12
MSC1-160 A69	6	7,0	25,32
MSC1-160 A81	6	32,0	29,43
MSC1-160 A82	4	12,0	25,44

4.5 Controle eletroforético da monoclonalidade

Através das análises de eletroforese em gel de ágar dos AcMm selecionados foi possível determinar o número de espécies protéicas existente no líquido ascítico pré e pós-purificação por cromatografia de afinidade. A Figura 16 demonstra o perfil eletroforético pré-purificação, com presença do pico monoclonal (seta) e outras proteínas, evidenciando albumina (maior pico), em virtude de sua alta concentração no líquido ascítico. A eletroforese pós-purificação comprovou não apenas a origem monoclonal das imunoglobulinas, mas também a eficácia do método utilizado para purificação das amostras, exibindo somente a banda de gamaglobulinas. A análise por densitometria do clone MSC1-160 A63 aponta 20,9% de gamaglobulinas no pré-purificação, equivalente a 6,3mg/mL, e 100% no pós-purificação (Figura 17).

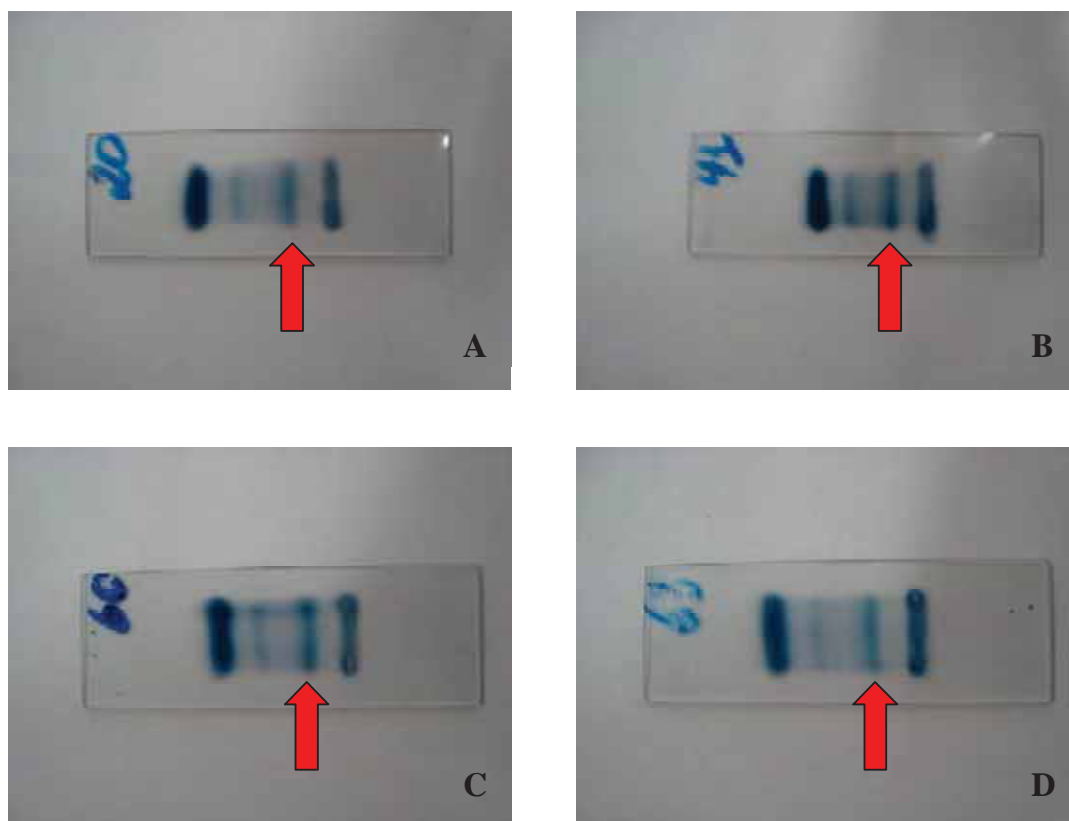


Figura 16. Eletroforese em gel de ágar a 1% em lâmina de vidro, pré-purificação. As setas indicam o pico de gamaglobulina de interesse. Líquido ascítico dos clones **A** MSC1-160 A20, **B** MSC1-160 A41, **C** MSC1-160 A60 e **D** MSC1-160 A63.

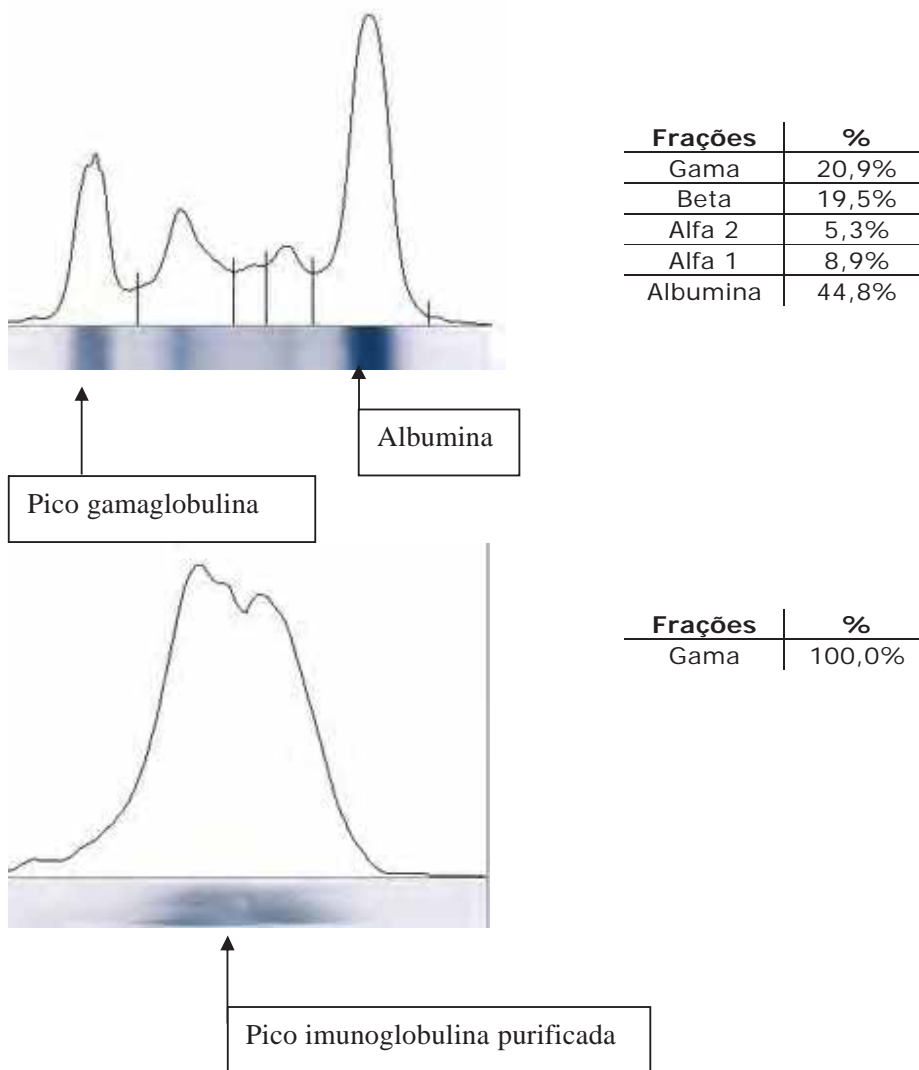


Figura 17. Análise por densitometria das eletroforeses pré e pós-purificação do clone MSC1-160 A63.

4.6 Determinação de classe e subclasse de imunoglobulinas

Foi realizada a determinação de classe e subclasse dos 10 clones selecionados com alta reatividade anti-CTM em citometria de fluxo. Todas as imunoglobulinas são da classe IgG₁ (apenas) e apresentaram cadeia leve *kappa* (Tabela 8). Tal fato é plenamente satisfatório, não apenas por confirmar a origem monoclonal das imunoglobulinas produzidas, mas por demonstrar

que todas pertencem à classe IgG, a mais utilizada e adequada para testes em citometria de fluxo. O método utilizado se mostrou eficiente e rápido para determinação simultânea de classe e subclasse de anticorpos monoclonais, o qual utiliza pouca quantidade de amostra, não requer que as células estejam em cultura e permite o processamento de várias amostras concomitantemente com alta sensibilidade.

Tabela 8. Determinação de classe e subclasse dos anticorpos monoclonais.

Identificação do clone	Classe e subclasse
MSC1-160 A20	IgG ₁ -k
MSC1-160 A30	IgG ₁ -k
MSC1-160 A41	IgG ₁ -k
MSC1-160 A47	IgG ₁ -k
MSC1-160 A55	IgG ₁ -k
MSC1-160 A60	IgG ₁ -k
MSC1-160 A63	IgG ₁ -k
MSC1-160 A69	IgG ₁ -k
MSC1-160 A81	IgG ₁ -k
MSC1-160 A82	IgG ₁ -k

Na Figura 18 está representado o gráfico de *dot plot* do *software Cell Quest* (BD Biosciences™) da análise de classe e subclasse do clone MSC1-160 A81.

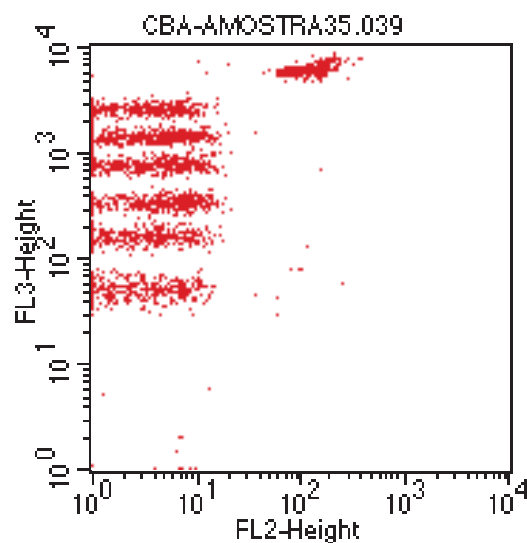


Figura 18. Determinação de Classe e Subclasse de Imunoglobulinas murinas pelo método CBAFlow (BD Biosciences®). Gráfico dot plot indicando presença de imunoglobulinas IgG1 de cadeia leve kappa.

4.7 Purificação das imunoglobulinas por imunoafinidade à proteína A Sepharose

Imunoglobulinas murinas interagem especificamente com proteína-A ligando-se pela região Fc. Esta proteína A é proveniente de polipeptídeo isolado de células de *S. aureus*, ela se acopla ao anticorpo e liga-se a um suporte estacionário tipo agarose ou sepharose. É considerado excelente reagente para isolar complexos imunes, imunoglobulinas e fragmentos Fc e Fab. A ligação Proteína – Ac é reversível com uso de agentes desnaturantes ou abaixamento do pH.

O equipamento ÄKTA-PRIME-GE® garantiu com excelência e qualidade um maior rendimento das imunoglobulinas monoclonais após processo de purificação, minimizando o tempo de procedimento e melhora no desempenho pela automação em função de sua reprodutibilidade. Utilizou-se o programa de purificação baseado no gradiente de pH e colunas *Hi-Trap Protein-A* (GE®).

Todos os anticorpos monoclonais foram purificados a partir de líquido ascítico por cromatografia de afinidade. A Figura 19 mostra o resultado das purificações dos clones MSC1-160 A63, MSC1-160 A55, MSC1-160 A41 e MSC1-160 A20, respectivamente.

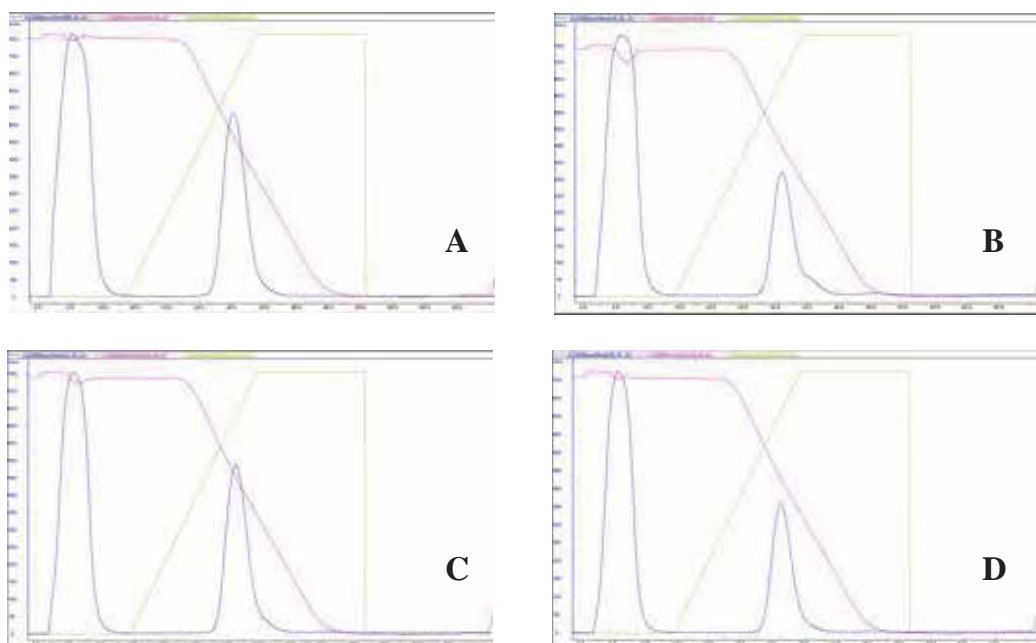


Figura 19. Gráficos de leitura do aparelho AKTA-PRIME® durante as purificações de líquido ascítico dos clones **A** MSC1-160 A63, **B** MSC1-160 A55, **C** MSC1-160 A41 e **D** MSC1-160 A20, todos da subclasse IgG₁.

Cada purificação rendeu de quatro a cinco ampolas de 2mL de imunoglobulinas purificadas para cada clone. Através do aparelho NanoDrop® ND-1000 foi determinada a concentração de proteínas totais das purificações. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos para as ampolas mais concentradas de cada clone.

Tabela 9. Concentração protéica das frações de líquido ascítico purificadas.

Clone	mg/mL
MSC1-160 A20	2,41
MSC1-160 A30	0,94
MSC1-160 A41	3,78
MSC1-160 A47	1,19
MSC1-160 A55	2,59
MSC1-160 A60	2,30
MSC1-160 A63	4,46
MSC1-160 A81	0,86
MSC1-160 A82	2,00

4.8 Validação dos anticorpos monoclonais por citometria de fluxo

Foi analisado o desempenho dos anticorpos monoclonais produzidos pela técnica de citometria de fluxo. Amostras purificadas dos 10 anticorpos foram testadas contra CTMs de medula óssea de coelho, CTMs de tecido adiposo de coelho e CTMs de tecido adiposo humano.

Na citometria de fluxo contra CTMs de medula óssea de coelho verificou-se significativa reatividade contra as células testadas, resultado condizente com os apresentados nos *screenings* anteriores, para os 10 anticorpos, com pequena queda nos valores (Tabela 10). Tal decréscimo pode ser explicado pela concentração de anticorpos nas amostras purificadas utilizada, 1mg/mL, possivelmente menor do que as utilizadas nos *screenings*. A Figura 20 apresenta o histograma obtido na análise por citometria de fluxo do anticorpo MSC1-160 A69 contra esta população celular.

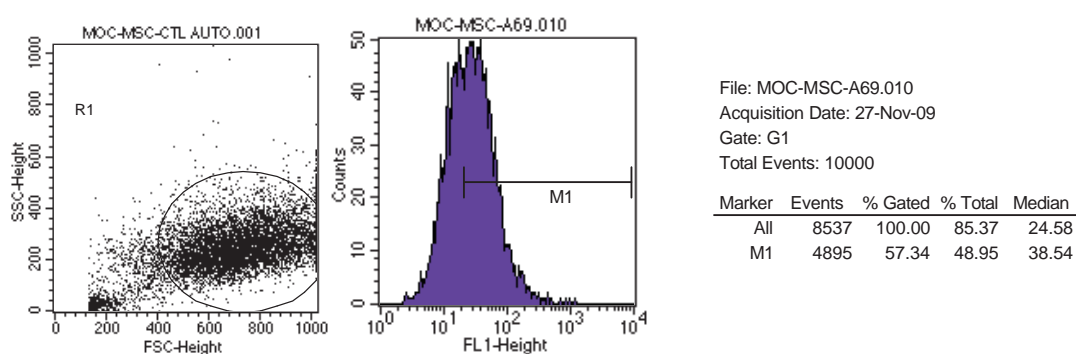


Figura 20. Análise do controle de autofluorescência e definição do gate celular com CTMs de medula óssea de coelho. Histograma do resultado obtido pelo clone MSC1-160 A69.

Os resultados da citometria de fluxo dos anticorpos testados contra CTMs de tecido adiposo de coelho foram positivos, ou seja, todos os 10 anticorpos apresentaram reatividade contra esta população celular, com destaque para o anticorpo MSC1-160 A30 (Tabela 10). A Figura 21 apresenta o histograma da análise realizada com o clone MSC1-160 A30.

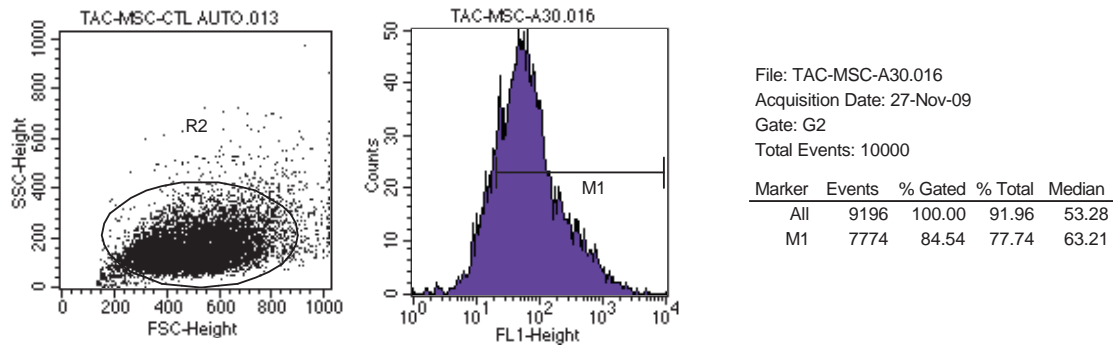


Figura 21. Análise do controle de autofluorescência e definição do gate celular com CTMs de tecido adiposo de coelho. Histograma do resultado obtido pelo clone MSC1-160 A30.

A análise realizada com CTMs de tecido adiposo humano indicou pouca reatividade dos anticorpos contra esta população celular, com padrão de reconhecimento variando entre 5,37% e 29,82% (Tabela 10).

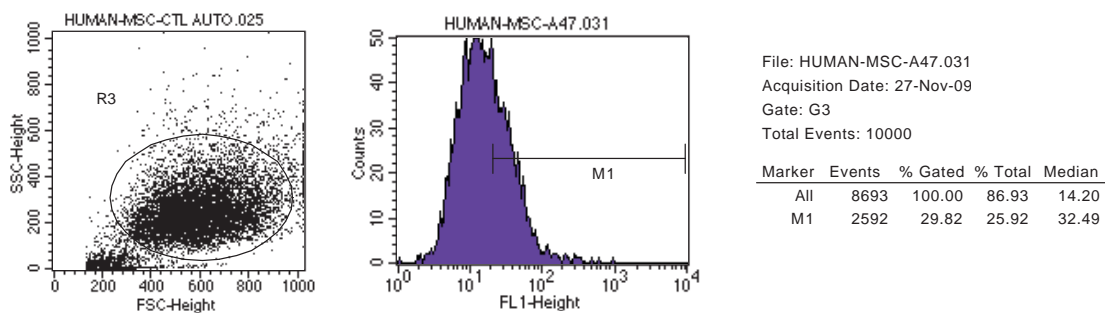


Figura 22. Análise do controle de autofluorescência e definição do gate celular com CTMs de tecido adiposo humano. Histograma do resultado obtido pelo clone MSC1-160 A47.

Tabela 10. Desempenho dos anticorpos monoclonais frente a diferentes populações celulares.

AcMm	CTM-MO coelho	CTM-TA coelho	CTM-TA humano
MSC1-160 A20	39,63	70,44	16,17
MSC1-160 A30	53,83	84,54	5,37
MSC1-160 A41	41,3	60,63	13,98
MSC1-160 A47	37,26	68,16	29,82
MSC1-160 A55	40,7	56,67	10,98
MSC1-160 A60	42,26	44,32	17,12
MSC1-160 A63	50,52	52,33	16,7
MSC1-160 A69	57,34	78,88	16,96
MSC1-160 A81	39,52	54,59	5,71
MSC1-160 A82	36,95	55,6	12,96

No Gráfico 2 estão representados em comparação os padrões de reconhecimento dos anticorpos monoclonais frente às diferentes populações celulares.

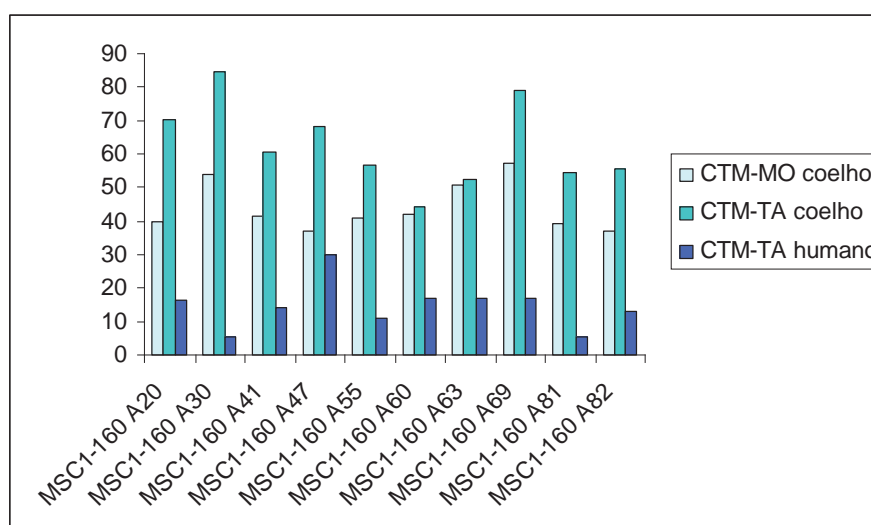


Gráfico 2. Análise comparativa dos anticorpos monoclonais frente a diferentes populações celulares. Os padrões de reconhecimento estão representados em porcentagem.

Os resultados obtidos indicam que os anticorpos monoclonais produzidos apresentam alto padrão de reconhecimento para CTMs de coelho, provenientes tanto de medula óssea quanto tecido adiposo, enquanto apresentam menor padrão de reconhecimento para CTMs de tecido adiposo humano. A diferença entre os valores obtidos pode ser resultante de uma série de fatores

interferentes nas análises: espécie animal da população celular, variação entre espécies na expressão dos antígenos de superfície, presença de células estromais da medula, entre outros. No quesito especificidade, a análise destaca os anticorpos monoclonais MSC1-160 A30 e MSC1-160 A81, apresentando alto padrão de reconhecimento para CTMs de coelho e reatividade muito baixa para CTMs humanas.

5. CONCLUSÕES

- Foi possível isolar e estabelecer culturas de células-tronco mesenquimais de coelho.
- Foi demonstrado que, apesar da medula óssea ser a fonte mais utilizada para obtenção de CTMs, populações celulares semelhantes provenientes do tecido adiposo apresentam taxas de crescimento e proliferação significativamente maiores, diminuindo o tempo necessário para a realização do trabalho bem como os custos envolvidos.
- Foram produzidos hibridomas secretores de anticorpos contra células-tronco mesenquimais de coelho.
- Dos 10 clones produzidos todos tiveram a determinação do isótipo por citometria de fluxo e foram purificados e caracterizados.
- Todos os anticorpos monoclonais produzidos pertencem à classe IgG, à subclasse IgG₁ e apresentam cadeia leve *kappa*.

- Foi possível demonstrar a aplicabilidade de todos os AcMm produzidos através dos ensaios em citometria de fluxo contra diferentes populações de células-tronco, técnica mais utilizada na caracterização imunofenotípica de linhagens celulares em pesquisa.
- Oito dos AcMm produzidos apresentaram reação cruzada com células-tronco de tecido adiposo humano, enquanto os AcMm MSC1-160 A20 e MSC1-160 A81 apresentaram reatividade quase que exclusiva à CTMs de coelho.

6. PERSPECTIVAS

Pretende-se conjugar os anticorpos monoclonais produzidos com o corante fluorescente FITC para utilização em imunofluorescência indireta e citometria de fluxo sem a necessidade de anticorpos secundários na reação. Os AcMm produzidos deverão ainda ser testados contra um maior número de diferentes populações celulares, a fim de avaliar a especificidade contra células-tronco mesenquimais apenas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Mol Med* **8(3)**, 301-316 (2004).
2. Guillot, P.V., Cui, W., Fisk, N.M. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *Cell Mol Med* **11**, 935-944 (2007).
3. Herzog, E.L., Chai, L., Krause, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* **102**, 3483-3493 (2003).
4. Deans, R.J., Moseley, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* **28**, 875-884 (2000).
5. Ito, T., Suzuki, A., Okabe, M., Imai, E., Hori, M.. Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology. *Exp Nephrol* **9**, 444-450 (2001).
6. Neuhuber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A., Fischer, I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *Neurosci Res* **77**, 192-204 (2004).
7. Horwitz, E. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393-395 (2005).
8. Meirelles, L. da S., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204-2213 (2006).

9. Ratajczak, M.Z. Bone-marrow derived stem cells--our key to longevity? *Appl Genet* **48**, 307-319 (2007).
10. Schäffler, A., Büchler, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* **25**, 818-827 (2007).
11. 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).
12. 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).
13. Bocelli-Tyndall, C. *et al.* Human articular chondrocytes suppress *in vitro* proliferation of anti-CD3 activated peripheral blood mononuclear cells. *J. Cell Physiol.* **209**, 732-734 (2006).
14. Jones, S., Horwood, N., Cope, A. & Dazzi, F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J. Immunol.* **179**, 2824-2831 (2007).
15. Haniffa, M. A. *et al.* Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J. Immunol.* **179**, 1595-1604 (2007).
16. Parsonage, G. *et al.* A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* **26**, 150-156 (2005).
17. Augello, A. *et al.* Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1482-1490 (2005).
18. Krampera, M. *et al.* Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**, 386-398 (2006).
19. Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M. & Mahon, B. P. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 353-363 (2007).
20. Spaggiari, G. M. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111**, 1327-1333 (2008).
21. Ren, G. *et al.* Mesenchymal stem-cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* **2**, 141-150 (2008).
22. Morandi, F. *et al.* Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class-I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells* **26**, 1275-1287 (2008).
23. Raffaghello, L. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* **26**, 151-162 (2008).

24. Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815–1822 (2005).
25. Djouad, F. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* **25**, 2025–2032 (2007).
26. Ucelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature* **8**, 726-736 (2008).
27. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74 (1997).
28. Allers, C., Sierralta, W.D., Neubauer, S., Rivera, F., Minguell, J.J., Conget, P.A. Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* **78**, 503-508 (2004).
29. Devine, S.M., Cobbs, C., Jennings, M., Barthlomew, A., Hoffman, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into non human primates. *Blood* **101**, 2999–3001 (2003).
30. Pereira, R.F., Halford, K.W., O'hara, M.D., Leeper, D.B., Sokolov, B.P., Pollard, M.D., *et al.* Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4857-4861 (1995).
31. Piersma, A.H., Ploemacher, R.E., Brockbank, K.G. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Haematology* **54**, 285–290 (1983).
32. Ucelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* **36**, 2566-2573 (2006).
33. Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C. & Guinan, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* **75**, 389–397 (2003).
34. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48 (2002).
35. Le Blanc, K. *et al.* Treatment of severe acute graftversus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**, 1439–1441 (2004).
36. Minguell, J.J., Erices, A. Minireview: Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med* **231**, 39-49 (2006).
37. Urbán, V.S., Kiss, J., Kovács, J., Gócza, E., Vas, V., Monostori, É., *et al.* Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* **26**, 244-253 (2008).
38. Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D., Shimizu, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type1. *The Journal of Immunology* **180**, 2581-2587 (2008).

39. Dove, A.W. Stem cells to build muscles. *The Journal of Cell Biology* **160**(6), 803 (2003).
40. Phinney, D.G., Prockop, D.J. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902 (2007).
41. Hamada, H., Kobune, M., Nakamura, K. Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci* **96**(3), 149-156 (2005).
42. Jorgensen, C., Djouad, F., Apparailly, F., Noel, D. Engineering mesenchymal stem cells for immunotherapy. *Gene Ther* **10**(10), 928-931 (2003).
43. Prockop, D.J. Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *Cell Biology* **160**(6), 807-809 (2003).
44. Reiser, J., Zhang, X-Y., Hemenway, C.S., Mondal, D., Pradhan, L., Russa, V.F.L. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Ther* **5**(12), 1571-1584 (2005).
45. Almeida-Porada, G., Porada, C. D., Tran, N. & Zanjani, E. D. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* **95**, 3620–3627 (2000).
46. Orlic, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701–705 (2001).
47. Bartholomew, A. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48 (2002).
48. Li, Y. *et al.* Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* **59**, 514–523 (2002).
49. Djouad, F. *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* **102**, 3837–3844 (2003).
50. Togel, F. *et al.* Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **289**, F31–F42 (2005).
51. Zappia, E. *et al.* Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106**, 1755–1761 (2005).
52. Lee, R. H. *et al.* Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 17438–17443 (2006).

53. Gerdoni, E. *et al.* Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* **61**, 219–227 (2007).
54. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R. & Pennesi, G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 1175–1186 (2007).
55. Inoue, Y. *et al.* Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* **85**, 234–241 (2007).
56. Ortiz, L. A. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 11002–11007 (2007).
57. Gupta, N. *et al.* Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol.* **179**, 1855–1863 (2007).
58. Imberti, B. *et al.* Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2921–2928 (2007).
59. Mirotsov, M. *et al.* Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**, 1643–1648 (2007).
60. Parekkadan, B. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS ONE* **2**, e941 (2007).
61. Urban, V. S. *et al.* Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* **26**, 244–253 (2008).
62. Djouad, F. *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* **102**, 3837–3844 (2003).
63. Karnoub, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* **449**, 557–563 (2007).
64. Bernardo, M. E. *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term *in vitro* culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res.* **67**, 9142–9149 (2007).
65. Zola, H. Monoclonal antibodies: scope and limitations. *Monoclonal Antibodies: The Second Generation* **1**, 02-10 (1995).
66. Hudson, P.J., Souriau, C. Engineered antibodies. *Nat Med* **9**, 129-134 (2003).
67. Stome, S.E., Sausville, E.A., Mann, D. A mechanism perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *The Oncologist* **12**, 1084-1095 (2007).

68. Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies. Institute of Laboratory Animal Research. National Research Council. Monoclonal Antibody Production. Washington: National Academy Press; 1999. p.1-40.
69. Catty, D. Properties of antibodies and antigens. *Antibodies: A Practical Approach* **1**, 10-18 (1988).
70. Harlow, E., Lane, D. Monoclonal antibodies. *Antibodies: A Laboratory Manual* **1**, 139-147 (1988).
71. 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 isotópico IgG₁-FITC para uso em citometria de fluxo. *Rev Brás Hematol Hemoter* **29**, 361-368 (2007).
72. Köhler, G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256(7)**, 495-497 (1975).
73. Deffune, E. Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Intérêt en immunohématologie. Paris: Université Pierre et Marie Curie, 1992.
74. Javazon, E.H., Colter, D.C., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* **19**, 219-25 (2001).
75. Phinney, D.G., Kopen, G., Isaacson, R.L., Prockop, D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: Variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* **72**, 570-85 (1999).
76. Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sariboyaci, A.E., Kaymaz, F., Kasap, M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol*, 2009.
77. World Health Organization (2006). "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). Proposed INN: List 95" (PDF). *WHO Drug Information* **20** (2): 48. http://whqlibdoc.who.int/druginfo/20_2_2006_INN95.pdf
78. Freshney, R.I. Cloning and Selection. In: Freshney RI, editor. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: Wiley-Liss; 195-197 (2000).
79. Goding, J.W. Use of *Staphylococcus* protein A as an immunological reagent. *J Immunol Methods* **20**, 241-253 (1978).
80. Langone, J.J., Protein A *Staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. *Adv Immunol* **32**, 157-252 (1982).
81. Freshney, R.I. Purifying antibodies. In: Freshney RI, editor. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: Wiley-Liss; 2000. p. 288-312.

82. De Geus, B., Hendriksen, C.F.M. In vivo production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives. *Res Immunol* **119**, 533-534 (1998).