



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

PÂMELA LEITE DA SILVA

DIFICULDADES NO PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE
IMUNOSSENSOR PARA TIPAGEM SANGUÍNEA ABO

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune
Coorientadora: Profa. Dra. Marli Leite de Moraes

BOTUCATU

2021

PÂMELA LEITE DA SILVA

**DIFICULDADES NO PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE
IMUNOSSENSOR PARA TIPAGEM SANGUÍNEA ABO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune
Coorientadora: Profa. Dra. Marli Leite de
Moraes

BOTUCATU

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Pâmela Leite da.

Dificuldades no processo de construção de imunossensor para tipagem sanguínea ABO / Pâmela Leite da Silva. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Elenice Deffune

Coorientador: Marli Leite de Moraes

Capes: 90400003

1. Biossensores. 2. Tipagem e reações cruzadas sanguíneas. 3. Hemaglutinação. 4. Técnicas de laboratório clínico.

Palavras-chave: Imunossensor; Lab on a chip; Point of care; Sensores eletroquímicos; Tipagem sanguínea.

Pâmela Leite da Silva

**DIFICULDADES NO PROCESSO DE CONSTRUÇÃO DE IMUNOSENSOR
PARA TIPAGEM SANGUÍNEA ABO**

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

Orientador: Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune

Comissão examinadora

Prof(a). Dr(a) Juliane Campos
Universidade Unoeste

Prof. Dr. Newton Key Hokama
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Prof(a). Dr(a) Elenice Deffune
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, _____ de _____ de _____.

Dedicatória

À Deus, que é meu tudo, meu descanso e minha força;

À Nossa Senhora, minha fiel intercessora;

Aos meus pais, minha base e inspiração, que acreditaram em mim, quando eu mesma não acreditei;

Aos meus avós, que são um exemplo de superação e mesmo humildes, carregam consigo uma sabedoria sem igual.

Agradecimentos

À **Deus**, que é o Dono da minha vida, ao qual confio todos os meus passos. É quem me conforta nos momentos de solidão e o que me dá forças todos os dias para continuar lutando. É Dele todas as coisas e todas as conquistas da minha vida, pois antes de eu sonhar, Ele já havia escrito toda a minha história.

Aos **meus pais Jânio e Cláudia**, que são o verdadeiro sentido do amor e nunca mediram esforços para realizar todos os meus sonhos. Que trabalharam incansavelmente para que eu e meus irmãos tivéssemos educação de qualidade e nos educaram com todo amor do mundo, para que pudéssemos ser adultos de bem. À vocês pai e mãe, que não possuem ensino de nível superior, dedico não só a minha graduação, mas todas as especializações e este título de mestre, pois vocês são a minha maior escola.

Aos **meus avós, Ivanir e José Aluísio**, ao qual eu não tenho nem palavras para agradecer, pois mesmo sendo humildes e tendo escolaridade mínima, nos ensinaram o mais valioso: sermos pessoas honestas e batalhadoras. Obrigada por sempre me apoiarem em toda essa jornada, por ficarem preocupados se eu levei almoço ou se eu tomei chuva. À vocês também dedico esse título.

Aos **meus irmãos, Carolina e Lucas**, que mesmo sendo mais novos, estão também trilhando seus caminhos profissionais e são pessoas maravilhosas, por sempre torcer por mim e me apoiar.

À **toda minha família**: tios, tias, primos e primas; que sempre me apoiaram e sempre comemoraram cada conquista. As minhas conquistas são nossas!

À **Profª Drª Elenice Deffune**, não apenas minha orientadora, mas sim minha segunda mãe. Aquela que me acolheu de uma forma tão materna e tornou toda essa trajetória mais leve e cheia de amor. Não tenho palavras para descrever o meu eterno agradecimento à senhora Dra. Hoje, não tenho apenas um título, mas com certeza sou um ser humano melhor graças a senhora, que é um exemplo de caráter e de pessoa! Sempre me teve como filha, me acalmou nos dias difíceis e comemorou cada vitória como se fosse um bebê dando seus primeiros passos. Acho que hoje já aprendi a andar, mas ainda tenho um longo caminho à correr pela frente e exijo sua presença nele.

À **Profª Drª Marli Leite de Moraes**, minha co-orientadora, que me ajudou a entender melhor o universo de imunossensores que é tão complexo e difícil. Obrigada pela paciência.

À **Ondina Silva Cotrim**, que me acolheu com muito amor e carinho e sempre cuidou de mim. Que puxou minha orelha quando eu precisei, mas também me deu forças pra continuar. Muito obrigada por tudo Ondina!

À **todos do laboratório de Biologia celular**: Ednelson, Jessica, Ananda, Aruã, Juliana, Ana Livia William, Suelen, Fernando, Alba, Carolina, Giulia, Pedro e Ana

Paula que não mediram esforços em me ajudar. Vocês são mais que colegas de trabalho, são família.

Ao **William Alberto Leonel Ferreira**, que embora esteja a pouco tempo no laboratório, sempre esteve pronto e disposto a me ajudar. Muito obrigada por todo apoio e por me incentivar. Obrigada pelas ajudas com os gráficos, pelas nanopartículas e por ficar horas e horas me ajudando com as leituras. O meu mestrado se encerra aqui mas continuaremos firmes no seu doutorado!

À **Carolina Carnetta**, que embora seja apenas uma aluna de TCC, se dispôs à me ajudar! E como ajudou! Muito obrigada Carol!

À **Ananda Lini Vieira** que é mais que uma colega de trabalho, é uma irmã. Obrigada por sempre me impulsionar e por sempre ouvir meus desabafos e choros. Obrigada por sempre acreditar em mim quando eu mesma não acreditava. Obrigada por todas as ciladas enfrentadas juntas e por todas as risadas que isso renderam. Com certeza você foi um anjo de Deus enviado à mim para me ajudar nessa caminhada! Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão.

Ao **Alexandre Giannecchini Romagnolo**, que junto com a Dr^a inicializaram o início desse projeto e que desde o TCC da minha especialização me ajudou e me apoiou. Você não está mais aqui no laboratório, mas mesmo à distância me ajuda sempre que preciso. Obrigada Ale!

À **Ana Lívia Bovolato** por me ensinar um pouco mais sobre sensores e sempre se dispor a me ajudar. Obrigada pelos anos de amizade, por me ouvir sempre e mesmo à distância se importar comigo. Obrigada por tudo Ana!

Às minhas veteranas, **Laís De Santis, Mariane Risso e Thays Netto**, que não me deixaram só aprendizados, mas sim um legado! Vocês são meus exemplos de profissionais e seres humanos. Eu amo vocês e sinto muita saudade de ter vocês por perto. Tenho orgulho de quem se tornaram e por me darem esses sobrinhos postiços lindos que a tia babona aqui ama muito (Gael e Theodoro)

À **Thaís Carolina de Oliveira**, essa baixinha que é uma gigante, que foi um porto seguro sempre que eu precisei. É uma profissional incrível e uma amiga maravilhosa, onde Deus, em Seu infinito amor por mim, me enviou mais uma anja em minha vida. Obrigada por sempre ceder sua casa quando eu precisava dormir em Botucatu e por todo carinho e amor que cuidou de mim durante todo esse tempo. E claro, obrigada por esse sobrinho postiço lindo (Lorenzo).

Ao **Laboratório de Biologia Molecular** por permitir o uso do Nanodrop®.

À **nChemi Engenharia de Materiais LTDA**, pela doação das nanopartículas

Ao **Hemocentro de Botucatu**, em especial o Laboratório de Imunohematologia de Doadores, o Laboratório de Hemocomponentes Lábeis e a Agência Transfusional por disponibilizarem as amostras de sangue.

À **todos os doadores de sangue** por disponibilizarem amostras de sangue para que esse projeto pudesse ser realizado.

À **Isabelle Rosa**, por todo aprendizado e por todo apoio desde a especialização. Muito do que eu sei de hemoterapia eu devo à você! Obrigada Isa.

À **Patrícia Carvalho Garcia** e a todos da Agência Transfusional e Laboratório de Imunohematologia de Pacientes e Perinatal (Sandra Maria Picelli) pela minha formação em hemoterapia.

Resumo

Os antígenos ABO são carboidratos adicionados à superfície da membrana das hemácias, que conferem o tipo A, B, AB ou O aos indivíduos. Pelo fato do organismo humano produzir naturalmente anticorpos regulares contra antígenos desse sistema, ele se torna o mais importante na prática transfusional. Entre os testes pré-transfusionais, destaca-se a fenotipagem do sistema ABO/Rh, (fase direta e reversa da tipagem sanguínea). Tal técnica baseia-se na hemaglutinação, com leitura subjetiva e sem interfaceamento digital. Com os avanços das metodologias de *Point of Care* e *Lab on a Chip*, biossensores são desenvolvidos para modernizar e otimizar técnicas manuais como essas. Dentre estes, destaca-se neste trabalho o imunossensor, que se baseia na ligação antígeno- anticorpo, detectada por um transdutor e convertida em informação digital. O objetivo deste trabalho é a construção de um imunossensor para tipagem sanguínea ABO. Foram utilizados anticorpos anti- A e - B monoclonais produzidos *home made* e policlonais purificados de plasma de bolsa de descarte, na concentração de 0,05mg/mL, que compuseram a molécula biorreceptora do imunossensor, fixados à superfície do eletrodo de carbono pelo polímero quitosana. A espectrofotometria UV-visível foi utilizada para monitoramento de construção do filme. As amostras analisadas foram de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu, que foram previamente fenotipadas conforme protocolo de doação em A, B e O. A técnica de construção do filme polímero + anticorpos foi a de automontagem por *Layer-by-Layer*, (*LbL*) que permite obter filmes finos compostos de anticorpos e polímeros, por adsorção física. O tempo de exposição da amostra sobre o imunossensor inicialmente foi de 5, 15 e 30 minutos e submetidas à medidas eletroquímicas e comparadas com sistemas controle positivo e negativo. Dadas as análises, os tempos de incubações passaram a ser de 1, 2,3,4 e 5 minutos. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para caracterizar os filmes, monitoramento de cada camada depositada e para detecção de diferentes amostras de sangue. A absorção de luz em espectrofotometria na região UV-vis demonstrou que o número ideal de bicamadas para a composição do filme é de 2 bicamadas para o anti-B. Para o anti-A os resultados não foram conclusivos, embora a adsorção de luz fosse maior com 3 bicamadas, não houve pico de adsorção. Foi adotado então o número de duas bicamadas pra ambos os filmes dos dois anticorpos, para uso de anticorpos monoclonais. Os anticorpos policlonais foram funcionalizados com nanopartículas de ferro, à qual propiciaram o uso de uma única bicamada do filme. As leituras em Voltametria cíclica com o eletrodo Quitosana + Anti-A monoclonal demonstrou um alto potencial de especificidade com a hemácia A, quando incubados com a hemácia A e B por 5 minutos. Acima desse período observou a inespecificidade do imunossensor. Com o sensor contendo Quitosana + Anti-B monoclonal os resultados não foram conclusivos, pois as análises de comportamento das curvas de voltamograma e as áreas dos mesmos não demonstraram diferenças entre as análises com hemácias A e B em todos os tempos analisados. Os eletrodos Quitosana + Anti-A e Anti-B policlonais funcionalizados com nanopartículas de ferro, tanto nos testes de especificidade, quanto no de reprodutibilidade não demonstraram diferenças em amostras específicas e inespecíficas. Um dos principais problemas em potencial são os resquícios de albumina na purificação dos anticorpos que possam influenciar nas leituras e ser depositados de forma inespecífica sobre o filme. Além disso, a hipótese de que a hemácia é atraída quimicamente pela quitosana pode ser um dos fatores que influenciaram os resultados. Entretanto, pode-se afirmar que as nanopartículas permitiram uma melhor fixação de anticorpos da classe IgM em eletrodos impressos de carbono, o que era um grande desafio para construção desse biossensor. Diante disso, constata-se o grande potencial da produção de imunossensores para identificação do grupo sanguíneo ABO, sendo necessários ajustes para que o sistema se torne específico e reprodutivo.

Palavras-chave: Imunossensor, tipagem sanguínea, *point of care*, *lab on a chip*.

Abstract

The ABO antigens system is composed by carbohydrates added to the red blood cells' membrane, which includes four blood types known as A, B, O and AB, in humans. Due to the human organism natural production of regular antibodies against this system, it became the most important transfusion practice. Between pre-transfusion tests, it can be highlighted both ABO and Rh phenotyping (direct and reverse phase of blood typing). This technique is based on hemagglutination, with subjective reading and without digital interfacing. With advances on Point of Care and Lab on a Chip methodologies, biosensors have been developed in order to modernize and optimize manual techniques, such as those mentioned. Among this new technology, the immunosensors stand out, which is based on the bond and affinity between an antigen and its respective antibody, that can be detected through a transducer and the information is converted in digital data. The main goal of this research is to construct an immunosensor that recognizes and identifies which blood type group from ABO system. Here are going to be used monoclonal antibodies anti-A and anti-B, home-made produced, and purified polyclonal antibodies from disposal bag's plasma, in 0,05mg/mL concentration, which both composes the immunosensor's bioreceptor molecule, fixed against the carbon electrode's surface by the polymer chitosan. In order to monitor the film construction, the UV-visible spectrophotometry was used. The analyzed samples were from blood donors from Botucatu Hemocenter, which were all previously phenotyped according to donation protocol in A, B and O blood types. For the film made of polymer and antibodies construction, the technique used was self-assembly Layer-by-Layer (LbL), which allows the achievement of fine films with the required composition, through physic adsorption. The time of samples' exposure over the immunosensors was initially of 5, 15 and 30 minutes, and they were subject to electrochemical measures and compared to both positive and negative control systems. Given the analyses made, the incubation times became 1, 2, 3, 4 and 5 minutes. The cyclic voltammetry technique was applied to distinguish the films, while monitoring each deposited layer, and also to detect different blood type samples. The light absorption in UV-vis spectrophotometry showed that the ideal number of bilayers for the film construction was 2 bilayers of anti-B. The results about anti-A film construction were inconclusive, even though the light adsorption was higher with 3 bilayers, there were no adsorption peak. Accordingly, it was used the number of 2 bilayers for both antibodies film construction. Polyclonal antibodies were functionalized with Fe nanoparticles, which propitiated the use of only one film bilayer. The reading obtained with cyclic voltammetry and chitosan-monoclonal Anti-A electrode showed a high specificity potential with the red blood cell A, when both cell A and B were incubated for five minutes. Above this period of time, it was seen an immunosensor nonspecificity. About the sensor containing chitosan and monoclonal Anti-B the results were not conclusive, since the analyses' behavior of voltogram curves and the respective graphic area did not show differences between the tests with red blood cell A and B during all used times. Both electrodes with chitosan- polyclonal Anti-A and polyclonal Anti-B functionalized with iron nanoparticles did not show differences in specific and nonspecific samples, during specificity and reproducibility tests. One of the most important potential errors is the albumin remnants during the antibodies purification, that are able to disturb the readings and end up settling nonspecifically above the film. Other than that, the hypothesis that the red blood cell is chemically attracted to the chitosan can be a factor that might influence the results. Nevertheless, it can be assured that the nanoparticles allowed a better fixation the IgM antibodies on printed carbon electrodes, which was a huge challenge during this biosensor construction. In spite of that, it was found the immunosensors production's great potential for identification of ABO blood types system, even though some adjusts are necessary in order to turn the system specific and reproducible.

Key-words: Immunosensor, blood typing, point of care, lab on a chip.

Lista de Ilustrações

Figura	Nome	Pag.
Figura 1	<i>Timeline</i> da evolução da tecnologia de tipagem sanguínea ABO utilizadas na rotina transfusional	20
Figura 2	Representação esquemática da estrutura da IgM	24
Figura 3	Representação esquemática do escalonamento de bancada para a obtenção de sobrenadante de cultura	28
Figura 4	Representação esquemática de 2 tipos de biossensores eletroquímicos	37
Figura 5	Ilustração de voltamograma	39
Figura 6	Esquema representativo da identificação de SNC de especificidade anti-A e anti-B	43
Figura 7	Densidade óptica com comprimento de onda de 280nm da solução de anti-A e anti-B em meio albuminoso e do sobrenadante da reação com hemácias específicas e não específica	55
Figura 8	Estudo eletroforético em acetato de celulose, dos anticorpos monoclonais purificados, em 3 etapas diferentes	58
Figura 9	Espectro de absorvância do anticorpo purificado em 280nm.	59
Figura 10	Espectro de adsorção do filme de Quitosana (preto) e anti-A (diferentes cores) e do filme Quitosana/anti-A 3 bicamadas (Azul), comprimento de onda de excitação em 280nm	60
Figura 11	Valores de absorvância em 280nm <i>versus</i> número de bicamadas analisadas: anti-A	61
Figura 12	Espectro de adsorção do filme de Quitosana (Preto) e anti-B (diferentes cores) e Quitosana/anti-B 2 bicamadas (Mostarda), comprimento de onda de excitação em 280nm	61
Figura 13	Valores de absorvância em 280nm <i>versus</i> número de bicamadas analisadas: anti-B	62
Figura 14	Voltamogramas das leituras dos imunossensores	64
Figura 15	Representação Esquemática da bioquímica dos grupos sanguíneos ABO	67
Figura 16	Leitura em microscopia óptica (20X) das reações de filme contendo quitosana e hemácias A e B	68
Figura 17	Leitura em microscopia óptica (20X) das lâminas contendo filme de bicamadas de quitosana + anti-B submetidas à incubação em diferentes tempos com hemácias A e B	71

Lista de Quadros

Quadro	Nome	Pag.
Quadro 1	Principais plataformas de testagem diagnóstica	12
Quadro 2	Dados DATASUS de procedimentos relacionados com tipagem sanguínea, no ano de 2018 com valor total desembolsado em reais	15
Quadro 3	Propriedades físico-químicas da IgM.	25
Quadro 4	Tipo de produção e exemplos de obtenção de AcMm	26
Quadro 5	Diferentes técnicas listadas na literatura, para clarificação de sobrenadantes de cultura/ anticorpos monoclonais.	30
Quadro 6	Polímeros frequentemente usados para construção de biossensores, suas origens e funções	38
Quadro 7	Intensidade da reação de hemaglutinação nos testes imuno-hematológicos e sua descrição	42
Quadro 8	Identificação de Clones e Híbridos, método de obtenção do SNC: composição do <i>pool</i> de anti-A	45
Quadro 9	Determinação da concentração proteica (mg/mL) nas diferentes etapas de purificação	53
Quadro 10	Análise de especificidade e titulação dos AcMm pré e pós purificação	54
Quadro 11	Critérios internacionais de aprovação de anti-A e anti-B, para tipagem sanguínea ABO levando em consideração inspeção visual, título, avidéz, intensidade da reação e especificidade	56
Quadro 12	Cálculo das áreas dos voltamogramas com leitura frente a hemácias A e B	65

Lista de Siglas

[(NH₄)₂SO₄] - Sulfato de amônio

ABO – Sistema de grupos sanguíneos eritrocitários ABH

Ac - Anticorpo

AcMm - Anticorpos monoclonais murinos

Ag – Antígeno

Ag-Ac - Antígeno-anticorpo

Anti-A - Anticorpo de especificidade para grupo sanguíneo A

Anti-B – Anticorpo de especificidade para grupo sanguíneo B

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASR – *Analytic Specific Reagent*

C - Regiões constantes das imunoglobulinas

Fab - *Fragment antigen - binding*

Fc – *Fragment crystallizable*

FDA - *Food and Drug Administration*

FS - Fibroína da seda

GTA - N-acetilgalactosaminiltransferase

GTB - Galactosiltransferase

GTs – glicosiltransferases

Ig ou Igs – imunoglobulina(s)

IgM – imunoglobulina da classe M

IS - Imunossensor

IUO - *Investigational Use Only*

LBios – Laboratório de biossensores e biossistemas da UNIFESP SJRP

LbL - *Layer-by-layer*

LOC - *Lab-on-Chip*

PEI - Polietilenoimina

PES – Poliestersulfonas

POC - *Point-of-Care*

PVDF - fluoreto de polivinilideno

Quit/anti-A - Filme de quitosana com anti-A

Quit/anti-B - Filme de quitosana com anti-B

RhD – sistema de grupo sanguíneo eritrocitário Rh

SNC - Sobrenadante de cultura

SPCE- *Screen-printed carbon electrode*

SUS - Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TLR - Testes Laboratoriais Remotos

TR - Testes rápidos

UV-vis - Espectroscopia no ultravioleta visível

V- Regiões variáveis das imunoglobulinas

VH- Regiões variáveis das cadeias H

VL- Regiões variáveis das cadeias L

Sumário

1 Introdução	17
1.1 Justificativa.....	20
1.2 Tipagem sanguínea ABO: o estado da arte.....	20
1.3 Os anticorpos Monoclonais Murinos (AcMm).....	26
1.4 Anticorpos da Classe IgM.....	28
1.5 Obtenção dos Sobrenadantes de Cultura.....	31
1.6 Clarificação do SNC.....	34
1.7 Purificação de anticorpos monoclonais murinos da classe IgM.....	36
1.8 Avanços Tecnológicos em Dispositivos de Diagnostico Rápido.....	38
1.9 Biossensores.....	39
1.10 Imunossensores.....	44
2 Objetivos	47
2.1 Objetivo Geral	47
2.2 Objetivos Especificos	47
3 Material e Métodos	47
3.1 Comitê de ética	47
3.2 Materiais.....	47
3.3 Aspectos imuno-hematológicos.....	47
3.4 Seleção de anticorpos monoclonais murinos, <i>home made</i> , de especificidade anti-A e anti-B.....	47
3.5 Clarificação dos sobrenadantes de cultura	47
3.6 Purificação de Anticorpos Monoclonais	47
3.7 Confirmação de Purificação de Anticorpos Monoclonais e dosagens proteicas.....	48
3.9 Espectroscopia de UV-visível	48
3.10 Cálculo amostral.....	48
3.11 Amostras	48
3.12 Detecção da tipagem sanguínea ABO.....	48
3.13 Construção de filme <i>LbL</i> em lâmina de vidro	48
4 Resultados e Discussão	48
4.1 Purificação dos Anticorpos Monoclonais Murinos	48
4.2 Construção e Monitoramento do Filme quitosana/Anticorpos	48
4.3 Construção e leitura dos imunossensores e análise em voltamogramas dos resultados	48
4.4 Análise dos Filmes	48
5 Conclusões Parciais	48
6 Perspectivas	48
7 Referencias Bibliográficas	48
8 Anexo	57

1 Introdução

Os benefícios da tecnologia moderna já atingiram quase todos os aspectos de nossas vidas. No entanto, a saúde é uma área que provavelmente ganhou mais com as inovações tecnológicas que vivemos nas últimas décadas. Os avanços tecnológicos alcançados nos últimos anos salvaram milhões de vidas e melhoraram a qualidade de vida humana. A desigualdade no atendimento à saúde também faz parte de nosso cotidiano. Elas estão tão profundamente enraizadas com outros problemas, como os sociais, a disparidade de renda e educação que neste bojo, encontram-se as dificuldades diagnósticas em países em desenvolvimento, dependentes da tecnologia gerada pelo primeiro mundo. Isto se tornou evidente na pandemia do vírus SARS-Cov-2.(1)

Os países em desenvolvimento não possuem acesso a muitas tecnologias de diagnóstico laboratorial/médico dos denominados “países desenvolvidos”. Estas tecnologias foram projetadas para laboratórios climatizados, com armazenamentos de material biológico e químico refrigerado, um fornecimento constante de calibradores e reagentes, insumos de toda natureza além de energia elétrica estável, profissionais altamente treinados e transporte rápido de amostras.(2)

Estas exigências nem sempre são compatíveis com áreas remotas do globo, em especial no Brasil. Há de se lembrar das grandes distâncias difíceis de serem percorridas no norte do país, onde o melhor meio de transporte entre uma agência transfusional e outra é o sistemas de “voadoras”, barcos simples, pequenos, que conseguem transpor as barreiras em quilômetros de rios na Amazônia.(3)

As evoluções trazidas ao longo dos últimos anos no setor médico envolvem tecnologias capazes de fornecer respostas confiáveis, rápidas e de fácil acessibilidade a problemáticas antes muito complexas e dispendiosas. As tecnologias *point-of-care* (POC) encabeçam essas inovações, buscando dispositivos flexíveis e capazes de atender a detecções em cenários diversos. Este tipo de tecnologia, bem como, a *Lab-on-a-chip* (LOC) são aquelas que envolvem o diagnóstico rápido.(2)

Atualmente os principais testes de diagnóstico laboratorial em uso podem ser divididos, de uma forma geral, em três grupos (Quadro 1):

Quadro 1 – Principais plataformas de testagem diagnóstica

Convencional	Testes Rápidos <i>Point-of-care</i>	Ensaio Molecular
Centralizado em multinacionais	Utilização simples	Alto conteúdo tecnológico centralizado em multinacionais
Forte presença da automação	Leitura fácil	Maior sensibilidade
Menor preço(?)	Grandes variações de preços	Preços altos
Usados em maior escala	Maior parte=importados	Demora na emissão de laudos (até dias)

Fonte: Arquivo pessoal, 2020 adaptado de (4).

A metodologia POC (*point-of-care*) vem sendo alvo de um grande número de projetos de desenvolvimento de testes rápidos, uma vez que aliam as vantagens da simplicidade, rapidez e facilidade para o usuário, com desempenhos cada vez melhores em termos de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e estabilidade. Além disso, em geral não faz distinção do tipo de amostra a ser testado, podendo ser utilizado soro, plasma ou sangue total.(5)

A tendência do laboratório moderno é baseada na universalidade do atendimento, na qualidade e na rapidez. Diante disto cresceram as microtecnologias, em especial a microtecnologia fluidica ou microfluidica ligadas historicamente às tecnologias de semicondutores, dando origem a duas terminologias extremamente atuais: POC e LOC (*lab on a chip*). (4) Melhorias na tecnologia POC vão determinar mudanças importantes nos laboratórios contemporâneos. Testes cada vez mais complexos serão executados em dispositivos que são menores e mais fáceis de utilizar do que os da geração atual.

Esta evolução já pode ser identificada nos dias atuais.(6) As estruturas laboratoriais serão cada vez mais laboratórios de referência, denominadas “open lab” com espaços flexíveis e adaptáveis às novas tecnologias. O compartilhamento de espaços e a venda de serviços tem sido uma constante nas denominadas “facilities”. Outra denominação recente é a de *deep underground laboratories* que são infraestruturas multidisciplinares para realizar pesquisas sobre eventos raros, como interações de neutrinos, decaimento de prótons e matéria escura, em geofísica, relatividade geral e biologia. Existem 12 dessas infraestruturas implantadas no hemisfério norte. Outros três novos laboratórios estão em andamento sendo dois

deles no hemisfério sul. A interação e a cooperação tem sido o forte destas estruturas otimizadas, onde a expertise e equipamentos de alto custo não existem em duplicata, diminuindo significativamente o custo operacional.(7)

O compartilhamento de estruturas, os espaços *co-working*, as *facilities* assim como a tecnologia POC tem sido fácil de identificar nas dosagens clínicas e em diversas determinações hormonais.(8) No que tange a área da hemoterapia laboratorial, pouco se fala, pesquisa ou se disponibiliza. A ênfase tem sido dada na utilização dessas novas ferramentas (POC e LOC) para pacientes gravemente enfermos, especialmente após trauma, onde um grande número de pesquisas levou a uma mudança de paradigma que favorece o teste POC na orientação da denominada ressuscitação hematológica ou hemoterápica, bem como uso no período perioperatório onde as solicitações para transfusão são mais comuns.(9)

Desta forma, na área de hemoterapia são utilizadas tecnologias clássicas, com técnicas em uso há mais de 100 anos, como o hemaglutinação em tubos, as técnicas de microplacas, microtubos, as tecnologias em gel, fase sólida, técnicas de biologia molecular até a automação completa, com equipamentos robustos, caríssimos, colocados sob a forma de comodato por cifras elevadas.(10)(11). A automação em hemoterapia se justifica para serviços de grande porte, trazendo o benefício de evitar o erro humano, sempre com o objetivo de levar o melhor para o paciente que está na ponta. As vantagens são muitas: diminuição do erro humano, a rapidez, confiabilidade, reprodutibilidade, precisão, segurança, margem de erro muito menor em relação aos aparelhos não automatizados, menor volume de amostra a ser coletada, pipetam as amostras e reagentes automaticamente e resultados altamente precisos e rápidos; interfaceados com prontuários.(12) (13)

Avaliando a infraestrutura hemoterápica brasileira são encontrados os serviços de maior complexidade que correspondem na rede pública aos Hemocentros e na rede privada os Serviços de Hemoterapia, que executam todas as atividades do ciclo do sangue, incluindo captação, coleta, processamento de sangue, análises laboratoriais que envolvem amostras de sangue do doador e do receptor, além da distribuição em polo microrregional. A menor estrutura transfusional corresponde às agências transfusionais (ATs). No entanto, o Brasil tem mais de 2500 agências transfusionais públicas que são as estruturas que garantem a capilaridade da hemoterapia brasileira, e na sua expressiva maioria, serviços que fazem menos de 2.000 tipagens sanguíneas/mês, o que torna proibitivo do ponto de vista financeiro, a

automação. As Ats são responsáveis em manter estoque de sangue obtido de um Hemocentro, Hemonúcleo ou de um Serviço de Hemoterapia conveniado, mas não tem nenhuma das atividades que envolvam as campanhas de doação de sangue, coleta, processamento, sorologia e testes de biologia molecular. A missão das Ats é o preparo do sangue para o paciente. (14) Diante dos elevados custos de aluguel de equipamentos para automação em imunohematologia nas agências transfusionais brasileiras, associado ao custos dos insumos e a de manutenção dos equipamentos, este projeto tem como finalidade a não utilização de tecnologias importadas, mas sim desenvolvida em território compatível com as necessidades dos serviços brasileiros agregando todas as características acima descritas para os sistemas automatizados.(15)

Com este intuito, Alexandre Giannchini Romagnoli desenvolveu dissertação de mestrado com a proposta do desenvolvimento de imunossensor para tipagem sanguínea ABO. O autor utilizou o sistema de sensor de bancada (tarugo) e anticorpos anti-A e anti-B disponíveis no mercado mostrando de forma concreta que há a possibilidade de se propor a melhoria deste modelo com tecnologia nacional.(16)

O foco deste trabalho é promover melhorias no desenvolvimento da proposta de imunossensor para tipagem sanguínea, com leitura objetiva, rápida, com transferência dos resultados de forma informatizada para o prontuário eletrônico do paciente. Neste projeto são utilizados anticorpos monoclonais murinos anti-A e anti-B obtidos, caracterizados e purificados no Laboratório de Engenharia Celular desde 1992. Estes anticorpos foram caracterizados e purificados para a composição de imunossensor impresso de carbono utilizando o polímero quitosana e a técnica de construção do filme descrita como *Layer-by-Layer*. (17)

Tendo em vista que o foco do projeto é a construção de imunossensor (IS) para a realização rápida, segura e com leitura informatizada, faz-se necessária uma rápida revisão sobre a tipagem sanguínea.

1.1 Tipagem sanguínea ABO: O estado da arte

O sistema ABO foi descoberto por Landsteiner em 1900 em Viena. Na época, verificou-se que ocorria o evento de aglutinação das hemácias humanas quando os glóbulos vermelhos de um indivíduo eram colocados em contato com soro de outros indivíduos. Formulou-se a hipótese de que havia anticorpos produzidos por um que

reconhecia estruturas expressas na membrana celular dos eritrócitos de outros. Tais estruturas denominadas antígenos (proteicos ou não) possuem epítomos que estimulam a resposta imune e são reconhecidos por anticorpos naturais específicos. Esta descoberta impulsionou de forma relevante a evolução da hemoterapia.(18)

Na superfície das hemácias encontra-se uma diversidade de antígenos secretados pelos eritrócitos ou outras células. Estes antígenos podem ser proteínas, glicoproteínas, carboidratos, lipídeos etc. Portanto sua composição química é diversificada. Os antígenos ABO são carboidratos, produtos secundários dos genes. Sua formação inicia-se na vida intrauterina, ao redor da quinta semana pós fertilização estendendo-se até o 4º- 6º mês de vida, atingindo, portanto, sua maturidade na vida pós-natal. Vale ressaltar que na 12ª semana de gestação, os antígenos ABO estão altamente expressos em diferentes tecidos fetais: hepático, renal, medula óssea, cérebro, cerebelo, timo, linfonodos, intestino delgado, cólon, retina, pulmão e glândula tireoide, mas ao nascimento está majoritariamente expresso em hemácias, além de manter expressão nos tecidos já mencionados. Desta forma, os grupos sanguíneos ABO são considerados tissulares e de grande relevância no transplante de órgãos.(19) Isto coloca este grupo sanguíneo dentro do escopo de relevância em clínica transfusional, transplantes e terapia celular.(18)

Os métodos de análise laboratorial deram as primeiras indicações de que a especificidade dos antígenos residia nos carboidratos e revelaram os açúcares imunodominantes nas estruturas antigênicas. Subsequentemente, os procedimentos de fragmentação química permitiram que as estruturas determinantes completas fossem estabelecidas. Experimentos de degradação com glicosidases revelaram como a perda de uma especificidade pela remoção de uma única unidade de açúcar expôs uma nova especificidade e sugeriram que a biossíntese procedia por uma reversão desse processo, em que as estruturas de oligossacarídeo eram construídas pela adição sequencial de unidades de açúcar.(20) Consequentemente, os produtos genéticos primários do grupo sanguíneo foram previstos como enzimas glicosiltransferases que adicionaram o último açúcar para completar as estruturas determinantes (os antígenos ABO são produtos secundários dos genes).(21) A identificação das enzimas, produtos primários dos genes esclareceu muito sobre a bioquímica dos grupos sanguíneos.

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO (H) humanos são produzidos por enzimas glicosiltransferases específicas (GTs), o sistema de grupo sanguíneo ABO é determinado pelo tipo de glicosiltransferases expressas no corpo: N-acetilgalactosaminiltransferase (GTA) ou Galactosiltransferase (GTB). Os antígenos A e B são modificados a partir do carboidrato correspondente ao grupo sanguíneo O pela adição de diferentes monossacarídeos, o antígeno A corresponde ao açúcar imunodominante terminal a N-acetilgalactosmina (GalNAc), enquanto o antígeno B é determinado pela galactose.(22)

Os testes imuno-hematológicos pré-transfusionais envolvem: a fenotipagem do sistema ABO/Rh, que compreendem a fase direta e reversa da tipagem sanguínea, a pesquisa de anticorpos irregulares e a prova de compatibilidade maior. Estes testes são baseados na hemaglutinação, técnica essa fundamentada na ligação antígeno (Ag) - anticorpo (Ac), que, na presença de ambos os elementos aglutinam.(11)

Com o passar do tempo, essa técnica, realizada de forma convencional, em tubos de hemólise deu lugar à técnicas avançadas, como a de aglutinação em coluna(gel-teste), ensaio de aderência de hemácias em fase sólida e eritrócitos magnetizados em muitos lugares do mundo, alguma destas, inclusive, são realizadas no Brasil. Muitas destas novas tecnologias são adaptáveis à automação e os principais fabricantes neste campo desenvolveram equipamentos semi ou totalmente automatizados para testes imuno-hematológicos.(23)

Apesar dos testes de rotina de bancos de sangue (tipagem sanguínea ABO/Rh) estarem migrando, em serviços de grande porte, para sistemas altamente automatizados, a maioria das amostras de sangue dos pacientes para tipagem ABO/Rh ainda é realizada por técnicas manuais com leitura subjetiva. A automação em bancos de sangue, sem dúvidas, é um dos pilares de sustentação para esses serviços de alta qualidade e permitindo controles de processo integrados, que inclui a identificação de amostras de forma confiável, entrada eletrônica de resultados, controle de qualidade obrigatório, classificação padronizada de reações, tempo de resposta rápido e potencial para aumento produtividade, liberando os técnicos qualificados para executar outras funções críticas no ciclo do sangue.(24)

A automação melhora a objetividade e a reprodutibilidade dos testes. Reduz erros humanos na identificação de pacientes e erros de transcrição além de permitir a

rastreabilidade da documentação e dos testes realizados, dos reagentes e processos e do arquivamento de resultados. Mudar de métodos manuais para automação é um grande compromisso para qualquer serviço de transfusão para fornecer assistência de qualidade ao paciente, com menor tempo de resposta, mas se torna um grande problema, tendo em vista o custo de manutenção deste tipo de tecnologia.(25)

A maior desvantagem da automação é que, pode comprometer a curto espaço de tempo a viabilidade financeira do serviço. Entre os principais pontos negativos está o fato de que estes equipamentos robustos requerem, para ter custo-benefício justificável, uma rotina com alto número de testes por mês e esta não é uma realidade da expressiva maioria das agências transfusionais do país.(15)(26)(27)

O Brasil tem hoje cerca de 2066 unidades transfusionais, sendo a maioria delas agências transfusionais, portanto unidades com foco em testes imuno-hematológicos em pacientes. Estas unidades são consideradas de pequeno porte, com menos de 2.000 testes/mês, no entanto, garantem a capilaridade do sistema hemoterápico brasileiro.(14)

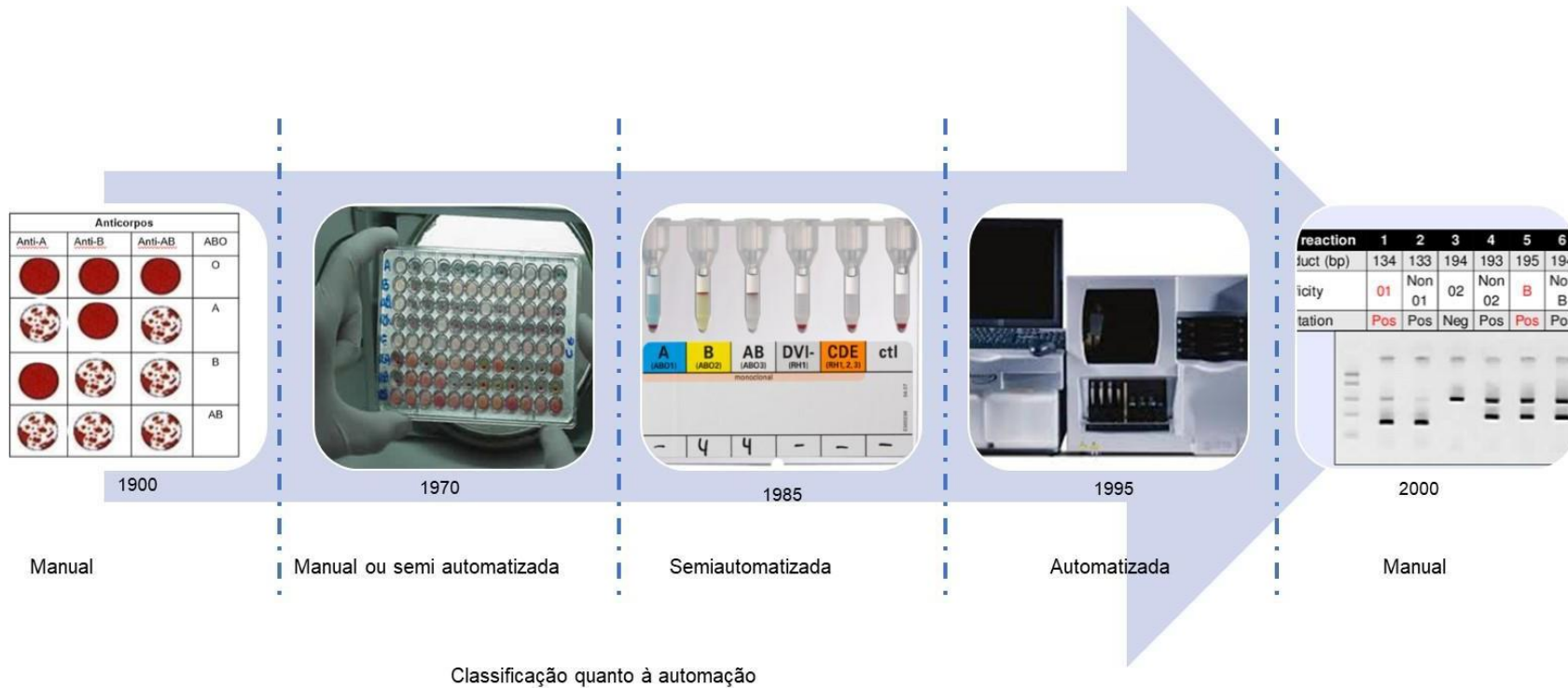
Dentro deste escopo, o desenvolvimento de um biossensor com tecnologia nacional, que possa atender uma demanda crescente de dispositivos para diagnóstico rápido tem se mostrado cada vez mais necessário.

O interesse em criar um imunossensor específico para a tipagem sanguínea é calcado em alguns indicadores: 1) as unidades hemoterápicas que garantem a capilaridade do sistema brasileiro são agências transfusionais: unidades menores, intra-hospitalares, na maioria das vezes sem um quantitativo de tipagem sanguínea que sustente a automação (onerosa e indicada para serviços com elevada demanda); 2) a expressiva maioria dos serviços brasileiros usam técnicas totalmente clássicas, manuais, observador dependente e sem interfaceamento digital; 3) as técnicas em gel e em micro colunas são onerosas e mesmo assim, observador dependente; 4) apesar da grande evolução da transfusão no Brasil, os hospitais ainda não implementaram o sistema de pulseira com código de barras que rastreie e interligue, por meio informatizado, a bolsa de hemocomponentes compatibilizada e o paciente. Sabe-se que as estatísticas de erros em troca de pacientes no ato transfusional existem no mundo todo, tendo como consequência a incompatibilidade sanguínea (levando à reações transfusionais), insuficiência renal e outras complicações. Mesmo com

avanços em treinamento profissional e novas técnicas, a taxa de erro humano tem se mantida.

Ao avaliarmos as diferentes técnicas existentes na rotina imuno-hematológica em bancos de sangue podemos listar: hemaglutinação em lâminas, hemaglutinação em tubos, microplacas e colunas em gel-sephadex (conhecida como técnica em gel). Estas duas últimas são consideradas semiautomatizadas, mas ainda assim a leitura final é observador-dependente. Cada uma destas técnicas tem suas vantagens e desvantagens, e todas elas são tecnologia importada. A figura 1 apresenta a *timeline* da evolução das técnicas de tipagem sanguínea ABO.

Figura 1 – *Timeline* da evolução da tecnologia de tipagem sanguínea ABO utilizadas na rotina transfusional



Fonte: arquivo pessoal, 2020.

A tipagem sanguínea classicamente possui duas etapas distintas: 1) fase direta ou globular, onde são estudados os antígenos expressos na superfície dos glóbulos vermelhos utilizando anticorpos comerciais e 2) fase reversa ou sérica, onde são estudados os anticorpos naturais produzidos pelos indivíduos que não possuem determinados antígenos. Por exemplo, indivíduos do grupo O devem apresentar anti-A e anti-B, aqueles do grupo A, possuem apenas anti-B, os indivíduos do grupo B possuem naturalmente anti-A circulante e aqueles que são do grupo AB não expressam anticorpos contra sistema ABO. Para se concluir uma tipagem sanguínea há que se ter a concordância de ambas as fases da tipagem. Durante mais de 80 anos os anticorpos utilizados para a tipagem sanguínea eram obtidos de indivíduos com altos títulos de anticorpos séricos. A partir de 1975, com surgimento da tecnologia monoclonal, houve a migração para este tipo de tecnologia, tendo em vista que é mais segura e reprodutível.

1.2 Os anticorpos Monoclonais Murinos (AcMm)

Anticorpos monoclonais murinos (AcMm) são Imunoglobulinas produzidas pela plataforma biotecnológica chamadas também de hibridomas. A importância dos anticorpos monoclonais e seu impacto no mercado mundial está bem estabelecido há mais de 30 anos, em especial após a primeira aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA) do primeiro anticorpo monoclonal terapêutico: o muronomab ou OKT3 indicado para a abordagem clínica de rejeição aguda de transplante de órgãos. O aumento da especificidade no diagnóstico da maioria das doenças infecciosas, neoplásicas ou mesmo determinação fenotípica de antígenos é inquestionavelmente melhor com a tecnologia de monoclonais. Houve nos últimos anos, uma maciça expansão do uso dos AcMm. Em 2009 este mercado era de 36,5 bilhões de dólares.(28) Quatro anos mais tarde, o aumento foi de 105,47% atingindo em 2013 cifras de 75 bilhões de dólares (26,36% de aumento/ano) e em 2015 já se listavam mais de 300 novos anticorpos em desenvolvimento no mundo e este mercado não para de crescer, inclusive no Brasil.(29)(30)(31)

Diante do desafio de implantar o uso de métodos biotecnológicos na Faculdade de Medicina de Botucatu, em 1992, com forte parceria com o Instituto

Nacional de Transfusão de Sangue de Paris, e acordo formalmente assinado, o Hemocentro de Botucatu implantou o Laboratório de Produção de Anticorpos Monoclonais Murinos(32). Neste contexto, a produção de AcMm para tipagem sanguínea e fenotipagem eritrocitária foram os projetos iniciais. Em dezembro de 1992 foi obtido o anticorpo de especificidade anti-A, em 1993, o anti-B.

Estes anticorpos foram obtidos pela imunização de camundongos Balb-c, isogênicos, com protocolos denominados de curta duração, com suspensão de hemácias humanas a 1%, tipadas com reagentes comerciais. Após o controle de imunização que identificava a presença de anticorpos esperados na corrente sanguínea do animal foi realizado a esplenectomia para a remoção do baço e obtenção do *pool* de linfócitos B. Estas células foram fusionadas com mieloma múltiplo murinho, não secretor de imunoglobulinas, pelo método químico utilizando o polietilenoglicol. Esta técnica foi inicialmente descrita por Köhler e Milstein em 1975 e posteriormente modificada por Deffune em 1989.(33)(34)

Os anticorpos anti-A e anti-B obtidos foram clonados pela técnica de diluição limitante e os clones caracterizados criopreservados no banco de células do Laboratório de Produção de Anticorpos Monoclonais, em nitrogênio líquido (-196°C).

De 1994 a 2007 estes anticorpos monoclonais validados foram utilizados na rotina transfusional pelos métodos em lâmina, tipagem sanguínea em tubo e em microplacas. No entanto, apesar de não haver regulamentação da ANVISA que proibisse o uso destes anticorpos produzidos e validados *home made*, foram proibidos pelo novo gestor do Hemocentro em 2007. Durante estes 14 anos, mais de 350.000 amostras de sangue foram tipadas usando estes anticorpos. Estes anticorpos foram produzidos com recursos de projetos de pesquisa e distribuídos ao Hemocentro sem custos. Isto gerou uma economia significativa que permitiu investimentos em demais áreas tecnológicas. Somente em 2014 a ANVISA legislou sobre uso de reagentes e células produzidas no país, publicando a RDCn^o 34 de 2014 no seu parágrafo primeiro(35):

§ 1º A produção e utilização de reagentes produzidos no serviço de hemoterapia (*in house*) para realização de testes imuno-hematológicos dependerá de autorização

expressa da Anvisa. § 2º A autorização para a utilização de testes imuno-hematológicos produzidos no serviço de hemoterapia (*in house*) deverá ser normatizada em regulamento específico.

O regulamento específico foi publicado em 2016 (RDC nº 36/2015). A Nota Técnica esclarece que produtos rotulados internacionalmente como *Analytic Specific Reagente* (ASR) ou aqueles registrados como *Investigational Use Only* (IUO) não estão sujeitos à registro na Anvisa. Portanto, a responsabilidade por seu uso é exclusivamente do laboratório, que deve respeitar a legislação sanitária em vigor, entre esses os que incluem “especificação e sistemática de aprovação de insumos, reagentes, equipamentos, instrumentos e a documentação da validação do ensaio”. Este regulamento torna claro que a produção *home made* não fica proibida, mas sim passa por critérios de controle de qualidade que devem ser criteriosos e devem ter seus registros mantidos durante 20 anos.

Destaca-se que estes anticorpos poderiam ter sido patenteados, mas na época de sua obtenção, a Universidade não dispunha de Agência de Inovação e os trâmites eram muito mais complicados. Desta forma, optou-se pela colocação destes insumos na prática diária do Hemocentro, suas agências e hemonúcleos.

Como o foco do desenvolvimento foi o de obter anti-A e anti-B para uma tipagem sanguínea rápida e segura, os anticorpos obtidos pelo protocolo de imunização curto são da classe IgM.(36)

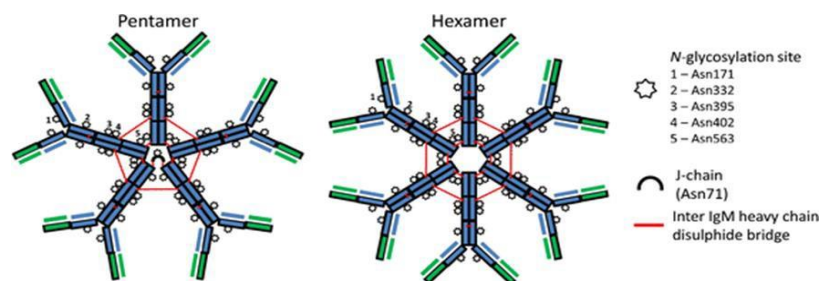
1.3 Anticorpos da Classe IgM

Tendo em vista que o foco deste projeto é a construção de um imunossensor utilizando anticorpos monoclonais murinos de especificidade anti-A e anti-B, produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular, e que para ambas as especificidades, a classe da imunoglobulina é IgM, será feita uma revisão sobre esta classe de Ig.

Os anticorpos da classe IgM são glicoproteínas mais complexas que as IgG. É considerada a primeira classe de imunoglobulina produzido pelos linfócitos B.

Quando a IgM é secretada pelas células, cinco das unidades básicas em forma de Y se unem para formar uma grande molécula de pentâmero com 10 locais de ligação ao antígeno, tornando-a voraz, com uma forte ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Quando ocorre a ligação Ag-Ac, na presença de imunoglobulina IgM, como no caso da tipagem sanguínea ABO, ocorre naturalmente aglutinação das hemácias. Este fenômeno também é observado com os microrganismos.(37) A imunoglobulina M (IgM) é um receptor de antígeno nos linfócitos B e o primeiro anticorpo produzido em uma resposta imune. Ele está presente tanto na membrana das células B como em molécula solúvel no sangue. Devido ao seu grande tamanho (900kDa), a IgM é encontrada principalmente no espaço intravascular, ou seja, na corrente sanguínea e também no fluido linfático. No soro, a IgM existe na forma de pentâmero e compreende aproximadamente 10% do conteúdo normal de imunoglobulina no soro humano. É a terceira imunoglobulina humana mais abundante no organismo.(38)(39)(40) Ela é predominante nas respostas imunes primárias e forte fixadora de complemento, o que a torna mais eficiente.(41) A Figura 2, a seguir, demonstra a estrutura de duas diferentes apresentações de IgM: pentâmero e hexâmetro.

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da IgM



Fonte: Representação da Região variável, Fab (verde), da região constante, Fc (azul), da cadeia pesada (contorno escuro) e da cadeia leve (sem contorno) são representados. Adaptado de Moh et al, 2016.(42)

A classe de imunoglobulina M é caracterizada por proteínas de alto peso molecular com coeficiente de sedimentação 19S incluindo formas menores (monômeros) com $S_{20, w}$ de aproximadamente 7S. Tanto a forma de IgM com coeficiente de sedimentação 7S como 19S são fluidos extracelulares identificados por técnica de radioimunoensaio. A demonstração da estrutura polimérica com coeficiente de sedimentação 19S dissociada por mercaptanos

prova que esta apresentação é composta por ligações de pontes dissulfeto entre cada subunidade.

Trabalhos sugerem que a forma da IgM 7S é detectada nas amostras a fresco, em especial em sobrenadantes de cultura onde o mercaptoetanol é um integrante, mas as formas monoméricas não são estáveis ao congelamento.(43) O entendimento das propriedades físico-químicas da molécula pode ser importante para sua aplicação e fixação em sensores. O quadro 3 abaixo representa estas propriedades.(44)

Quadro 3 - Propriedades físico-químicas da IgM

Propriedades físico químicas da IgM	Dados
Peso molecular (kDa)	950-1150
Número de resíduos	7926
Coefficiente de sedimentação ($S_{20,w}$)	17,7
% de carboidrato por peso	10
Sobrevida biológica (meia-vida)	5-10 dias
Coefficiente de difusão (cm^2/seg)	$2,6 \times 10^{-7}$
Coefficiente molar extinção (absortividade molar)	1,18

Fonte: Adaptado de Gautam S, 2011. (44)

Trabalhos publicados a partir de 1986 mostram que a titulação, avidéz e especificidade usando anticorpos monoclonais murinos (AcMm), da classe IgM e de especificidade anti-A, anti-B, anti-AB, anti-H, anti-Lewis a e anti-Lewis b foram comparados com soros policlonais de origem humana. Os resultados mostram que os anticorpos monoclonais são semelhantes aos obtidos com soros policlonais. A superioridade dos monoclonais reside no fato de que nenhuma reação inespecífica foi observada. Isto tornou o uso destes anticorpos universal.(45)(46)

1.4 Obtenção dos Sobrenadantes de Cultura

Os anticorpos monoclonais utilizados neste projeto foram produzidos pelo Laboratório de Produção de Anticorpos Monoclonais do Hemocentro de Botucatu e sua expansão foi com a obtenção de sobrenadante de cultura. Antes de se iniciar ou decidir pelo processo de expansão clonal há de se estabelecer a quantidade necessária de anticorpos para os ensaios. Necessidades de até 10g de imunoglobulinas purificadas são classificadas de pequena escala. O quadro 3 apresenta o tipo de produção de AcMm, as necessidades em gramas desejadas da imunoglobulina de interesse, o tipo de expansão recomendada para laboratórios de cultura e exemplos utilizados.

Quadro 4 – Tipo de produção e exemplos de obtenção de AcMm

Tipo de Produção	Necessidades em gramas (g) de anticorpos monoclonais	Tipo de expansão celular/sistemas de cultura celular	Exemplo de obtenção
Pequena escala	≤ 10 g	Sistemas de cultura de baixa densidade celular	Frascos T 25,75,125cm ² , <i>roller bottles</i> Cultura em <i>bags permeáveis</i>
		Sistemas de alta densidade celular	<i>Spinners</i> e biorreatores de fibras ocas
Média Escala	Entre 10-100g de Ig	Sistemas de alta densidade celular	ascite
			Sistemas baseados em membranas semi-permeáveis
Alta Escala	> De 100g de Ig	Sistemas intensivos de alta densidade celular	Fermentadores agitados <i>deep tank</i> , <i>airlift</i> ou sistemas de <i>perfusão contínua</i>

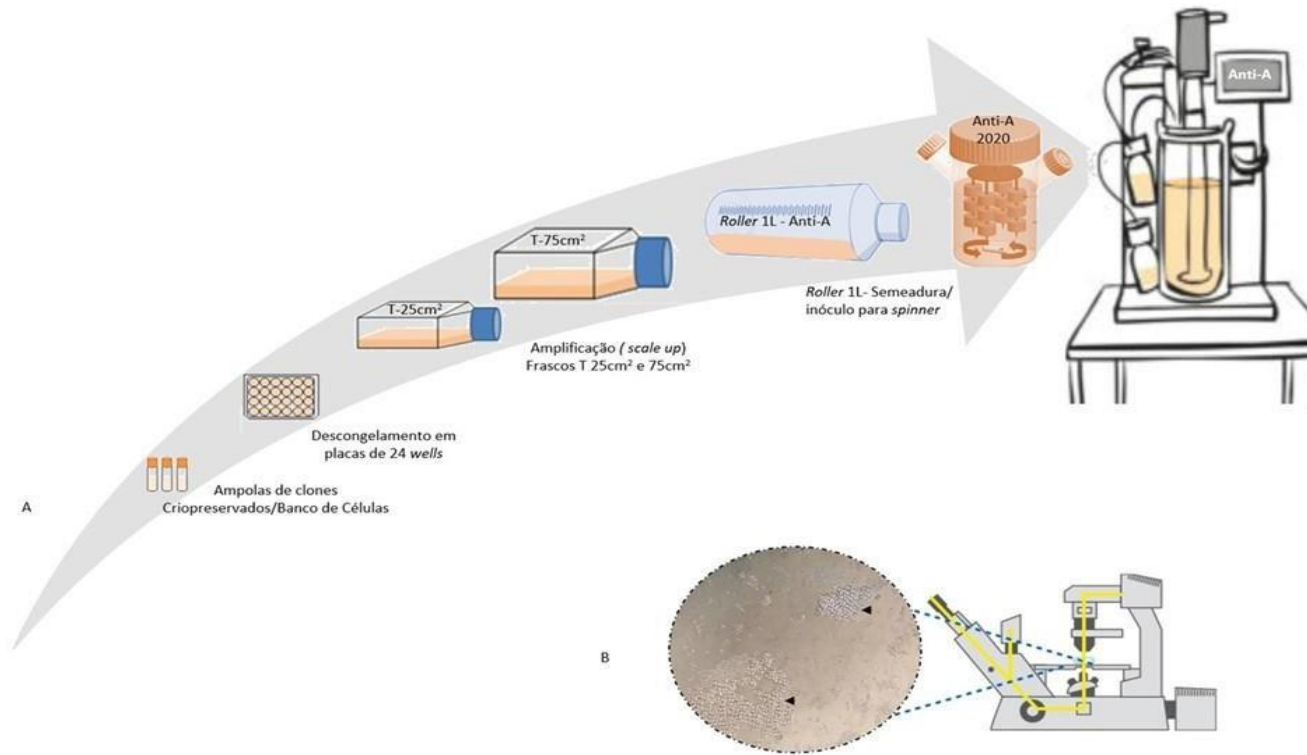
Fonte: Adaptado de *Monoclonal Antibodies*, 1995 e <https://pivotalscientific.com/scientific-library/in-vitro-and-in-vivo-mab-production/>(47)

Quanto ao rendimento obtido registra-se que nos sobrenadantes de cultura a concentração de imunoglobulinas específicas secretadas está entre 1 e 10µg/mL enquanto na técnica denominada ascite ou fluido ascético se obtém até 1.000 vezes mais imunoglobulinas. No entanto, no presente projeto se tem a limitação de que a expansão por este método não é possível, pois as imunoglobulinas anti-A e anti-B da classe IgM sofrem adsorção in vivo pelo sistema retículo endotelial do camundongo.(47)

A figura 3 registra todas as etapas a partir da identificação das ampolas criopreservadas no Banco de células, o descongelamento em microplacas, a repicagem em frascos T25cm² → 75cm² → *roller* → preparo do inóculo para biorreator. Todas as etapas são monitoradas por microscopia invertida com contraste de interferência /luz transmitida, ideal para observação de células em suspensão.

Uma vez obtido o volume suficiente para o desenvolvimento do projeto, a etapa seguinte se denomina: clarificação dos sobrenadantes de cultura.

Figura 3 – Representação esquemática do escalonamento de bancada para a obtenção de sobrenadante de cultura



Fonte: Arquivo pessoal, 2019. Em A = etapas subsequentes do escalonamento em bancada para a obtenção de sobrenadante de cultura pelo método *batch*. Em B = fotografia obtida em microscópio Zeiss™, invertido, luz direta, aumento 20X. Setas pretas apontam crescimento em *clusters* de clone de anti-A descongelado para amplificação.

1.5 Clarificação do SNC

A clarificação do SNC (sobrenadante de cultura) significa a eliminação, por diferentes métodos, de *debris* celulares, macroagregados, DNA livre e eventuais floculações que possam estar presentes no meio de cultura. Esta etapa metodológica foi inserida na tecnologia de hibridomas com o objetivo de aumentar a produtividade dos sobrenadantes obtidos das culturas de células para atender à demanda crescente de biofármacos, por meio do aumento da densidade celular e tempos de cultura mais longos que permite como consequência, a presença de mais artefatos.(48)

Existem diversos métodos descritos para a clarificação do SNC, algumas delas consideradas como técnicas de pré-tratamento, como precipitação, floculação aniônica, floculação catiônica e floculação modo misto. Como tratamento propriamente dito são listados: métodos precipitantes e floculantes como ultracentrifugação, a floculação, filtração e outras como passagem por dispositivo de retenção em célula acústica.(49)(50)(51)

A técnica de clarificação se não realizada, ou realizada de forma inadequada pode comprometer a etapa subsequente que é a purificação dos anticorpos monoclonais. Isto se dá pela presença de partículas em tamanhos menores que um micron que não podem ser removidos por ultracentrifugação. Desta forma, os protocolos de maneira geral, utilizam a ultracentrifugação seguida da filtração, considerados mundialmente os métodos associados mais utilizados. Destaca-se que a seleção dos filtros para esta finalidade deve ser criteriosa. Buyel *et al.* alertam para o fato de que as imunoglobulinas (proteínas) podem ser adsorvidas à diatomita contida na maioria da sílica dos filtros(50). Os filtros de polietersulfonas (PES), celulose e fluoreto de polivinilideno (PVDF) são os mais indicados pois têm baixa capacidade de ligação com proteínas. A escolha do tamanho do poro de exclusão também é essencial.(52)

O quadro 5 lista as diferentes técnicas para a clarificação de SNC.

Quadro 5 - Diferentes técnicas listadas na literatura, para clarificação de sobrenadantes de cultura/ anticorpos monoclonais

Métodos de clarificação	Técnicas/Material utilizado	pH de operação	Modo de ação	Referencia
P R E C I P I T A Ç Ã O	↓ pH presença de metais	4,5-5,5	Neutralização de carga	Nripen Singh et al. <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , Vol. 113, No. 4, April, 2016
	Solventes orgânicos	6,5-7,5	Redução de solubilidade	
	Metais-Polietilenoglicol	5,5-8,5	Interação hidrofóbica por exclusão estérica	
	Ácido caprílico	4,5-5,5	Coagulação e neutralização de carga	
	Afinidade -Elastin-like polypeptides (ELPs)	6,5-7,5	Resposta ao estímulo por afinidade	
Floculação aniônica	Ácido povinilsulfônico (PVS) Ácido poliacrílico (PAA) Carboximetildextrana (CMD)	6,5-7,5	Interações de carga com o produto	
Floculação catiônica	poli(cloreto de dialildimetilamônio) (pDADMAC) Polietilenimina (PEI) Poliaminoácido	4,5-7,5	Ligação eletrostática de hidrogênio	
Floculação Mista	Copolímeros de 2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid (AMPS-AB2) Copolímero modificado de polibenzil alilamina	4,5-7,5	Ligação de hidrogênio hidrofóbica eletrostática	
Filtração 0,2-0,8μ	Filtros de celulose, PVDF etc	7,0-7,5	Carga positiva forte	J.F. Buyel et al. <i>Biotechnology Advances</i> 35 (2017) 458–465 Hui F. Liu et al. <i>mAbs</i> 2:5, 480-499; September/October 2010; © 2010 Landes Bioscience
Ultracentrifugação	Ultra centrífuga em rotor tipo Swing Out	7,0-7,5	Remove por ação física da gravidade (força g)resíduos de células e agregados proteicos maiores. Tem a limitação de não remover completamente partículas menores e de tamanho < 1μ	

Fonte: Arquivo Pessoal, 2020. Foram utilizadas referências listadas na última coluna.(49)(50)(51)

1.6 Purificação de anticorpos monoclonais murinos da classe IgM

Uma vez clarificados os sobrenadantes de cultura contendo anticorpos monoclonais, a etapa seguinte corresponde à purificação da imunoglobulina M. A produção de biomoléculas, como os anticorpos monoclonais, que possuem alto valor agregado, tem apresentado mudanças importantes nos últimos anos. Independentemente de tais melhorias nos processos de purificação de anticorpos monoclonais, esta etapa além de crucial, configura-se de grande complexidade e dificuldade técnica, quando o anticorpo é da classe IgM.(53)

Antes da ampla disponibilidade e uso da Proteína A e da Proteína G para a purificação de IgG, o uso da técnica de precipitação por sulfato de amônio era o método padrão para isolar IgG e outras proteínas séricas. A adição de sulfato de amônio reduz a solubilidade efetiva das proteínas por meio da competição direta por sítios de ligação na superfície da proteína. As proteínas precipitadas resultantes podem ser isoladas por centrifugação. Uma concentração de sulfato de amônio entre 40% e 50% resulta na precipitação de IgG da maioria das espécies. Como outras proteínas podem ser precipitadas juntamente com proteína de interesse, o uso de sulfato de amônio não resulta em uma fração de anticorpo altamente purificado e, como tal, deve ser considerada de baixa resolução ou como etapa inicial de outros protocolos de purificação de anticorpo usando, por exemplo, colunas de cromatografia.(54)

A Proteína A e Proteína G são proteínas de ligação a imunoglobulinas expressas em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp.*, respectivamente, que foram adaptados para uso na purificação de grandes quantidades de IgG e não especificamente IgM. Eles estão disponíveis covalentemente ligados a resinas de afinidade, como 4% de agarose reticulada, tornando-os adequados para o isolamento de anticorpos em sistemas considerados de baixa pressão.

A grande quantidade de pesquisas, nas últimas duas décadas, com a produção de anticorpos monoclonais, tornou a IgM potencial agente terapêutico além de sua grande contribuição para o diagnóstico de ponta. A fim de explorar totalmente o potencial de IgM, em uma forma altamente pura e ativa, devem ser elencados processos de purificação de baixo custo, para a realização de ensaios

clínicos, caracterização e análises de atividade. As propriedades físico-químicas complexas da IgM, em particular seu grande tamanho e sua natureza instável tornam a purificação de IgM difícil e temida por muitos laboratórios.(44)

Cláudia Iwashita Verinaud em seu trabalho de doutoramento pelo Instituto Butantã/Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo, em 2016 versando sobre desenvolvimento de estratégias para a purificação de IgM a partir de plasma humano descreve:

Purificação com sulfato de amônio, polietilenoglicol e ácido caprílico já foram descritos para a purificação de IgM. A separação de proteínas por precipitação é interessante, pois as proteínas possuem diferentes coeficientes de sedimentação, o que faz com que elas se separem com diferentes concentrações destes produtos associados a centrifugações. No entanto os métodos de precipitação são drásticos, o que podem causar a desnaturação das proteínas, além de ser um método menos robusto. (55)

Antes de ser iniciado o processo de purificação, deve-se ter claramente as características físico-químicas da molécula a ser purificada.(56)

Os métodos de purificação de anticorpos monoclonais oferecem vários graus de pureza do anticorpo, além de grandes diferenças sobre os diferentes métodos de tratamento da proteína, podendo ou não causar desnaturação da mesma. Considera-se que para estabelecer o protocolo de purificação eficaz, é necessário ter algum conhecimento da estrutura do anticorpo e de outras propriedades físico químicas, como já mencionado anteriormente. A precipitação com sulfato de amônio é usada há muito tempo para separar gamaglobulinas de outras proteínas presentes no sobrenadante da cultura de tecidos contendo soro fetal bovino à 10%. Além disto, sabe-se que as IgM são insolúveis na presença de uma grande diversidade de tampões em especial naqueles com baixas concentrações de sais e ainda mais, se a molécula encontra-se na apresentação monoméricas, pentamérica (mais frequente) e não na hexamérica.(57)

Portanto, há necessidade de reconhecer se as unidades obtidas são monoméricas (7S) ou pentaméricas (19S), existindo a possibilidade de coexistir no sobrenadante de cultura as duas formas. Isto acontece porque nos protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais, um dos aditivos colocados no meio de cultura para minimizar o estresse oxidativo é o 2-mercaptoetanol.(58)

1.7 Avanços Tecnológicos em Dispositivos de Diagnóstico Rápido

A busca por suprir a necessidade de diagnósticos rápidos, eficazes e precisos, fizeram a ciência investir em tecnologias que auxiliasse na tomada de decisão do médico e, conseqüentemente o tratamento, o mais rápido possível, sendo sua resposta rápida e com maior probabilidade de eficácia. Diante dessa necessidade, a proposta de uma medicina translacional personalizada e inovadora tem sido registrada em publicações recentes, visando a diminuição de subjetividade e do tempo de realizações de exames convencionais, tornando a assistência ao paciente rápida e eficaz.(59)

A exemplo disso, consolida-se o desenvolvimento de novas tecnologias, como a POC, também conhecida como Testes Laboratoriais Remotos (TLR) ou Testes rápidos (TR), a qual baseia-se na realização de testes próximo ao paciente, que visa obtenção de resultados precisos em minutos compreendendo a tecnologia de miniaturização denominada *Lab-on-a-chip* (LOC). Sua versatilidade inclui desde de materiais simples, como tiras básicas de testes manuais, até instrumentos mais complexos de bancada, como os de que utilizam técnicas de microfluídica.(60) Com relação aos seus benefícios destaca-se a portabilidade, fazendo com que os exames possam ser realizados no local aonde o paciente se encontra; interfaceamento digital com *softwares*, o qual pode tornar a informação acessível em qualquer serviço; velocidade na transmissão e acesso de resultados; simplicidade do ensaio e diminuição da subjetividade nos resultados; precisão; necessidade de menor quantidade de amostras; redução de erros; entre outros. A concepção do LOC foi um dos marcos que surgiram com o desenvolvimento da biotecnologia em pesquisa, no qual consiste na miniaturização de equipamentos e técnicas laboratoriais em biossensores eletroquímicos.(61)(62)

Sobre a miniaturização, uma importante tecnologia que ganha destaque em relação à obtenção de dispositivos de diagnóstico rápido é a nanotecnologia, mais especificamente para esse projeto, os nanomateriais. Dentre os diversos tipos de nanomateriais, as nanopartículas magnéticas ganham destaque devido à possibilidade de controle do sistema através de campo magnético externo .(63) As características principais para a aplicação de nanopartículas em dispositivos

rápidos são: alta área superficial, que permite a interação eficaz com moléculas ou biomoléculas utilizadas nos ensaios, a funcionalização simplificada da nanopartícula com a biomolécula de interesse e por fim o superparamagnetismo, essa última a característica principal que permite a separação dos elementos imobilizados a partir de campo magnético externo.(64)

Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com moléculas de terminação amina foram utilizadas nesse projeto. As nanopartículas comerciais foram gentilmente cedidas pela nChemi Engenharia de Materiais LTDA.

1.8 Biossensores

Os biossensores possuem diversas aplicações, como em análise de alimentos, controle ambiental, detecção clínica, indústrias farmacêuticas, agrícolas entre outras. Isso é justificado pela sua análise in situ, o seu fácil manuseio, alta precisão e desempenho em tempo real. Por ter várias aplicabilidades, os biossensores levaram a uma multidisciplinariedade, permitindo união de físicos, químicos, bioquímicos e engenheiros para o desenvolver dispositivos eletrônicos ágeis que podem ter um amplo campo de aplicações.(65)

Esses equipamentos são considerados dispositivos analíticos, na qual combinam a ligação de elemento biológico com dispositivos que fazem uma sinalização química (transdutores). A característica de transdução rápida, sensibilidade e especificidade de sinais bioquímicos para a detecção quer seja quantitativa ou semiquantitativa de analitos de interesse, são os fatores fundamentais para um biossensor ser viável em aplicações práticas.(66) O princípio básico, em qualquer tipo de combinação entre o transdutor e o analito biológico é produzir um sinal que possa ser relacionado com a quantidade do analito da amostra podendo ser úteis em áreas consideradas remotas do planeta.(67)

As interações biomoleculares são transformadas em sinais eletroquímicos que são recebidos e interpretados por um software, que gera a representação da interação que ocorre entre a biomolécula receptora e o analito de

interesse.(68) Vários biossensores usando anticorpos foram propostos na literatura. As sensibilidades dos teste são dependentes das propriedades do transdutor e da qualidade da molécula biorreceptora.(67) Por possuírem alta especificidade, sensibilidade, versatilidade e avanço tecnológico, estes dispositivos são utilizados no diagnóstico clínico(69). O dispositivo é composto por uma biomolécula receptora acoplado a um transdutor de sinal, o qual detecta a ligação de seus complementares, que corresponde à 5ª geração da tecnologia POC.(67)

A classificação desses biossensores se dá pelo tipo do biorreceptor ou pelo tipo de transdução realizada.(70) Quanto ao biorreceptor, eles podem ser denominados enzimáticos, quando o receptor for enzimas; celulares, quando for células e imunossensor quando for anticorpos. Algumas outras moléculas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA) também pode ser um tipo de biorreceptor. A geração de sinal desses biorreceptores (na forma de luz, calor, pH, mudança de carga ou massa, etc.) após a interação com o analito correspondente é denominado biorreconhecimento.(71) Com base no transdutor, os biossensores podem ser: eletroquímicos(72)(73), dentre as classes o mais comercializado; ópticos(74); piezoelétricos(75) e térmicos.(76)

Os biossensores eletroquímicos convertem informações biológicas em elétricas, fornecendo dados tanto qualitativos como quantitativos, baseando-se em reações que resultam na produção ou consumo de elétrons.(77) A alteração de corrente ou do potencial gerado a partir da eletro-redução ou eletro-oxidação que ocorrem durante a interação com o analito são mensuradas e são proporcionais ao tipo de analito utilizado.(78) Eles são reconhecidos pela capacidade de detectar mudanças diretas, que ocorrem na interação entre o biossensor e a amostra, não havendo necessidade de marcadores secundários ou sondas.(79)

Os biossensores eletroquímicos podem ser analisados por técnicas como a potenciométricas, amperométricas e voltamétricas.(80) Além dessas, outras técnicas também podem ser utilizadas, como a condutométricas e impedimétricas.(81) Os transístores potenciométricos utiliza como referência o potencial e a corrente constante. Já o amperométrico se baseia na mensuração de corrente em relação ao tempo em um potencial aplicado constantemente.

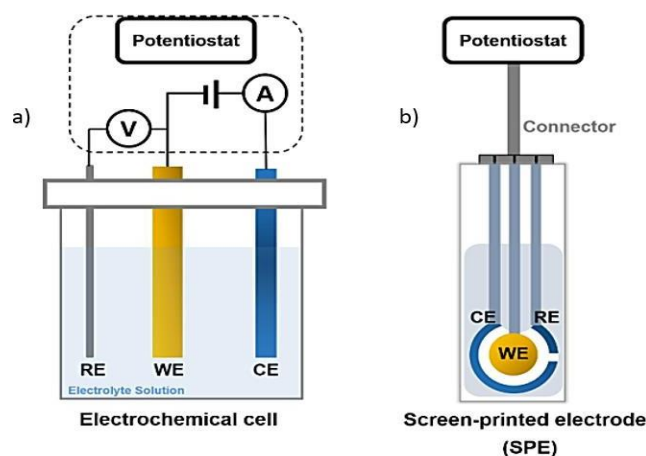
Com os transístores voltamétricos é possível obter resultados a respeito do potencial de oxirredução e adsorção do material contido no eletrodo e, nessa situação a variação da corrente é obtida em diferentes valores de potencial. Os condutométricos são capazes de identificar alterações na condutividade ocasionada na interação do biorreceptor e o analito. (82) Por último, a técnica de impedância eletroquímica é utilizada analisar as mudanças de capacitância ou resistência à transferência de carga elétrica.(83)

A escolha da voltametria cíclica baseia-se no fato de se tratar de um método eletroquímico e ser um método versátil para investigação científica e inovação devido ao fato da maioria dos processos envolver transferência de elétrons. Isto torna os processos passíveis de serem monitorados por esta técnica. A aplicabilidade deste método de leitura abrange caracterização, síntese, mecanismos e análise. Em todas as aplicações, a técnica pode funcionar bem com uma grande variedade de compostos, incluindo orgânicos, inorgânicos, polímeros, filmes e semicondutores, entre outros. Desta forma, a escolha deste método de leitura se torna relevante nesta fase de caracterização do IS. (84) Além, disso ela é utilizada para estudos de processos como os de redução e oxidação de espécies moleculares, cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e reações químicas acopladas a processos adsortivos.(85) Outra vantagem é que o equipamento pode ser levado aos hospitais e/ou residências, sendo vantajoso, uma vez que em algumas técnicas o equipamento necessita de um lugar estruturado, com uma bancada grande para comportar o equipamento e realizar os ensaios.

A detecção das reações eletroquímicas ocorre entre o contato na superfície do eletrodo de trabalho com a substância eletroativa do sistema que pode estar tanto adsorvida na superfície do eletrodo de trabalho, quando em solução, como é o caso das células eletroquímica. Nesse caso, ocorre uma alteração do intervalo pré-estabelecido do eletrodo de trabalho e há a aferição da corrente elétrica em cada potencial aplicado. A diferença de potencial é mensurada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, e a corrente é mensurada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. Essa leitura gera um gráfico que é exibido como corrente versus potencial em um voltamograma.(86)

O sistema estrutural para realização das análises é composto por três eletrodos: o eletrodo de trabalho, que possui função de elemento de transdução da reação bioquímica; o eletrodo de referência, cujo potencial é conhecido e estável; e o contra eletrodo, responsável por estabelecer uma conexão à solução eletrolítica de modo que uma corrente possa ser aplicada ao eletrodo de trabalho. Elementos como ouro, platina, carbono; por serem bons condutores e quimicamente estáveis são usualmente aplicados na composição de eletrodos. Esse sistema pode ser em eletrodos impressos ou em uma célula eletroquímica contendo os três eletrodos imersos em uma solução eletrolítica. É no eletrodo de trabalho que ocorre a interação biorreceptor e analito.(81)

Figura 4 - Representação esquemática de 2 tipos de biossensores eletroquímicos.



Fonte: Adaptado de Damiani S, 2020.(87) Legenda Em a) representação de uma célula eletroquímica e em b) a representação de um eletrodo impresso. Ambos demonstram o eletrodo de trabalho (WE), o eletrodo de referência (RE) e o contra eletrodo (CE). Além disso, a figura demonstra também esses eletrodos conectados a um potenciostato, que gera o potencial elétrico da reação.

Para que haja a imobilização de um componente biológico na superfície do IS é necessário uma matriz imobilizadora (polímero) para promover a estruturação do anticorpo para que ele mantenha sua conformidade e fixe a porção do fragmento cristalizável (Fc) do anticorpo na matriz, deixando a apresentação do fragmento *antigen-binding* (Fab) (sítio de reconhecimento) disponível para a reação antígeno-anticorpo. Para isso, definir o melhor polímero nem sempre é fácil. Polímeros naturais como quitina, quitosana, celulose e fibroína da seda (FS) veem sendo de interesse nos últimos anos como matriz de

imobilização (88)(89), uma vez que esses polímeros possuem propriedades físicas e estruturais que favorecem a estabilidade e atividade dessas biomoléculas, vide quadro abaixo. (90)

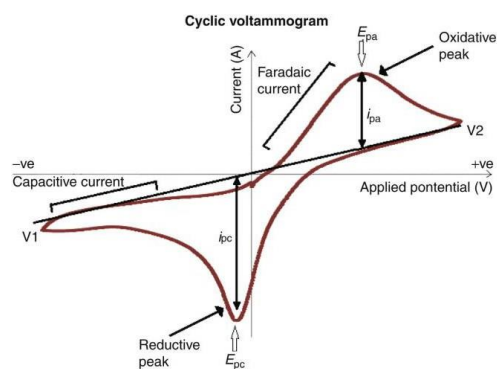
Quadro 6 – Polímeros frequentemente usados para construção de biossensores, suas origens e funções

Polímeros	Origem	Função
Quitina	Parede celular dos <u>fungos</u> e no exoesqueleto dos <u>artrópodes</u> .	Base para a produção de quitosana.
Quitosana	Obtido à partir da hidrólise da quitina, presente na estrutura de sustentação de insetos, crustáceos, cogumelos e fungos.	Atividade biológicas antifúngicas, antibacteriana, antitumoral, antitrombogênica, entre outros. Além disso, são utilizados como promotores de absorção e agentes hidratantes, cicatrização de feridas e para produção de filmes.
Polietilenoimina (PEI)	Polímero Sintético.	Possuem aminas favoráveis que fazem a interação com o grupo carboxílico do anticorpo.
Fibroína de seda	Produzida pelo <i>Bombyx mori</i> (bicho da seda) e extraída do seu casulo.	Possui propriedades mecânicas, estruturais, e é biocompatível.
Celulose	Encontrada na parede celular dos vegetais.	Por ser insolúvel em água, confere resistência às reações químicas.

Fonte: arquivo pessoal, 2020.

Na leitura do sinal é possível observar que no voltamograma identifica-se um pico de oxidação e um de redução. Esse evento ocorre devido a um aumento de potencial em voltagem de V_1 a V_2 e, gerado a oxidação do analito. Esse potencial aumenta até atingir o pico máximo de oxidação. Por outro lado, a corrente do sistema aumenta baseando-se na corrente captada. Esse episódio resulta no pico de oxidação, também chamado de anódico. Após atingir o pico máximo de oxidação, a corrente declina, e assim o potencial agora é lido negativamente e a corrente torna-se cada vez mais negativa até atingir o seu potencial máximo de redução, ou catódico, do analito e chegar no valor de início (figura 5).

Figura 5 – Ilustração de voltamograma



Fonte: Adaptado de Owen J. Guy and Kelly-Ann D. Walker, 2016(86).

1.9 Imunossensores

Os imunossensores são definidos como dispositivos analíticos, compactos, classificados dentro da tecnologia descrita como *Point-of-care / Lab-on-a-chip*. Estes micro dispositivos detectam e quantificam um analito alvo. Sua construção envolve 3 elementos fundamentais: um receptor biológico (antígeno/anticorpo) que detecta especificamente a molécula alvo; um transdutor, que interpreta o evento de reconhecimento biológico e o traduz em um sinal quantificável; e um *display* de processamento de sinal.(91)

A imobilização correta de anticorpos sobre uma superfície sólida é uma etapa crucial para o desenvolvimento de imunossensores pois envolve o biorreconhecimento. É a etapa que será responsável pela sensibilidade e confiabilidade analítica.

Essa imobilização, principalmente com moléculas ativas como anticorpos, em substratos sólidos é desafiadora para aplicação em imunossensores (92)(93), devido ao fato de que a organização estrutural que determina a atividade dessas biomoléculas é essencial para o funcionamento dos dispositivos e é bastante heterogênea.(94)

Dentre estas moléculas bioativas, a imunoglobulina (Ig) é a classe de proteínas de maior tamanho, com peso molecular variando de 160.000 daltons,

para IgG a 900.000 daltons para as IgM. A estrutura básica das Igs é composta por quatro cadeias polipeptídicas, duas pesadas (H) e duas leves (L), ligadas por ligações de dissulfeto. Ambas as cadeias têm regiões constantes (C) e variáveis (V). As regiões variáveis das cadeias H (VH) e L (VL) são responsáveis pelo reconhecimento e pela ligação com o antígeno. (95) Deste modo, a imobilização dos anticorpos deve ocorrer de tal modo que os sítios de reconhecimento fiquem livres (Fab), estáveis e expostos ao meio para que ocorra a interação antígeno-anticorpo.(96)

Existem diferentes técnicas de imobilização dos anticorpos, as mais utilizadas configura-se na confecção de filmes ultrafinos automontados cama por camada, pela técnica *LbL* (97) (98) com polímeros e anticorpos. Essa técnica foi desenvolvida por Decher *et al* (99)(100) e consiste em uma atração eletrostática entre as moléculas. Essa técnica de adsorção física é a mais adequada para imobilização de moléculas biológicas segundo a literatura, devido à sua versatilidade e processo de adsorção ocorrer em condições brandas, como soluções aquosas, pH e força iônica otimizadas,(92)(100) além de não ser necessário equipamentos sofisticados. A montagem do filme *LbL* é baseada nas interações intermoleculares entre os materiais, e por isso o interesse de encontrar o material apropriado para confecção da matriz de imobilização da biomolécula que permita manter sua função biológica específica.(101)(102) Desta forma gera-se a formação do filme que ocorre devido às interações eletrostáticas, bem como por ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals e hidrofóbicas.(102)

As interações entre moléculas geram efeitos cooperativos de atração em multipontos exercendo papel fundamental na imobilização. Neste caso a desnaturação da biomolécula durante a imobilização é minimizada. (103)(104) Assim, a imobilização do anticorpo pode ocorrer via interações com as regiões C-terminal das cadeias polipeptídicas, bem como com as cadeias laterais.

1.10 Justificativa

Estudo anterior conduzido por Romagnolo (2019) aprovado pelo CEP sob nº79265217.3.0000.5411 avaliou a possibilidade de construção de

imunossensor para tipagem sanguínea ABO. Os resultados obtidos elencaram as dificuldades e apontam necessidade de melhorias no processo que motivaram o delineamento do presente estudo.(16)

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o Brasil possui sistema hemoterápico que em 2018 foi responsável por 4.240.410 doações de sangue e 3.385.651 transfusões. Cada doação e cada transfusão envolveu 1 tipagem sanguínea. Além destes números, no mesmo ano foram registrados 2.890.000 nascimentos, que por lei, é obrigatória a tipagem sanguínea realizada no momento do parto, isto perfaz um montante de 10.516.061 testes realizados anualmente, não considerando os exames realizados em laboratórios clínicos e convênios, apenas informações do Portal da Saúde -DATASUS, portanto não inclui a estatística completa envolvendo a rede privada de assistência à saúde, que realiza em média 45% dos atendimentos (105). Analisando os dados do quadro 2 observa-se que no ano de 2018 o Sistema Único de Saúde (SUS) desembolsou para os serviços públicos brasileiros, especificamente a rede hemoterápica, a cifra de R\$125.256.943,04. Reafirmando, estes valores não levam em consideração as análises realizadas em laboratórios clínicos de rede privada, e outras causas de tipagem sanguínea que não as listadas no quadro (doador de sangue, receptor de transfusão em recém-nascido). Trata-se de um mercado importante, com interesses os mais diversos. Todos estes recursos envolvem cifras importantes de importação de materiais e testes diagnósticos que poderiam e deveriam estar sendo produzidos com tecnologia brasileira caminhando para autonomia nacional nesta área.

Quadro 2 – Dados DATASUS de procedimentos relacionados com tipagem sanguínea, no ano de 2018 com valor total desembolsado em reais

CÓDIGO PROCEDIMENTO SUS	DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS	VALOR UNITÁRIO (EM R\$)	NÚMERO DE EXAMES ANO BASE 2018	VALOR TOTAL ANUAL PAGOS PELO SUS EM REAIS
0212010018	Exames imuno-hematológicos em doador de sangue	15,00	4.240.410	63.606.150,00
0212010026	Exames pré-transfusionais I/II	17,04	3.385.651	57.691.493,04
0202120023	Determinação direta e reversa de grupo ABO (RN)	1,37	2.890.000	3.959.300
TOTAL ANUAL			10.516.061	125.256.943,04

Fonte: extraído de Tabnet Win.32 – DATASUS:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/pnvuf.def> acesso em 12/10/2020.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Construção de imunossensor impresso para realização de tipagem sanguínea ABO utilizando anticorpos monoclonais murinos produzidos *home made*.

2.2 Objetivos Específicos

- Purificação dos anticorpos monoclonais anti-A e anti-B produzidos *home made*
- Imobilização dos anticorpos monoclonais anti-A e anti-B em filmes automontados camada por camada (*LbL*) contendo polímero quitosana – que foi usado como matriz de imobilização dos anticorpos.
- Otimização das condições de deposição e análise das interações polímero-anticorpo.
- Detecção dos antígenos ABO em amostras reais utilizando métodos eletroquímicos.

7 Referências Bibliográficas

1. Yang P, Wang X. COVID-19: a new challenge for human beings. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2020;17(5):555–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0407-x>
2. Casas CPR, Silva J, Castro R, Ribeiro-Alves M, Franco CM. Avaliação de tecnologias em saúde: Tensões metodológicas durante a pandemia de Covid-19. *Estud Avancados*. 2020;34(99):77–96.
3. BRASIL/ANVISA. Segurança Transfusional. 2012. 468 p.
4. Ali M, Hassan A, Wahab Mohammad A, Rahman BA. MAMMALIAN CELL CULTURE CLARIFICATION: A CASE STUDY USING CHIMERIC ANTI-CEA MONOCLONAL ANTIBODIES. Vol. 12, *Biotechnology Abol Hassan et al. IIUM Engineering Journal*. 2011.
5. Nichols JH. Point-of-care testing [Internet]. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. INC; 2020. 323–336 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00019-3>
6. Azizipour N, Avazpour R, Rosenzweig DH, Sawan M, Aiji A. Evolution of biochip technology: A review from lab-on-a-chip to organ-on-a-chip. *Micromachines*. 2020;11(6):1–15.
7. Ianni A. Considerations on Underground Laboratories. *J Phys Conf Ser*. 2020;1342(1).
8. Osredkar J. Point-of-Care testing in laboratory medicine. *Point-of-Care Diagnostics - New Progresses Perspect*. 2017;(May):1–28.
9. Harvey AR, Basavaraju S V., Chung KW, Kuehnert MJ. Transfusion-related adverse reactions reported to the National Healthcare Safety Network Hemovigilance Module, United States, 2010 to 2012. *Transfusion*. 2015;55(4):709–18.
10. Castilho L. Imuno-hematologia molecular: Onde estamos e para onde vamos? *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(4):216–7.
11. Oliveira MBSC, Ribeiro FC, Vizzoni AG. Conceitos básicos e aplicados em imuno-hematologia. *Epsjv* [Internet]. 2013;1–156. Available from: <http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/Material/L226.pdf>
12. Brasil. Ministério da Saúde. Imuno-Hematologia Laboratorial [Internet]. Editora MS. 2014. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/imuno_hematologia_laboratorial.pdf
13. Porcel G. A economia criativa e a criação de valor compartilhado : o papel destes modelos frente ao atual momento econômico-social. 2019;168–84.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 7º Boletim de Produção Hemoterápica – Hemoprod 2018. Anvisa [Internet]. 2020;2001. Available

from:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/4048533/4993603/7°+Boletim+de+Produção+Hemoterápica/9ec3ceba-8e20-4aa6-8aa2-d5f953afcf5c>

15. Campana GA, Oplustil CP. Conceitos de automação na medicina laboratorial: revisão de literatura. *J Bras Patol e Med Lab*. 2011;47(2):119–27.
16. Romagnolo AG. IMUNOSENSOR PARA TIPAGEM SANGUÍNEA ABO. Universidade Estadual Paulista; 2019.
17. Hiramoto E, Tsutsumi A, Suzuki R, Matsuoka S, Arai S, Kikkawa M, et al. The IgM pentamer is an asymmetric pentagon with an open groove that binds the AIM protein. *Sci Adv*. 2018;4(10):26–9.
18. Franchini M, Liunbruno GM. ABO blood group : old dogma , new perspectives. 2013;51(8):1545–53.
19. Jeyakanthan M, Tao K, Zou L, Meloncelli PJ, Lowary TL, Suzuki K, et al. Chemical Basis for Qualitative and Quantitative Differences between ABO Blood Groups and Subgroups: Implications for Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(10):2602–15.
20. Ewald DR, Sumner SCJ. Blood type biochemistry and human disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8(6):517–35.
21. Morgan WTJ, Watkins WM. <Morgan and Watkins 2000_Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic sp.pdf>. 2001;
22. Patenaude SI, Seto NOL, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM, et al. The structural basis for specificity in human abo(h) blood group biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 2002;9(9):685–90.
23. Cardoso RA. Anticorpos monoclonais em imunohematologia [Internet]. Estadual Paulista UNESP; 2010. Available from: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/88059/cardoso_ra_me_botfm.pdf?sequence=1&isAllowed=y
24. Angulo IDL. Modern hemotherapy, ancient practices. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(2):108–108.
25. Liu IP. ANÁLISE DE RESULTADOS DA TIPAGEM SANGUÍNEA ANTES E APÓS A IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE SEMIAUTOMAÇÃO. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRS; 2012.
26. Bajpai M, Kaur R, Gupta E. Automation in Immunohematology. 2012;6(2):140–5.
27. Gupte S. Automation in Blood Centre: Its impact on Blood Safety. *Asian J Transfus Sci*. 2015;9(3):6.
28. Ledford H. ‘ Biosimilar ’ drugs poised to penetrate market. *Nature*. 2010;469:18–9.
29. Vidal TJ, Figueiredo TA, Pepe VLE. The brazilian market for monoclonal antibodies used in cancer treatment. *Cad Saude Publica*. 2018;34(12):1–14.

30. Santis LP de. Análise proteômica na caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários e leucocitários humanos. Universidade estadual Paulista julio de mesquita Filho - UNESP; 2018.
31. Barreiro K, Holthofer H. Urinary extracellular vesicles . A promising shortcut to novel biomarker discoveries. 2017;217–27.
32. Alvarado R de C. Identificação e Avaliação dos Custos envolvidos no processo de obtenção de hemocomponentes no Hemocentro de Botucatu, Ano de Obtenção: 2002. UNESP; 2002.
33. KÖHLER, G.; MILSTEIN C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495–7.
34. Deffune E. Preparation d'anticorps monoclonaux murins anti-complément. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI/France; 1989.
35. ANVISA. Resolução - RDC N° 34 de 11 de Junho de 2014. 11 Junho 2014 [Internet]. 2014;79. Available from: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20170553/04145350-rdc-anvisa-34-2014.pdf>
36. Smith K, Garman L, Wrammert J, Zheng NY, Capra JD, Ahmed R, et al. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen. *Nat Protoc*. 2009;4(3):372–84.
37. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2 SUPPL. 2):S41–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
38. Hirvonen T, Suila H, Tiitinen S, Natunen S, Laukkanen M-L, Kotovuori A, et al. Production of a Recombinant Antibody Specific for i Blood Group Antigen, a Mesenchymal Stem Cell Marker. *Biores Open Access*. 2013;2(5):336–45.
39. Vicentini-Oliveira JC, Golim MA, de Cássia Paulan S, Biondi GF, Rossi-Ferreira R, Deffune E, et al. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. *Exp Parasitol*. 2010;126(4).
40. Makroo R, Arora B, Bhatia A, Chowdhry M, Luka R. Clinical significance of antibody specificities to M, N and Lewis blood group system. *Asian J Transfus Sci*. 2014;
41. Marks L. Monoclonal antibodies and the transformation of blood typing. *MAbs*. 2014;6(6):1362–7.
42. Moh ESX, Lin CH, Thaysen-Andersen M, Packer NH. Site-Specific N-Glycosylation of Recombinant Pentameric and Hexameric Human IgM. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2016;27(7):1143–55.
43. Solomon A, McLaughlin CL. Biosynthesis of low molecular weight (7S) and high molecular weight (19S) immunoglobulin M. *J Clin Invest*. 1970;49(1):150–60.

44. Gautam S, Loh KC. Immunoglobulin-M purification - challenges and perspectives. *Biotechnol Adv.* 2011;29(6):840–9.
45. Gambero S, Secco VNDP, Ferreira RR, Deffune E, Machado PEA. Frequência de hemolisinas anti-A e anti-B em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2004;26(1):28–34.
46. Beck ML. Monoclonal antibodies as blood grouping reagents. *Immunochemistry.* 1999;15(1):10–4.
47. Ritter MA, Ladyman HM. *Monoclonal Antibodies: production, engineering and clinical application.* 5th ed. Press CU, editor. Great Britain; 1995.
48. Kruse T, Schmidt A, Kampmann M, Strube J. Integrated Clarification and Purification of Monoclonal Antibodies by Membrane Based Separation of Aqueous Two-Phase Systems. *Antibodies.* 2019;8(3):40.
49. Singh N, Arunkumar A, Chollangi S, Tan ZG, Borys M, Li ZJ. Clarification technologies for monoclonal antibody manufacturing processes: Current state and future perspectives. *Biotechnol Bioeng.* 2016;113(4):698–716.
50. Buyel JF, Twyman RM, Fischer R. Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2017;35(4):458–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.011>
51. Liu HF, Ma J, Winter C, Bayer R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs.* 2010;2(5):480–99.
52. Clark R. *At Least 11 Things You Didn't Know about Filtration (but you should, because you probably do it all the time).* 2018.
53. Wessner M, Nowaczyk M, Brandenbusch C. Rapid identification of tailor-made aqueous two-phase systems for the extractive purification of high-value biomolecules. *J Mol Liq* [Internet]. 2020;314:113655. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113655>
54. Fischmann JB, Berg EA. *Antibodies.* Press CSHL, editor. 2018. 153 p.
55. Verinaud CI. *Desenvolvimento de duas estratégias para purificação de IgM a partir do plasma Humano.* Universidade de São Paull; 2012.
56. Kilikian BV, Jr AP. *Purificação de produtos biotecnológicos.* Manole; 1994.
57. Mahassni SH, Klapper DG, Hiskey RG. Purification of a murine IgM monoclonal antibody. *Hybridoma.* 2009;28(3):189–97.
58. Müller R, Gräwert MA, Kern T, Madl T, Peschek J, Sattler M, et al. High-resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(25):10183–8.
59. Syedmoradi L, Daneshpour M, Alvandipour M, Gomez FA, Hajghassem H, Omidfar K. *Biosensors and Bioelectronics Point of care testing : The impact of nanotechnology.* 2017;87:373–87.

60. Regan B, Kennedy RO, Collins D. Point-of-Care Compatibility of Ultra-Sensitive Detection Techniques for the Cardiac Biomarker Troponin I — Challenges and Potential Value. 2018;1–32.
61. Gamulin S. The forthcoming era of precision medicine. 2016;45(2):152–7.
62. Epstein RM, Street RL. The Values and Value of Patient-Centered. 2011;9(2):100–3.
63. Zhao J, Zhu Z, Huang X, Hu X, Chen H. Magnetic gold nanocomposite and aptamer assisted triple recognition electrochemical immunoassay for determination of brain natriuretic peptide. *Microchim Acta* [Internet]. 2020;187(4):1–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00604-020-4221-z>
64. Lima J De, Furlani I, Silva L Da, Valverde A, Cass Q. Micro- And nano-sized amine-terminated magnetic beads in a ligand fishing assay. *Anal Methods* [Internet]. 2020;12(33):4116–22. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/ay/d0ay01269f%0A%0A>
65. Sunil K, Chaubey A, D Malhotra. Fundamentals and Applications of Biosensors. *Proc Indian Natn Sci Acad.* 2006;72(4).
66. Das P, Das M, Chinnadayala SR, Manoj I. Biosensors and Bioelectronics Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. *Biosens Bioelectron.* 2016;79:386–97.
67. Buerk D. Biosensors: theory and applications. 2ª edição. Lancaster: Technomic Publishing Co. In 1993.
68. MacPherson MJ, Ravichandriran M. Lab-on-a-chip technology: the future of point- of-care diagnostic ability. *Med Technol.* 2014;80(1):24–6.
69. Byrne B, Stack E, Gilmartin N, Kennedy RO. Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. 2009;(Table 1):4407–45.
70. Yang J, Wang K, Xu H, Yan W, Jin Q, Cui D. Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review. *Talanta* [Internet]. 2019;202(January):96–110. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.054>
71. Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem.* 2016;60:1–8.
72. Kalambate PK, Dhanjai, Sinha A, Li Y, Shen Y, Huang Y. An electrochemical sensor for ifosfamide , acetaminophen , domperidone , and sumatriptan based on self-assembled MXene / MWCNT / chitosan nanocomposite thin film. *Microchim Acta.* 2020;187(7):402.
73. Cho I, Kim DH, Park S. Electrochemical biosensors : perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomater Res.* 2020;24(1):1–12.
74. Bae JW, Seo H Bin, Belkin S, Gu MB. An optical detection module-based

- biosensor using fortified bacterial beads for soil toxicity assessment. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412:3373–3381.
75. Singh S, Kumar V, Dhanjal DS, Datta S, Prasad R, Singh J. Biological Biosensors for Monitoring and Diagnosis. *Microb Biotechnol Basic Res Appl.* 2020;317–335.
 76. Ramanathan K, Danielsson B. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2001;16:417–23.
 77. Thevenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Technical report Electrochemical biosensors : recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(2001):121–31.
 78. Hammond JL, Formisano N, Estrela P, Carrara S, Tkac J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays Biochem.* 2016;60:69–80.
 79. Ali AA, Altemimi AB, Alhelfi N, Ibrahim SA. Application of Biosensors for Detection of Pathogenic Food Bacteria : A Review. *Biosensor.* 2020;10(6):58.
 80. Zhu Y, Cao Y, Sun X, Wang X. Amperometric immunosensor for carbofuran detection based on MWCNTs/GS-PEI-Au and AuNPS-antibody conjugate. *Sensors (Switzerland).* 2013;13(4):5286–301.
 81. Lakshmipriya T, Gopinath SCB. An Introduction to Biosensors and Biomolecules. In: *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting.* Elsevier; 2019. p. 1–21.
 82. Dorothee G, MacKenzi R, Janos Voros, Reimhult E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors.* 2008;8(January):1400–58.
 83. Cecchetto J, Fernandes FCB, Lopes R, Bueno PR, Unesp P, Paulo S, et al. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. *Biosens Bioelectron.* 2017;87(June 2016):949–56.
 84. Chooto P. Cyclic Voltammetry and Its Applications. *Voltammetry.* 2019;
 85. Pacheco WF, Semaan FS, Almeida VGK De, Ritta AGSL, Aucélio Q. Artigo Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Voltammetry : A Brief Review About Concepts Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. 2013;5(4):516–37.
 86. Guy OJ, Walker K-AD. Graphene Functionalization for Biosensor Applications. In: *Silicon Carbide Biotechnology .* Elsevier; 2016. p. 85–141.
 87. Damiati S, Schuster B. Electrochemical Biosensors Based on S-Layer Proteins. *Sensors.* 2020;20:1721.
 88. Rusling JF, Wang B, Yun SE, 2008. Electrochemistry of redox enzymes. In: 83 Bartlett, P.N. (Ed.), *Bioelectrochemistry, Fundamentals, Experimental Techniques and Applications.* John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.

89. Qi Z, Saito T, Fan Y, Isogai A. Multifunctional Coating Films by Layer-by-Layer Deposition of Cellulose and Chitin Nanofibrils. *Biomacromolecules*. 2012;13:553–558.
90. Nogueira GM, Swiston AJ, Beppu MM, Rubner MF. Layer-by-Layer Deposited Chitosan / Silk Fibroin Thin Films with Anisotropic Nanofiber Alignment. *Langmuir*. 2010;26(17):8953–8.
91. Bueno JL, Peyman SA. A review on impedimetric immunosensors for pathogen and biomarker detection. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(3):343–62.
92. Ronkainen NJ, Brian H, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*. 2010;39:1747–63.
93. Gonçalves JM, Lima LR, Moraes ML, Ribeiro SJL. Immunosensor for diagnosis of Alzheimer disease using amyloid- β 1 – 40 peptide and silk fibroin thin films. *Mater Sci Eng C*. 2016;68:338–42.
94. Kondzior M, Grabowska I. Antibody-electroactive probe conjugates based electrochemical immunosensors. *Sensors (Switzerland)*. 2020;20(7).
95. Lehninger A, Nelson D, MM Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. 3ª edição. New York: Worth Publishers; 2000.
96. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHI V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
97. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies : Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science (80-)*. 1997;277:1232–1237.
98. Netzer L, Iscovici R, Sagiv J. Adsorbed monolayer versus Langmuir-Blodgett monolayers – Why and how? I: From monolayer to multilayer, by adsorption. *Thin Solid Film*. 1983;99:235–41.
99. Lvov Y, Decher G, Mohwald H. Assembly, Structural Characterization, and Thermal Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(vinyl sulfate) and Poly(allylamine). *Langmuir*. 1993;9:481–6.
100. Ariga K, Lvov Y, Kunitake T. Assembling Alternate Dye - Polyion Molecular Films by Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J Am Chem Soc*. 1997;119:2224–31.
101. Ariga K, Hill JP, Ji Q. Biomaterials and Biofunctionality in Layered Macromolecular Assemblies. *Macromol Biosci*. 2008;8:981–90.
102. Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P, Kotov N. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Adv Mater*. 2006;18:3203–24.
103. Netzer L, Sagiv J. A New Approach to Construction of Artificial Monolayer Assemblies. *J Am Chem Soc*. 1983;105:674–6.
104. Bongiovanni C, Ferri T, Poscia A, Varalli M, Santucci R, Desideri A. An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. *Bioelectrochemistry*. 2001;54:17–22.

105. Saúde M da. Portal da Saúde [Internet]. 208. [cited 2020 Nov 12]. Available from:
<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0201>
106. Do MH, Dubreuil B, Peydecastaing J, Vaca-Medina G, Nhu-Trang TT, Jaffrezic-Renault N, et al. Chitosan-based nanocomposites for glyphosate detection using surface plasmon resonance sensor. *Sensors (Switzerland)*. 2020;20(20):1–19.
107. Yokomichi ALY, Rodrigues V da C, Moroz A, Bertanha M, Ribeiro SJL, Deffune E, et al. Detection of factor VIII and D-dimer biomarkers for venous thromboembolism diagnosis using electrochemistry immunosensor. *Talanta [Internet]*. 2020;219:121241. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121241>
108. Mullerpatan A, Kane E, Ghosh R, Nascimento A, Andersen H, Cramer S, et al. Single-step purification of a small non-mAb biologic by peptide-ELP-based affinity precipitation. *Biotechnol Bioeng*. 2020;(May):1–10.
109. Andrew SM, Titus JA, Zumstein L. Txa03H.Pdf. 2001;1–5.
110. Instituto Dante Pazzanese. Cálculo do tamanho amostral [Internet]. São Paulo; 2019. Available from:
<http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/amostra.html>
111. Ramadhin J, Silva-Moraes V, Norberg T, Harn D. Monoclonal Antibodies Generated against Glycoconjugates Recognize Chemical Linkers. *Antibodies*. 2020;9(3):48.
112. Vilaseca JC, Pupo M, Bernal M, Matamoros L, Gordillo S, Rodríguez H, et al. Quantitative ELISA for mouse monoclonal antibody determination in culture supernatants and in human serum. *Hybridoma*. 1997;16(6):557–62.
113. Nodarse JF, Méndez JCV, Antúnez MP, Gonzáles AA. A microELISA for the quantitation of mouse monoclonal IgM in hybridoma culture supernatants. *Biotecologia Apl*. 2000;17(2):105–8.
114. Brasil. Ministério da Saúde. Técnico em hemoterapia: livro texto [Internet]. 2013. 294 p. Available from:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_hemoterapia_livro_texto.pdf
115. India M da S. Guidance Manual “Quality Control of ABO and Rh blood grouping reagents” [Internet]. noida; 2017. Available from:
http://www.nib.gov.in/guidance_document/Guidance_manucal_QC_ABO_Rh_blood_grouping_reagents.pdf
116. Cytiva. How to combine chromatography techniques to purify an antibody [Internet]. 2020. Available from:
<https://www.cytivalifesciences.com/en/no/solutions/protein-research/knowledge-center/protein-purification-methods/how-to-combine-chromatography-techniques/antibody-purification-protocols>
117. Kotatha D, Torii Y, Shinomiya K, Ogino M, Uchida S, Ishikawa M, et al.

Preparation of thin-film electrolyte from chitosan-containing ionic liquid for application to electric double-layer capacitors. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;124:1274–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.006>

118. OLIVEIRA JCV DE. DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL EM FIBROÍNA DA SEDA PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA CISTICERCOSE BOVINA. 2014.
119. Oliveira J, Biondi G, Nunes C, Ribeiro A, Moraes ML, Lima L, et al. IMUNOSENSOR PARA APLICAÇÃO DIAGNÓSTICA DA CISTICERCOSE BOVINA. *Brasil; BR10201503044*, 2015. p. 12.
120. Anani WQ, Ashwood HE, Schmidt A, Burns RT, Denomme GA, Hoffmeister KM. Predictive modeling of complex ABO glycan phenotypes by lectin microarrays. *Blood Adv.* 2020;4(16):3960–70.
121. Cooling L. Blood groups in infection and host susceptibility. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):801–70.
122. Hult AK, Dykes JH, Storry JR, Olsson ML. A and B antigen levels acquired by group O donor-derived erythrocytes following ABO-non-identical transfusion or minor ABO-incompatible haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med.* 2017;27(3):181–91.
123. Koo B, Jin CE, Bae M, Jang YO, Kim JY, Kim SH, et al. Detection of *Coxiella burnetii* using silicon microring resonator in patient blood plasma. *Micromachines.* 2019;10(7):1–9.
124. Godin MM, Souza L de O, Schmidt LC, Vieira LM, Diniz RS, Dusse LMSA. Dangerous universal donors: the reality of the Hemocentro in Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2016;38(3):193–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.05.007>
125. Rahim S, Jan Iftikhar F, Malik MI. Biomedical applications of magnetic nanoparticles [Internet]. *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications*. Elsevier Inc.; 2019. 301–328 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00016-1>
126. Mollarasouli F, Zor E, Ozcelikay G, Ozkan SA. Magnetic nanoparticles in developing electrochemical sensors for pharmaceutical and biomedical applications. *Talanta* [Internet]. 2021;226(January):122108. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122108>
127. Yiu HHP. Engineering the multifunctional surface on magnetic nanoparticles for targeted biomedical applications: A chemical approach. *Nanomedicine.* 2011;6(8):1429–46.

8 Anexo

Ofício Sigilo de Patente



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Ofício nº 71/2020 – PGPDBM/STPG-FMB.

Botucatu, 09 de dezembro de 2020.

Ao Repositório Institucional UNESP

Prezados Senhores,

Ad referendum em 29/10/2020 do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica, Mestrado e Doutorado Profissionais, aprovo a não inserção da dissertação da discente: Pâmela Leite da Silva, orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune, no Repositório Institucional UNESP por motivo de potencial de patente.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Coordenador do Conselho Programa de Pós-Graduação em
Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica,
Mestrado e Doutorado Profissionais – FMB/UNESP