

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**Programa de Pós Graduação – Mestrado Profissional**  
**Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica**

**ANTICORPOS MONOCLONAIS**  
**EM IMUNOHEMATOLOGIA**

**Regina Aparecida Cardoso**

**Botucatu - SP**  
**2010**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU**

**Programa de Pós Graduação – Mestrado Profissional**  
**Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica**

**ANTICORPOS MONOCLONAIS**  
**EM IMUNOHEMATOLOGIA**

**Orientada: Regina Aparecida Cardoso**  
**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Deffune**

**Botucatu - SP**  
**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus*

Cardoso, Regina Aparecida.

Anticorpos monoclonais em imuno-hematologia / Regina Aparecida Cardoso. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Elenice Deffune

Assunto CAPES: 40101150

1. Imuno-hematologia    2. Biotecnologia médica

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, D categoria IV<sup>a</sup> e D parcial.

# Dedicatória

*Ao meu pai José Augusto Cardoso.*

*Meu eterno exemplo de vida.*

*Pelo amor, apoio e incentivo, em todas as fases de minha vida.*

*À minha mãe Maria Gloria, por toda a dedicação e confiança.*

*Pelo amor, apoio e presença constante.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, sobretudo, pela minha existência.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Deffune pela orientação indispensável na realização deste trabalho e por me abrir as portas do seu laboratório. Pela competência, exemplo de profissional e exemplo de vida. Muito Obrigada!*

*Ao Dr. Silvano Wendel e Dr<sup>a</sup>. Rita Fontão Wendel, por me apoiarem e abrirem as portas do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês. Pela competência, profissionalismo, contribuição na minha formação em Hemoterapia e Imuno-hematologia e realização deste projeto.*

*À minha família por me apoiarem sempre. Vocês são muito importantes!*

*À minha irmã Rita de Cássia, pelo apoio, estímulo e ajuda na construção deste trabalho. Saiba que você foi muito importante!*

*À Dr<sup>a</sup>. Rosana Rossi Ferreira, pela amizade, apoio e colaboração neste projeto.*

*Ao Biotério do Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB (UNESP-Botucatu) pela manutenção dos animais utilizados para esta pesquisa, em especial ao Carlinhos, pelo cuidado com os camundongos e pela ajuda na imunização. Obrigada!*

*À toda equipe do Laboratório de Engenharia Celular: Daniel, Priscila, Tata, Thaiane e Vitória, por toda a ajuda dispensada para a realização desta pesquisa.*

*À Tata, pela colaboração na produção dos anticorpos. Muito obrigada!*

*À Priscila Murador, pela amizade e incentivo neste projeto. Obrigada por tudo!*

*À Josy que tanto me ajudou neste projeto. Saiba que você foi muito importante. Muito obrigada!*

*À Vitória, que me ajudou e me ensinou muito. Sentirei saudades! De coração, muito obrigada!*

*Ao Daniel, que contribuiu muito na execução de alguns testes. Obrigada!*

*À Dr<sup>a</sup>. Márjorie de Assis Golim pela realização dos estudos de citometria de fluxo.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês de Moura Campos Pardini pela oportunidade da realização deste Mestrado profissional.*

*À Janice, Rita e Cléo por todo apoio nestes dois anos.*

*À bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.*

*À toda equipe do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, que de forma direta ou indireta me ajudaram neste projeto.*

*À equipe de convocação do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês: Alânia, Nanci e Angélica, assim como às médicas Dra. Ruth e Dra. Sylvia pelo contato com os doadores. Muito obrigada!*

*À toda equipe do SENAC: coordenação, docentes e alunos, que foram o incentivo inicial deste meu mestrado.*

*Às amigas Ana Lucia Girello e Telma Ingrid pelo apoio e confiança. Muito obrigada!*

*Aos meus amigos, pela torcida. Muito Obrigada!*

*A todos que, de alguma maneira, contribuíram para esta pesquisa.*

*Não posso deixar de agradecer aos camundongos, indispensáveis neste projeto!*

Cardoso, R.A. **Anticorpos monoclonais em Imuno-hematologia**. Botucatu, 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação: Pesquisa e Desenvolvimento Biotecnologia Médica – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, UNESP.

## **RESUMO**

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais revolucionou a investigação diagnóstica, especialmente a análise dos grupos sanguíneos em imuno-hematologia. O polimorfismo das hemácias humanas torna a produção de novos insumos extremamente necessária. Dentre os sistemas de grupos sanguíneos descritos, o sistema Rh tem se mostrado um dos mais complexos pela vasta composição de antígenos. Analisando aspectos estruturais do antígeno D associado às técnicas de biologia molecular, identificam-se numerosas variantes deste antígeno por trocas de DNA entre genes similares levando a alteração de epítomos e consequentemente de padrão de expressão fenotípica na superfície das hemácias. Desvendar e identificar estas variantes com insumos biotecnológicos desenvolvidos no país foi o desafio desta pesquisa, onde anticorpos monoclonais contra antígenos eritrocitários foram produzidos através de fusão celular, utilizando-se células de baço de camundongos BALB/c imunizados com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup>. Nove fusões foram realizadas e os sobrenadantes de cultura foram triados por teste de hemaglutinação em microplacas. Foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido 41 híbridos. Estes híbridos foram clonados e mantidos em meio de cultura para a obtenção dos anticorpos monoclonais, resultando em 12 clones IgG<sub>1</sub>, 5 IgG<sub>2a</sub> e 10 IgM. Os clones foram selecionados para produção de líquido ascítico, através da injeção dos clones em camundongos BALB/c. Os anticorpos monoclonais produzidos, inicialmente não demonstraram a especificidade foco do presente trabalho que foi a produção de anticorpos anti-D, no entanto, os hibridomas podem ter secretado diferentes especificidades de anticorpos monoclonais, de acordo com os antígenos presentes na membrana das hemácias utilizadas para a imunização dos camundongos.

Uma segunda fase da pesquisa está sendo feita para confirmação da(s) especificidade(s) dos anticorpos monoclonais produzidos, utilizando novos testes para a identificação das imunoglobulinas.

**Palavras-chave:** Anticorpo monoclonal, D categoria IV<sup>a</sup>, D parcial.

Cardoso, R.A. **Anticorpos monoclonais em Imuno-hematologia**. Botucatu, 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação: Pesquisa e Desenvolvimento Biotecnologia Médica – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, UNESP.

## **ABSTRACT**

The blood groups analyses in immunohematology have been highly benefited based on the advance of the monoclonal antibody technology improvement on diagnostics investigation. The human red blood cell polymorphism increases the need for new alternatives. The Rh system blood group is the most complex of all, due to the vast antigenic composition. When analyzing the structural aspects of the D antigen in combination with the molecular techniques, based upon DNA exchange between similar genes it is possible to identify a huge number of partial D variants, this situation leads to a change of epitopes and hence the red blood cell phenotypic expression pattern. Unveil and identify these variables through the use of local biotechnology was the challenge of this research. Monoclonal antibodies against human red blood cell were produced by cell fusion, using spleen cells from immunized BALB/c mice and DIV<sup>a</sup> red blood cells. Nine fusions had been made and the culture supernatants were selected to the hemagglutination test using microplates. Forty-one hybrids had been frozen and kept in liquid nitrogen. These hybrids had been cloned and kept in the culture to collect monoclonal antibodies, resulting in 12 IgG1, 5 IgG<sub>2a</sub> e 10 IgM. The clones had been selected for ascitic fluid production, by injection in BALB/c mice. The monoclonal antibodies produced initially had not produced the anti-D as expected by the research. However, the hibrydomas could have created different specificities of monoclonal antibodies, according to the antigen located in the donor red blood cells membrane used in the mice's immunization.

The second phase of the research is being done to confirm the monoclonal antibodies specificities produced through the deployment of new tests to immunoglobulin identification.

Key words: Monoclonal Antibody, Category D IV<sup>a</sup>, Partial D.



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Protocolo de Imunização em camundongos BALB/c com hemácias DIV <sup>a</sup> e hemácias DIV <sup>a</sup> tratadas com enzima papaína .....	34
Quadro 2 – Pannel de anticorpos monoclonais (workshop internacional) dos doadores utilizados no protocolo de imunização .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Híbridos construídos nos protocolos de imunização utilizando como antígeno hemácias Rh(D)+ fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> (DIVS) e hemácias D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína (DIVSP) segundo o rendimento. ....44

Tabela 2 – Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> (DIVS) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por hemaglutinação .....46

Tabela 3 – Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína (DIVSP) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por hemaglutinação.....47

Tabela 4 – Classe e sub-classe, determinada por citometria de fluxo, dos anticorpos produzidos pelos clones obtidos nos protocolos de imunização com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> (DIVS) e com hemácias D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína (DIVSP) .....49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação Esquemática dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária.....	15
Figura 2: Antígenos do sistema Rh e a classificação segundo a ISBT.....	19
Figura 3: Genes do sistema Rh .....	20
Figura 4: Proteína RhD.....	22
Figura 5: Variantes do antígeno D .....	24
Figura 6: Categorias de antígeno D.....	24
Figura 7: Produção de Anticorpos Monoclonais .....	26
Figura 8: Aspecto fotomicrográfico logo após a fusão celular .....	28
Figura 9: Kit comercial para caracterização sorológica de antígenos D parciais.....	30
Figura 10: Técnica de PCR multiplex para caracterização molecular do gene <i>RHD</i> .....	33
Figura 11: Técnica de PCR multiplex para caracterização molecular do gene <i>RHD</i> dos doadores utilizados na imunização dos camundongos .....	43
Figura 12: Desempenho da reatividade dos sobrenadantes de cultura dos híbridos reagentes ao longo do tempo (DIVS).....	45
Figura 13: Desempenho da reatividade dos sobrenadantes de cultura dos híbridos reagentes ao longo do tempo (DIVSP) .....	45
Figura 14: Técnica clássica de eletroforese em gel de agar a 1% .....	48

Figura 15: Método de imunoprecipitação Ouchterlony .....48

Figura 16: Determinação de Classe e Subclasse de Imunoglobulinas murinas  
pelo método *CBAFlow* (BD Bioscience®).....50

## SUMÁRIO

RESUMO .....	6
ABSTRACT .....	7
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 MEMBRANA E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS.....	14
1.2 SISTEMA RH .....	16
1.2.1 NOMENCLATURA .....	18
1.2.2 PROTEÍNAS E GENES.....	19
1.3 ANTÍGENO D (RH1).....	21
1.4 ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	25
2. OBJETIVOS .....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 OBTENÇÃO DAS HEMÁCIAS FENOTIPADAS .....	32
3.2 PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO.....	33
3.3 FUSÃO CELULAR.....	35
3.4 SELEÇÃO DOS HIBRIDOMAS (TRIAGEM) .....	36
3.5 EXPANSÃO DOS HÍBRIDOS EM CULTURA .....	37
3.6 VIABILIDADE CELULAR.....	37
3.7 CLONAGEM.....	38
3.8 DETERMINAÇÃO DA CLASSE E SUB-CLASSE DAS IMUNOGLOBULINAS PRODUZIDAS .....	38
3.9 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR PRODUÇÃO DE LÍQUIDO ASCÍTICO.....	39
3.10 AVALIAÇÃO ELETROFORÉTICA DA MONOCLONALIDADE .....	40
3.11 CONFIRMAÇÃO DE ESPECIFICIDADE E VALIDAÇÃO MULTICÊNTRICA .....	40

4. RESULTADOS .....	42
4.1 PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DAS HEMÁCIAS UTILIZADAS NA IMUNIZAÇÃO .....	42
4.2 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS .....	43
4.3 CONFIRMAÇÃO DA ESPECIFICIDADE .....	50
5. DISCUSSÃO .....	51
6. CONCLUSÕES.....	52
7. PERSPECTIVAS .....	53
7,1 VALIDAÇÃO MULTICÊNTRICA .....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54
ANEXOS.....	59

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MEMBRANA E ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS

A membrana eritrocitária é a membrana celular mais estudada devido à facilidade na sua obtenção, porque não há presença de material nuclear como em outras células (GALLAGER, 1998).

A membrana eritrocitária, como as milhares de outras células do organismo humano, é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas. Esta membrana consiste de uma bicamada fosfolipídica, que representa aproximadamente 50% de sua massa total e forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular (COOPER, 1997). As trocas moleculares entre estes compartimentos são feitas através de bombas e canais de trocas de íons (MURADOR, 2007).

Embora os eritrócitos tenham sido tradicionalmente considerados reservatórios inertes de hemoglobina, sabe-se atualmente que, de fato, eles abrigam numerosas moléculas de superfície que participam de vários processos fisiológicos. Algumas destas moléculas são proteínas importantes para a estrutura e função das hemácias, enquanto outras com funções não esclarecidas para os eritrócitos têm demonstrado papéis bem definidos e vitais em outros tecidos. Assim, a elucidação das bases moleculares e bioquímicas dos antígenos de grupos sanguíneos contribui pelo menos em três aspectos: a) no entendimento da estrutura dos epítopos antigênicos; b) identificação e exploração de novas moléculas e suas funções, tanto nas hemácias, quanto em outras células; c) possibilidade de criar reagentes geneticamente obtidos para o uso em laboratórios de transfusão (TELEN, 1995).

A imuno-hematologia, a imunoquímica e a imunogenética nasceram, de fato, em Viena, em 1900, quando tudo começou com a descrição do grupo sanguíneo ABO, por Karl Landsteiner. A descoberta desse sistema permitiu, mais concretamente, o estabelecimento das bases científicas da transfusão sanguínea.

Desde 1908, sabe-se cientificamente que os grupos sanguíneos pertencem ao capital hereditário que cada um de nós recebe, que são transmitidos de pais para filhos, seguindo as leis da genética e que apresentam diferentes frequências nas diversas populações. O estudo da diversidade dos antígenos, a caracterização bioquímica das diferentes proteínas e o estabelecimento das funções desta multiplicidade antigênica trará uma substancial contribuição tanto para o estabelecimento do estado de saúde, assim como para o diagnóstico, desenvolvimento de tecnologias como a produção de anticorpos monoclonais e a conduta terapêutica de muitas enfermidades (MURADOR, 2007).

Antes de 1939, os únicos antígenos de grupo sanguíneo clinicamente significativos identificados eram aqueles pertencentes ao sistema ABO. Assim, a terapia de transfusão baseava-se no cruzamento dos grupos ABO. Apesar da compatibilidade ABO, a transfusão sanguínea continuava a resultar em morbidade e mortalidade (O'CONNOR, 1992).

Atualmente, a Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea, reconhece 30 sistemas de grupos sanguíneos (DANIELS, 2009) (Figura 1). Todos estes sistemas tiveram seus genes sequenciados e localizados em regiões cromossômicas específicas.

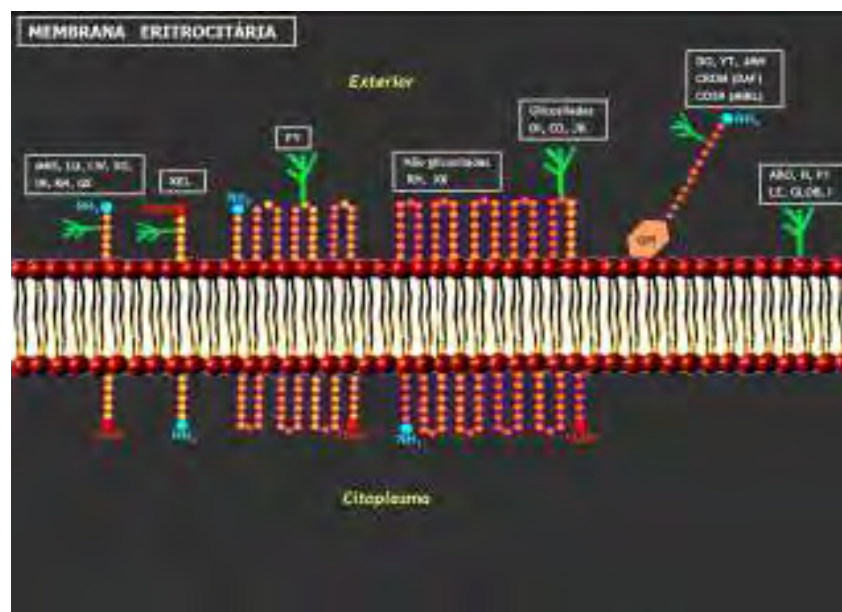


Figura 1: Representação esquemática dos antígenos de grupos sanguíneos na membrana eritrocitária (Fonte: Curso de Imunohematologia, 2009. José Alisson dos Santos).



Portanto, um sistema de grupo sanguíneo consiste de um ou mais antígenos controlados por um único gene ou por dois ou mais genes homólogos ligados, que apresentem pouco ou nenhum grau de recombinação entre eles.

Além dos sistemas de grupos sanguíneos, existem as coleções, que contêm antígenos sorológica, bioquímica e geneticamente relacionados, mas que não atendem a todos os critérios requeridos para serem sistemas; e duas séries de antígenos eritrocitários: a série 700 de antígenos de baixa frequência e a série 901 de antígenos de alta frequência.

Os critérios para inclusão de antígenos na série 700 devem considerar uma baixa incidência (<1%) do antígeno em diversas populações testadas, uma perfeita distinção de outros antígenos de baixa incidência pertencentes aos sistemas ou coleções, além da demonstração de herança genética do antígeno em pelo menos duas gerações.

De maneira similar, antígenos a serem incluídos na série 901 devem apresentar uma alta incidência (>90%) em diversas populações testadas, uma perfeita distinção de outros antígenos de alta incidência pertencentes aos sistemas ou coleções, além da demonstração de herança genética do antígeno em pelo menos duas gerações.

A classificação completa pode ser encontrada no site “International Society for Blood Transfusion (ISBT)” <http://www.blood.co.uk/ibgri>.

## **1.2 SISTEMA RH**

O sistema de grupo sanguíneo Rh foi descoberto em 1939, com anticorpos no soro de uma mulher que tinha gerado um natimorto e apresentou reação transfusional hemolítica após receber sangue de seu marido. Levine e Stetson observaram que o anticorpo aglutinava hemácias do seu marido e 80% dos doadores de sangue ABO compatíveis. Levine e Stetson não nomearam este anticorpo.

Em 1940, Landsteiner e Wiener produziram anticorpos por injeção de eritrócitos de macaco Rhesus em coelhos. Estes anticorpos aglutinavam eritrócitos de macaco Rhesus e 85% dos eritrócitos humanos, e era muito semelhante ao anticorpo descrito anteriormente por Levine e Stetson (DANIELS, 2007). Após estas descobertas, vários estudos foram realizados e como resultado, na metade da década de 1940, o sistema Rh consistia de cinco antígenos (D, C, E, c, e).

Alguns anos depois, provou-se que os anticorpos Rh dos animais e humanos não reagem com o mesmo antígeno. No entanto, com o acúmulo de milhares de publicações tornou-se impossível trocar o nome do anticorpo humano clinicamente importante de anti-Rh. Em consequência, os anticorpos anti-Rh dos animais e raros exemplos de anticorpos humanos “D-like” foram renomeados anti-LW (Landsteiner e Wiener) e os anticorpos humanos passaram a ser chamados anti-D (nomenclatura Fisher-Race) ou anti-Rho (nomenclatura de Wiener), pertencentes ao sistema de grupo sanguíneo Rh (LOMAS-FRANCIS, 2000).

É um sistema complexo, considerado o mais polimórfico de todos os sistemas de grupos sanguíneos humano em função da organização de seus genes no cromossomo, o que facilita as recombinações genéticas. A grande imunogenicidade dos antígenos Rh, particularmente do RhD (RH1), faz deste sistema, o mais importante na prática transfusional depois do sistema ABO.

Os antígenos do sistema Rh estão envolvidos em reações transfusionais hemolíticas, doença hemolítica do neonato (HDN) e anemia hemolítica autoimune. Anormalidades morfológicas e funcionais de hemácias deficientes dos antígenos Rh (fenótipos raros Rh<sub>null</sub> e Rh<sub>mod</sub>) indicam que a proteína Rh é necessária para a integridade da membrana.

Como visto anteriormente, os antígenos do sistema Rh foram primeiramente definidos por aloanticorpos usando simples técnicas de hemaglutinação. Em 60 anos de investigações sorológicas, com o objetivo de prover transfusões de sangue efetivas e seguras, revelou-se que a expressão de um antígeno particular pode variar na membrana da hemácia, apresentando alta expressão (ex. o antígeno D de

alguns fenótipos deleção), baixa expressão (ex. Antígenos C e e de alguns fenótipos raros) ou ainda a ausência dos antígenos Rh (ex. fenótipo Rh<sub>null</sub>). Antígenos de baixa incidência foram associados com alguns fenótipos ou expressões antigênicas alteradas (REID, 2004). Além disso, no soro de alguns indivíduos, foram identificados aloanticorpos contra antígenos expressos em suas próprias hemácias (Ex. indivíduos D positivo com anticorpos anti-D) (LOMAS-FRANCIS & REID, 2000).

Os avanços dos estudos moleculares aliados aos estudos sorológicos contribuem muito para o entendimento deste complexo sistema de grupo sanguíneo Rh.

### 1.2.1 NOMENCLATURA

A terminologia utilizada para discutir o sistema Rh é derivada de diferentes teorias genéticas. Fisher e Race propuseram a terminologia CDE, onde os antígenos Rh eram produzidos por três grupos de alelos intimamente ligados (D/d, C/c e E/e). Anti-d nunca foi encontrado e não existe. Wiener definiu a terminologia Rh-Hr, onde acreditava que o gene responsável por definir o sistema Rh, produzia um aglutinógeno que continha uma série de fatores sanguíneos, ou seja, múltiplos alelos em um único locus gênico.

Uma terminologia numérica, sem implicações genéticas foi introduzida em 1962, para um correto registro dos resultados sorológicos. Esta foi adotada e aceita pela Sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT): D é RH1; C, RH2; E, RH3; c, RH4; e e, RH5 (DANIELS, G.L.,1999). Hoje, o sistema consiste de pelo menos 50 antígenos independentes. Embora tenhamos antígenos classificados pela nomenclatura ISBT até o número 57, sete (Rh13, Rh14, Rh15, Rh16, Rh24, Rh25, Rh38) se tornaram obsoletos (Figura 2).

Em 1986, Tippett propôs uma outra teoria alternativa: um modelo de dois genes, um produzindo ou não D e o outro produzindo C/c e E/e. Os dois genes *RH* eram herdados juntos (TIPPETT,1986).

SISTEMA Rh (ISBT: 004 – RH)							
001 D	002 C	003 E	004 c	005 e	006 f	007 Ce	008 C <sup>w</sup>
009 C <sup>x</sup>	010 V	011 E <sup>w</sup>	012 G	013 Obsoleto	014 Obsoleto	015 Obsoleto	016 Obsoleto
017 Hr <sub>o</sub>	018 Hr	019 hr <sup>s</sup>	020 VS	021 C <sup>G</sup>	022 CE	023 D <sup>w</sup>	024 Obsoleto
025 Obsoleto	026 c-like	027 cE	028 hr <sup>H</sup>	029 Rh29	030 Go <sup>a</sup>	031 hr <sup>B</sup>	032 Rh32
033 Rh33	034 Hr <sup>B</sup>	035 Rh35	036 Be <sup>a</sup>	037 Evans	038 Obsoleto	039 Rh39	040 Tar
041 Rh41	042 Rh42	043 Crawford	044 Nou	045 Riv	046 Sec	047 Dav	048 JAL
049 STEM	050 FPTT	051 MAR	052 BARC	053 JAHK	054 DAK	055 LOCR	056 CENR
057 CEST							

Figura 2: Antígenos do sistema Rh e a classificação segundo a ISBT

### 1.2.2 PROTEÍNAS E GENES

Os antígenos do sistema Rh são carregados por duas proteínas transmembranares de multipasso (RhD e RhCE) com estruturas muito similares. Ambas são compostas de 417 aminoácidos, apresentando 6 alças (loops) extracelulares, 12 segmentos transmembranários e 7 intracelulares. São produzidas por dois genes ligados e homólogos (*RHD* e *RHCE*).

O gene *RHD* produz o antígeno D e o gene *RHCE* produz os antígenos Cc e Ee. A proteína RhD carrega o antígeno RhD, o mais imunogênico de todos os antígenos de grupos sanguíneos, presente em 85% da população branca, mas esta frequência pode variar dependendo da população estudada. Está ausente em uma

parcela importante de diversas populações, nos indivíduos chamados RhD negativos, como resultado da supressão ou outras alterações do gene *RHD*. A proteína RhCE carrega os antígenos C, c, E, e de acordo com as formas alélicas do gene *RHCE* (ANSART-PIRENNE, 2004; DANIELS, 1995). Os demais antígenos deste sistema são carregados por variantes das proteínas RhD e RhCE, produzidas por genes *RHD* e *RHCE* que sofreram algum tipo de mutação, desde pontuais por simples trocas de bases (missense) até recombinações genéticas com trocas parciais ou totais de exons entre os genes.

Os genes *RHD* e *RHCE* estão localizados no cromossomo 1, na posição 1p36.11 e em sentidos opostos. São genes complexos que originam os numerosos antígenos do sistema Rh. Estudos do gene *RH* demonstram mais de 120 diferentes alelos *RHD* e mais de 50 diferentes alelos *RHCE*. Novos alelos estão sendo descobertos (WESTHOFF, 2007).

Os genes *RHD* e *RHCE* são homólogos e ligados (haplótipo), cada um contendo 10 exons. Cada exon de um gene constrói um segmento da proteína, de maneira que os 10 exons produzem a proteína integral (Figura 3).

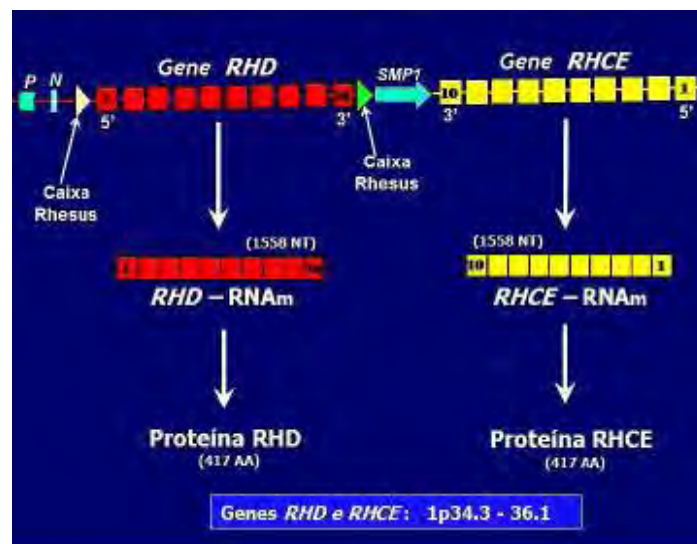


Figura 3: Genes do sistema Rh (Fonte: Curso de Imunohematologia, 2009. José Alisson dos Santos).

### 1.3 ANTÍGENO D (RH1)

Na medicina transfusional, o antígeno D é o mais importante do sistema Rh e o antígeno mais importante depois dos antígenos A e B. O anticorpo anti-D pode ser a causa de severas e fatais reações transfusionais hemolíticas e doença hemolítica neonatal. Pelo menos 30% dos indivíduos D negativo transfundidos com hemácias D+, formam anticorpos anti-D.

A presença ou ausência do antígeno D, indica o fenótipo Rh+ (presença do antígeno D) e Rh- (ausência do antígeno D). Este antígeno está presente entre 82% e 88% dos caucasianos Europeus e Americanos e em 95% dos negros africanos. D é um antígeno de alta frequência no Extremo Oriente, atingindo 100% em algumas populações (DANIELS, 2007).

Existem variantes do antígeno D, que podem ser determinadas por trocas de DNA entre genes similares levando a alteração de epítomos e consequentemente de padrão de expressão fenotípica na superfície das hemácias. Podem ser classificadas em três grupos: variantes D parciais (incluindo categorias), D fraco e D<sub>el</sub> (DENOMME, 2008). Hoje listam-se pelo menos 36 categorias de D, outras 47 variantes de D parciais, além de variantes D fraco e D<sub>el</sub> (FLEGEL, 2010).

O fenótipo D parcial resulta de mutações na região extracelular da proteína de membrana, podendo levar a aloimunização. O fenótipo D fraco era considerado um polimorfismo quantitativo e não qualitativo da expressão do antígeno D e, portanto, teoricamente indivíduos com este fenótipo, em contraste com fenótipos D parciais, não desenvolveriam aloanticorpos anti-D. No entanto, atualmente o fenótipo D fraco está sendo amplamente estudado por meio de técnicas moleculares, e os estudos demonstram mutações missenses, resultando em única ou múltiplas substituições de aminoácidos, localizados na região transmembranar ou intra celular (Figura 4). Já foram descritos alguns tipos de D fraco que aloimunizam pacientes (FLEGEL, 2010).

Nos fenótipos D<sub>el</sub>, o antígeno D é expresso em níveis muito baixos e não é detectado por testes sorológicos rotineiros. Só é detectado por testes de adsorção e eluição de anti-D (WAGNER, 2004; WESTHOFF, 2007).

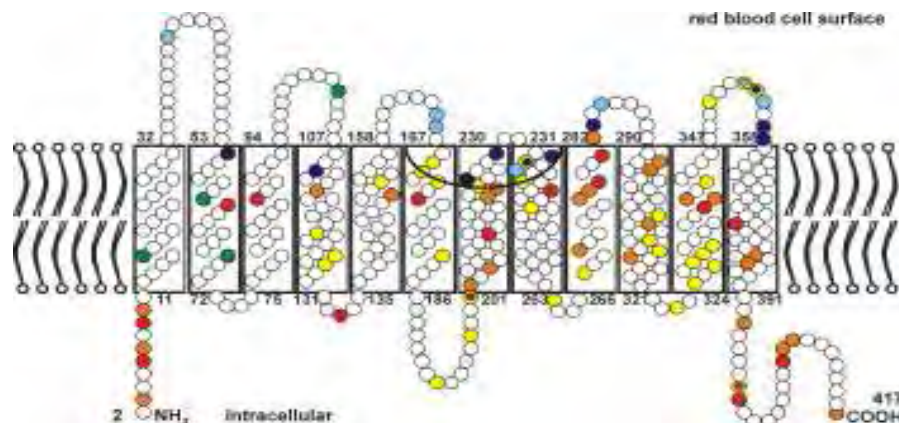


Figura 4: Proteína RhD. Em círculos laranja e vermelho estão representadas as mutações D fraco. Em azul, as mutações de D parciais.

Dependendo do fenótipo Rh, RhD e RhCE diferem por 32 a 36 substituições de aminoácidos (HUANG, 1997). Poucas destas substituições estão nos “loops” externos e ainda é incerto que resíduos presentes em RhD, e ausentes de RhCE, sejam essenciais para a expressão do antígeno D. Um mosaico de numerosos epítomos constituem o antígeno D. Ausência de um ou mais desses epítomos, determinados por reações de aglutinação das hemácias, quando testadas contra anticorpos monoclonais anti-epD1 até anti-epD9 (epD = epítomo de D), resulta em fenótipos D parciais, representando uma variação qualitativa da expressão dos antígenos D (Figura 4). Indivíduos que expressam em suas hemácias antígenos D parciais podem, quando expostos a um antígeno D normal, produzir aloanticorpos anti-D clinicamente importantes, dirigidos ao epítomo que lhes falta, capazes de causar reação transfusional e doença hemolítica do neonato (HDN). Fenótipos D parciais foram inicialmente classificados em categorias e sub-categorias usando anticorpos policlonais anti-D e anticorpos humanos anti-D de indivíduos D parciais (TIPPETT, 1996).

Anticorpos humanos monoclonais agora estão sendo usados para classificar antígenos D parciais de acordo com os epítomos de D (epD) expressos. O modelo original consistia de 9 epítomos de D, foi expandido para 16 (TIPPETT, 1996), 30 (JONES et al, 1995) e atualmente 37 epítomos (SCOTT, 1996), demonstrando uma extensiva heterogeneidade sorológica dos fenótipos D parciais. Em geral, a eliminação de epítomos de D resulta de uma substituição de um único aminoácido.

Antígenos D parciais, que perdem um ou mais epítomos, estão sendo extensivamente estudados molecularmente. Foram definidos diversos tipos de alelos variantes do gene *RHD*, que produzem fenótipos D parciais. Antígenos D parciais resultam de rearranjos gênicos de *RHCE* em *RHD* (DIII, DVI, DFR, DBT) e de *RHD* em *RHCE* (DHAR) ou de uma simples mutação de ponto (DII, DVII, DHMi, DNB, DNU, DHR, DHM, DFW) (LOMAS-FRANCIS, 2000). (Figura 5)

Nos indivíduos com tipos DVI, DBT e  $R_0^{\text{Har}}$  (DHAR), os alelos produzem fenótipos D parciais faltando muitos epítomos do antígeno D e que, por consequência, se imunizam facilmente quando transfundidos com hemácias D positivas.

Sorologicamente, o fenótipo D parcial é determinado de acordo com a reatividade obtida com anticorpos monoclonais anti-D (JONES, 1995), sendo então divididos em categorias (Figura 6). Algumas dessas categorias estão associadas a alguns antígenos de sanguíneos de baixa incidência, o que também ajuda na diferenciação entre elas (GIRELLO, 2002; DENOMME, 2008; LOMAS-FRANCIS, 2000).



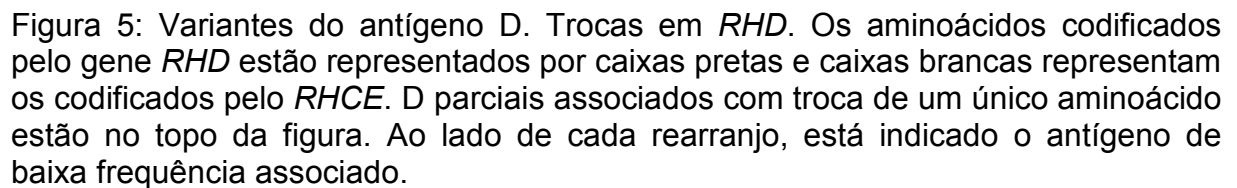


FIGURA 6: Categorias de antígeno D (Fonte: Curso de Imunohematologia, 2009. José Alisson dos Santos).

## 1.4 ANTICORPOS MONOCLONAIS

A investigação de características antigênicas celulares teve como ferramentas inicialmente os anticorpos obtidos a partir de indivíduos imunizados (o ser humano ou animais), produzindo anticorpos policlonais, que reconhecem diversas estruturas na superfície destas células e apresentam baixas concentrações e pouca especificidade (BLANCHARD, 1995). A produção dos anticorpos policlonais vem sendo descontinuada gradativamente devido à falta de matéria prima (origem humana).

Tais ferramentas diagnósticas, no entanto, tiveram grande avanço a partir do desenvolvimento dos anticorpos monoclonais (AcMm) por Köhler e Milstein em 1975 (KÖHLER, 1975). Estes são imunoglobulinas produzidas por um único clone de células B, diferindo dos anticorpos policlonais por serem monoespecíficos e homogêneos. O desenvolvimento dos reagentes monoclonais trouxe grande contribuição na área de imuno-hematologia, pois estes reagentes vêm substituindo os reagentes policlonais com total eficácia.

Anticorpos monoclonais (AcMm) são importantes ferramentas imunoquímicas; suas principais características são especificidade de ligação, homogeneidade e a capacidade de serem produzidos em grande quantidade.

Os reagentes derivados de anticorpos monoclonais apresentam grandes vantagens sobre os policlonais. Eles não são contaminados por proteínas séricas não-imunoglobulínicas, tem especificidade e afinidade consistentemente reproduzível e, podem ser produzidos em quantidade ilimitada durante um período indefinido de tempo.

A produção de monoclonais revolucionou o diagnóstico na área médica, tanto humana, como em veterinária. Apesar desta tecnologia já ter mais de 30 anos, desde a primeira descrição em 1975, e sua ampla aplicação, a aspirada diminuição de custos para os serviços de saúde ainda não se tornaram realidade. Trata-se de

tecnologia dominada por países com amplo investimento em biotecnologia, fato este não evidenciado fortemente no Brasil.

O método de produção destes anticorpos envolve a fusão de linfócitos B de animais previamente imunizados com o antígeno de interesse e células neoplásicas em fase exponencial de crescimento (mieloma múltiplo). A fusão do linfócito B com o mieloma resulta em células denominadas “hibridomas” (Figura 7). Uma das principais vantagens sobre a produção dos hibridomas é que os antígenos não purificados podem ser utilizados para a produção de anticorpos específicos (HARLOW , 1988).

### PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

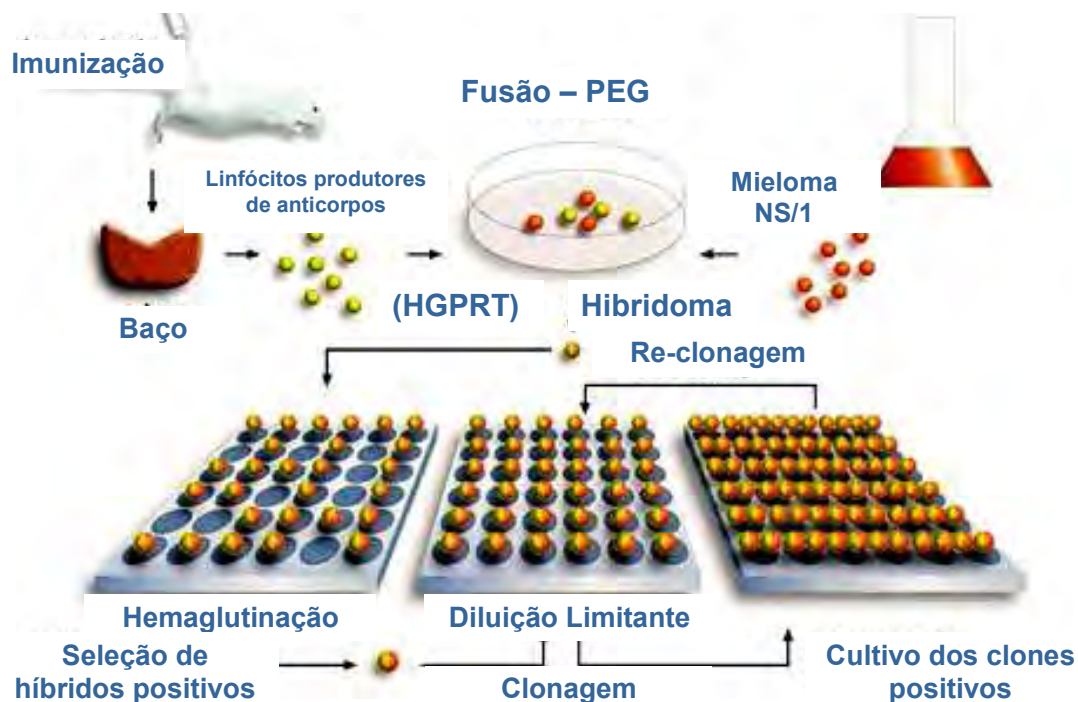


Figura 7: Produção de anticorpos monoclonais.

Na produção do anticorpo monoclonal, após a realização da fusão celular, três situações podem ocorrer: 1) células fusionadas (linfócito B do camundongo com mieloma múltiplo murino), objetivo dos protocolos de produção de anticorpos monoclonais, 2) células linfocitárias não fusionadas ou fusionadas ao acaso entre si e 3) mieloma múltiplo não fusionado ou fusionado ao acaso entre si (Figura 8).

Somente a primeira formação é de interesse. As demais situações descritas em 2 e 3 devem ser eliminadas. Na situação 2, o problema é auto-limitado tendo em vista a pouca viabilidade de linfócitos normais em cultura a longo termo. Estas células linfocitárias entrarão normalmente em apoptose programada e serão eliminados das culturas pelos processos de repicagem. Mas a terceira situação é preocupante, uma vez que o mieloma se divide rapidamente em cultura dificultando a seleção dos hibridomas. Utilizam-se, então, propriedades do genoma do mieloma incluindo a hipermetilação e a deficiência de uma enzima do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT), uma das enzimas da via de recuperação da síntese de nucleotídeos. Células normais são HGPRT positivas enquanto o genoma do mieloma é HGPRT negativo. Para regular esta etapa, utiliza-se a seleção enzimática dos hibridomas através do sistema Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT). Assim, 24 horas após a fusão é adicionado meio de cultura contendo o suplemento Hipoxantinaaminopterina-timidina (HAT). A aminopterina bloqueia a via de novo, restando somente a via de recuperação a ser utilizada para a formação de nucleotídeos. No entanto, a hipoxantina pode ser utilizada na síntese somente por células HGPRT positivas, ou seja, hibridomas e linfócitos. Os mielomas contêm a proteína HGPRT não funcional e morrem nessas condições. Os linfócitos não fusionados possuem morte programada, o que permite a viabilidade na cultura somente dos hibridomas (HARLOW, 1988).

Nesta fase, há diversos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais diferentes em uma mesma colônia de células e por isso devem ser posteriormente submetidas ao processo de clonagem celular. Neste processo, objetiva-se a deposição de somente uma célula (clone) em cada cavidade da placa de cultura para crescimento de uma colônia composta por clones secretores de anticorpos específicos a um único determinante antigênico (epítipo) denominados monoespecíficos. Estes clones secretores são selecionados e amplificados para a obtenção de maiores volumes, na intenção de obter maiores concentrações do anticorpo, possibilitando a caracterização e uso do mesmo. Tanto após a fusão celular como após a etapa de clonagem celular, a fase de triagem (screening), ou seja, o teste delineado para estudo dos prováveis anticorpos obtidos é extremamente importante. O teste de triagem deve ser o mais próximo possível da

forma futura de utilização do anticorpo monoclonal, facilitando a análise do desempenho desses anticorpos no teste escolhido (PRICE, 1995).

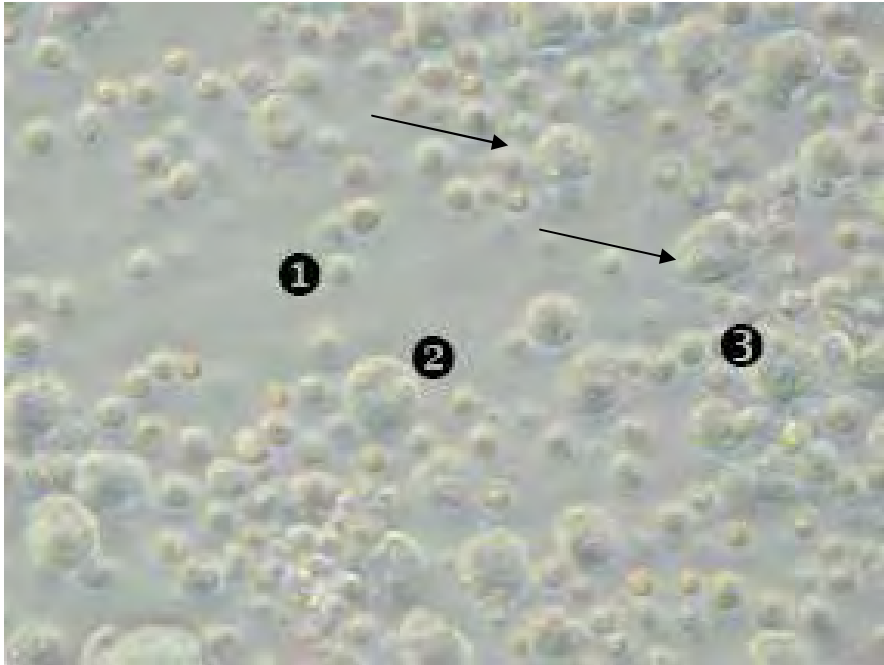


Figura 8: Aspecto fotomicrográfico logo após a fusão celular: 1 *Linfócito murino normal não fusionado*, 2 *mieloma múltiplo NS1* e 3 *híbrido em rearranjo cromossômico*. Objetiva de 40X em contraste de fase ph2 (Fonte: Laboratório de Anticorpos Monoclonais – UNESP-Botucatu, 2009).

Após a primeira etapa de triagem os hibridomas secretores de anticorpos monoclonais são retestados pelo menos 3 vezes para garantir a estabilidade da célula recém-construída. Mantendo-se com reatividade contra o antígeno escolhido, a célula é submetida à clonagem celular. Esta etapa é novamente procedida de triagens subsequentes para então se estabelecer a fase de amplificação clonal. A amplificação clonal pode ser feita por métodos em cultura como “batch de cultura” (cultura descontínua) em frascos de tamanhos progressivamente maiores chegando a 1 litro e até bio-reator ou pelo método *in vivo*, com a produção de líquido ascítico (HARLOW, 1988).

O líquido ascítico, também denominado ascite, é um fluido intraperitoneal extraído de camundongos que desenvolveram um tumor peritoneal. O tumor é induzido através da injeção de hibridomas no peritônio, que funciona como uma

câmara de crescimento para essas células. Esse método possibilita o crescimento dos hibridomas para altas densidades e sua secreção de anticorpo é mantida. Deste modo, forma-se uma solução com alta concentração de anticorpos, que pode variar de 1 a 10mg/mL, e pode ser coletada (HARLOW, 1988). A produção de líquido ascítico é o método de escolha para obtenção de anticorpos monoclonais em maiores concentrações por diversas razões, entre elas o fácil desempenho da técnica, proporciona alta concentração de AcMm e elevada taxa de sucesso além de baixo custo por mg de AcMm produzido. Apesar da alta relevância, sabe-se que a indução de ascite pode causar dor e sofrimento aos animais, motivo pelo qual se costuma reduzir o número de animais utilizados (GEUS, 1998).

A evolução dos reagentes passou nas últimas décadas do uso dos reagentes denominados policlonais aos monoclonais com certa euforia, e mais recentemente nova geração de anticorpos começam a aparecer: os denominados “engenherados” ou produzidos pela associação dos avanços da biologia molecular com a engenharia celular.

O diagnóstico hemoterápico, em especial na área de domínio da imunohematologia, a contribuição da tecnologia dos monoclonais é indiscutível. No entanto, a diversidade antigênica das hemácias humanas (DANIELS, 2007) com a sua geo-distribuição heterogênea faz com que a gama de reagentes disponíveis por um mesmo fornecedor não atenda às necessidades da demanda transfusional. O dilema na hemoterapia aponta para os diversos problemas na obtenção de soros e/ou hemácias raras para conclusão da identificação de anticorpos irregulares, bem como na seleção de glóbulos para transfundir pacientes alosensibilizados (ENGELFRIET, 2006).

Não se tem disponível no mercado nacional uma grande variedade de antisoros e hemácias fenotipadas (raras), principalmente quando se tratam de antisoros dirigidos contra antígenos de alta frequência e/ou baixa frequência, o que obriga uma dependência de centros de referências, sua maioria no exterior, gerando demora na investigação e elevação custos. Muitas são as situações de impedimento da continuidade dos estudos imunohematológicos.

Em relação ao antígeno D (RH1), em virtude do polimorfismo deste antígeno, os fabricantes estão produzindo anticorpos monoclonais de modo a detectar a grande maioria das variantes deste antígeno (Figura 9), no entanto, devido à grande miscigenação da população brasileira, os reagentes disponíveis ainda não conseguem detectar todas as variantes. Deve-se utilizar uma combinação adequada dos clones anti-D, oferecendo uma segurança na identificação destas variantes. Outro fator relevante é o custo destes reagentes, que é na sua totalidade originado de matéria prima importada, gerando com isso elevado custo para o consumidor final.

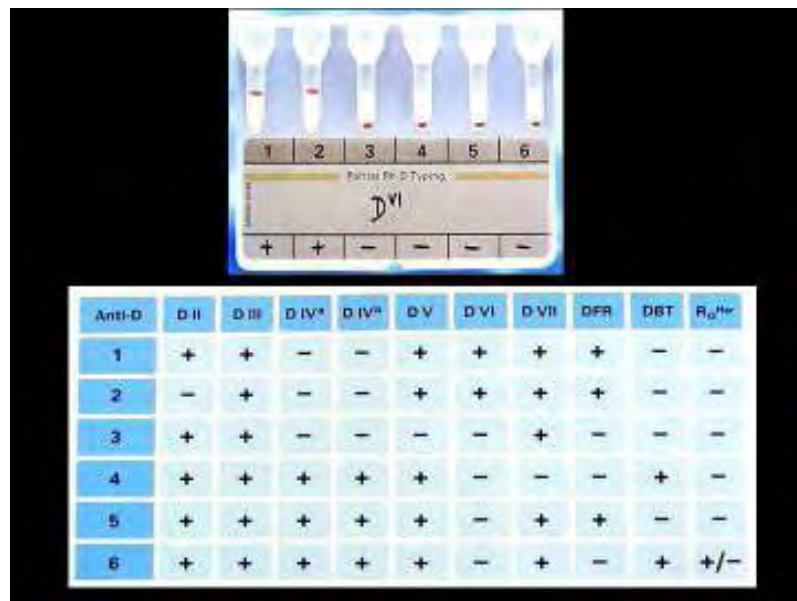


Figura 9: Kit comercial para caracterização sorológica de antígenos D parciais. ID-Partial Rh D-Typing Set (Diamed® AG, Morat, Switzerland)

A necessidade da auto-suficiência nacional destes insumos deve-se ao fato de exercer uma hemoterapia de melhor qualidade, visando o bem estar do paciente, com custos racionalizados, fato este motivador deste projeto.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Neste trabalho, o objetivo foi a produção e caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários humanos, para utilização nos testes imuno-hematológicos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Produção e caracterização de AcMm dirigidos contra antígenos de diferentes epítomos do antígeno D (RH1), a partir de banco de hemácias fenotipadas. Neste trabalho, a imunização foi com o fenótipo D parcial IV<sup>a</sup>.
- Produção e caracterização de anticorpos monoclonais murinos (AcMm) dirigidos contra antígenos eritrocitários humanos raros: alta frequência e/ou baixa frequência populacional.
- Determinação de classe e subclasse dos anticorpos obtidos.
- Estudo da expressão dos antígenos D (RH1) utilizando os anticorpos obtidos.
- Caracterização dos anticorpos obtidos e avaliação sobre a aplicabilidade na prática transfusional.
- Validação multicêntrica dos AcMm caracterizados: Hemocentro de Botucatu, Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês e Avaliação Externa da Qualidade – ANVISA/MS ou outro centro de referência no exterior.
- Registro e /ou patenteamento dos produtos obtidos.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa obteve a aprovação do Comitê Experimental do Hospital Sírio Libanês (Anexo 1) e da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – campus Botucatu, com protocolo nº 766/2009 – CEEA (Anexo 2).

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS HEMÁCIAS FENOTIPADAS

Para os protocolos de imunização de animais e consequente produção de anticorpos monoclonais murinos foram selecionadas hemácias Rh+, com fenótipo D categoria IV<sup>a</sup>, a partir da consulta dos registros eletrônicos dos doadores de sangue do Banco de Sangue – Hospital Sírio Libanês, e convocação destes doadores para nova doação de sangue.

Foram selecionados dois doadores que apresentavam este fenótipo D categoria IV<sup>a</sup>. Para determinação do fenótipo destes doadores foram utilizadas técnicas de screening utilizando métodos de hemaglutinação com anticorpos anti-Go<sup>a</sup> para determinação do antígeno Go<sup>a</sup> (RH30) e testes sorológicos com anticorpos monoclonais conhecidos dirigidos aos epítomos do antígeno D provenientes do III e IV Workshop Internacional de Anticorpos Monoclonais (Nantes, 1996/ Paris, 2000). Na ausência de reatividade com alguns destes epítomos (epítomos 1, 2, 3 e 9), os mesmos foram analisados pela técnica de PCR multiplex (MAASKANT-VAN WIJK, 1998) para caracterização molecular do gene *RHD* (Figura 10).

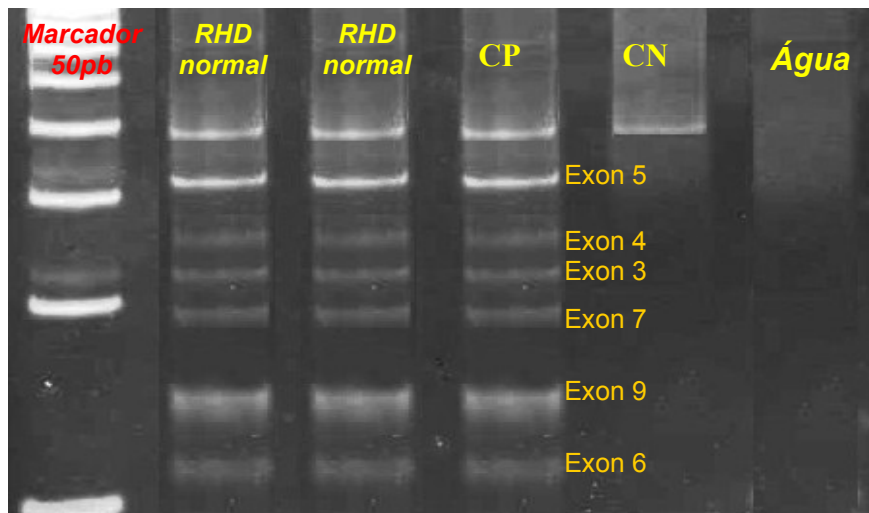


Figura 10: Técnica de PCR multiplex para caracterização molecular do gene *RHD* (Fonte: Laboratório de Biologia Molecular – Banco de Sangue Hospital Sírio Libanês, 2009)

### 3.2 PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO

Os protocolos de imunização utilizados seguiram a técnica clássica descrita por Köhler e Milstein (KÖHLER, 1975), modificada por Deffune e padronizada no laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu (DEFFUNE, 1992).

O protocolo utilizado foi de longa duração. Para cada protocolo foram utilizados camundongos de linhagem isogênia BALB/c, mantidos no Biotério de Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da UNESP – campus Botucatu, em sala climatizada por meio de ar condicionado e exaustão além de temperatura programada para 22°C, visando o bem estar dos animais.

Denominaram-se DIVS e DIVSP os protocolos em que se utilizou, respectivamente, hemácias fenotipadas D categoria IV<sup>a</sup> e hemácias D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína. Em cada protocolo foram imunizados 5 camundongos como descrito no Quadro 1, sendo que todos, dentro de cada protocolo, receberam a mesma fonte do antígeno na dose de 500µL de suspensão de hemácias a 5% e a mesma via de inoculação. Para imunização, foi utilizada a via intraperitoneal (IP).

No protocolo DIVS, um dos camundongos foi ao óbito, portanto o protocolo de imunização seguiu-se somente com 4 camundongos.

Protocolo de Imunização	Antígeno	Nº de animais	Agenda de Imunização	Via de Inoculação
<b>DIVS</b>	Hemácias fenótipo DIV <sup>a</sup>	<b>4</b>	D0 – 1ª Imunização	IP
			D7 – 2ª Imunização	IP
			D27 – 3ª Imunização	IP
			D42 – Reforço	IP
			D46 – Fusão	
<b>DIVSP</b>	Hemácias fenótipo DIV <sup>a</sup> tratadas com enzima papaína	<b>5</b>	D0 – 1ª Imunização	IP
			D7 – 2ª Imunização	IP
			D27 – 3ª Imunização	IP
			D42 – Reforço	IP
			D46 – Fusão	

Quadro 1 – Protocolo de imunização em camundongos BALB/c com hemácias DIV<sup>a</sup> e hemácias DIV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína.

Como parceiras de fusão foram utilizadas as células de mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidas por Köhler e Milstein (1975), provenientes do *Laboratoire de Genie D'Institute National de Transfusion Sanguine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido (DEFFUNE, 1996).

As células NS/1 foram descongeladas 8 dias antes da fusão segundo Deffune (1992) e mantidas em crescimento com meio de cultura, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Acompanhou-se o crescimento das células até que elas apresentassem viabilidade celular igual ou superior a 90%, verificada por coloração azul de tripano (*Tripan Blue 0,4%*) em microscópio óptico.

### 3.3 FUSÃO CELULAR

As fusões celulares foram realizadas segundo a técnica descrita por Köhler & Milstein (1975) com modificações de Deffune (1992).

Após as duas primeiras imunizações realizadas com intervalo de 21 dias, os animais receberam um reforço final por via intravenosa (21 dias após a segunda imunização), sem adjuvante, três dias antes da fusão. No dia da fusão, os camundongos foram anestesiados com anestésico tiopental sódico para a esplenectomia e, em seguida, eutanasiados com o mesmo fármaco na dose de 60-80mg/kg de peso animal (IP). Cada baço retirado foi manipulado separadamente em capela de fluxo laminar para a perfuração da cápsula esplênica e remoção dos linfócitos.

O procedimento de fusão foi realizado por cocentrifugação dos linfócitos recém-coletados de cada animal imunizado juntamente com células NS/1 na proporção de 1/10 e o agente fusionante polietilenoglicol PM 4000 (PEG - Merck®) (1mg de PEG para cada  $100 \times 10^6$  células - NS1 + linfócitos). Em seguida, as células foram distribuídas em microplacas de cultura celular de 96 cavidades, contendo meio enriquecido (ME) em aminoácidos essenciais (Gibco BRL®) e não essenciais (Gibco BRL®), e soro fetal bovino (SFB) a 20%.

A seleção enzimática dos híbridos obtidos foi realizada dentro do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT) segundo KÖHLER & MILSTEIN (1975). Após a realização da fusão celular com a distribuição das células na microplaca, o meio seletivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) foi adicionado à cultura (100µL por cavidade da placa). Este meio possibilita a seleção através da proliferação dos hibridomas (linfócito B + NS/1) e a eliminação das células não fusionadas.

Três dias após a fusão foram adicionadas à cultura dos hibridomas as células de companhia (*feeders cells*) células oriundas de timo de camundongo de até 20

dias de vida, na quantidade de  $1 \times 10^5$  células por cavidade da placa. A finalidade é suplementar o meio de cultura com fatores de crescimento, importantes para o desenvolvimento dos híbridos recém-construídos (GORDON, 1988; DAVIS, 1994). Além disso, os timócitos facilitam a visualização do crescimento dos hibridomas por possuírem tamanho menor.

### **3.4 SELEÇÃO DOS HIBRIDOMAS (TRIAGEM)**

A partir da fusão, a observação em microscópio invertido permitiu o monitoramento diário das células. As cavidades onde houve proliferação celular e confluência de 95 a 100% foram marcadas para a coleta dos sobrenadantes de cultura (SNC). Todos os SNC foram coletados no dia do teste, quando houvesse passado no mínimo 48 horas sem troca de meio de cultura, favorecendo o aumento da concentração de imunoglobulinas.

O método de screening utilizado foi a técnica de hemaglutinação em microplacas para determinar a presença de anticorpos específicos contra os antígenos utilizados na imunização dos camundongos.

Os SNC coletados foram testados por técnicas de hemaglutinação em microplacas (DEFFUNE, 1996), utilizando as mesmas hemácias ou hemácias de mesmo fenótipo daquela que serviram à imunização dos animais (hemácias colhidas em anticoagulante EDTA, lavadas e ressuspensas a 3% em solução salina fisiológica). Recolheu-se 50µL de SNC a ser testado, colocando-se em microplaca de 96 cavidades com fundo em “v” ou “u”, adicionou-se 25µL de suspensão de hemácias a 3% em solução salina fisiológica e centrifugou-se a 800rpm durante um minuto, agitou-se, lendo contra um fundo claro. Os SNC reagentes foram classificados de acordo com o grau de reatividade (1+ a 4+).

Cada célula construída, uma vez negativa, foi descartada do protocolo. Aquelas cujo teste inicial foi positivo, mesmo que em fraca intensidade, foram expandidas para volumes crescentes de meio de cultura e os respectivos sobrenadantes testados por mais três vezes por hemaglutinação em microplacas

com intervalos de 48 horas. Os híbridos que mantiveram-se com bom desenvolvimento celular e reagentes até a quarta triagem foram submetidos à expansão.

### **3.5 EXPANSÃO DOS HÍBRIDOS EM CULTURA**

Após a verificação dos híbridos positivos resultantes da fusão celular, os híbridos selecionados na primeira triagem foram expandidos conforme preenchem as cavidades da microplaca de cultura de 96 poços. Assim, as células foram repicadas para placas de 24 poços e, posteriormente, para frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup>, ao mesmo tempo em que as triagens subsequentes eram realizadas. Então, as células que mantiveram a reatividade até o quarto teste foram congeladas em solução de SFB contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de imersão em nitrogênio líquido para assegurar sua conservação, segundo Deffune et al. (1996).

Após o congelamento em 6 ampolas, cada híbrido foi semeado em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> para expansão denominada “*batch* de cultura”, em que o material permanece em cultivo por um período de 8 dias sem troca de meio de cultura, conseguindo-se assim, maior liberação de anticorpos. As células em apoptose separadas por centrifugação foram desprezadas e o sobrenadante de cultura congelado em tubos devidamente identificados para posterior análise.

### **3.6 VIABILIDADE CELULAR**

Para garantir o sucesso da clonagem celular, foi realizada a estimativa de viabilidade dos hibridomas pela coloração Azul de Tripan a 0,4%. Em microscopia óptica as células vivas aparecem claras e brilhantes, pois a membrana plasmática íntegra exclui o corante. As células mortas ou em degeneração, ao contrário, incorporam o corante e aparecem maiores e com coloração azulada, devido à fragmentação da membrana plasmática. Assim, o resultado foi expresso em porcentagem de células viáveis, segundo a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{n}^{\circ} \text{ células mortas}}$$

### **3.7 CLONAGEM**

A clonagem dos hibridomas positivos foi realizada pelo método de diluição limitante em microplaca (HARLOW, 1988) com timócitos obtidos de camundongos BALB/c de 15 a 20 dias de idade como células de companhia. A finalidade da clonagem é garantir que haja uma única célula (hibridoma) em cada poço da placa de cultura. Através da observação por microscopia invertida, cada poço foi identificado sob a condição de clone único ou múltiplo, sendo que somente os clones oriundos de poços denominados únicos foram considerados potenciais monoclonais.

Os clones que se desenvolveram foram testados por hemaglutinação em microplacas, segundo o protocolo anteriormente descrito, e aqueles que obtiveram forte reatividade foram expandidos em volumes crescentes de meio de cultura até que alcançassem densidade adequada para congelamento e para inoculação em camundongos visando a produção de ascite. As células foram congeladas em solução de SFB contendo 10% de DMSO a 4°C, seguido de congelamento em nitrogênio líquido.

### **3.8 DETERMINAÇÃO DA CLASSE E SUB-CLASSE DAS IMUNOGLOBULINAS PRODUZIDAS**

A determinação da classe das imunoglobulinas produzidas foi realizada pelo método de imunodifusão dupla em gel de ágar (Ouchterlony), utilizando imunoglobulinas policlonais de coelho de especificidade anti-imunoglobulinas murinas. Este é um método onde ocorre precipitação na região de equivalência quando antígeno e anticorpo se difundem no agar (CATTY, 1988; ROIT, 1997).

A técnica de citometria de fluxo foi realizada para determinação da classe e sub-classe das imunoglobulinas murinas produzidas (BROW, 1995; HAYDEN, 1988),

através do kit CBA Flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences<sup>®</sup>), utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

*Conjugated beads to antibody* (CBA) é um kit utilizado para identificação rápida do isotipos de cadeia pesada e leve de um anticorpo monoclonal murino em uma única amostra. Cada esfera (bead) prevê uma superfície de captura para uma proteína específica. Para a determinação do isotipo, anticorpos reveladores com intensidade de fluorescência diferentes para cada isotipo são colocados após incubação das beads com a amostra (sobrenadante de cultura). O kit aliado à citometria de fluxo permite volume de amostra pequena, poucas diluições e rápida execução da técnica. Este produto possibilita a detecção de mais de uma classe e/ou subclasse na mesma amostra (MORGAN, 2004).

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo provido de laser de argônio a 480nm, de 15mW, e as informações obtidas foram analisadas pelo *software Cell Quest* - BD<sup>®</sup> por gráficos em “dot plot” para análise.

### **3.9 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR PRODUÇÃO DE LÍQUIDO ASCÍTICO**

Para a obtenção de anticorpos monoclonais em maior concentração que em sobrenadante de cultura, decidiu-se pela produção de líquido ascítico. Para tal, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com cerca de 60 dias de vida, provenientes do biotério da FMB – UNESP e mantidos nas mesmas condições anteriormente descritas.

Suspensões de clones produtores foram injetadas na cavidade peritoneal dos camundongos previamente tratados com 1,0mL de Pristane<sup>®</sup>. Após 10 a 15 dias da injeção das células, com o intumescimento do abdômen dos animais, o líquido ascítico foi puncionado utilizando-se seringas e agulhas estéreis. As células e a gordura foram removidas após centrifugação a 25.000 x g por 30 minutos, e o líquido ascítico aliquotado em ampolas, congelado e conservado a - 80°C.



### 3.10 AVALIAÇÃO ELETROFORÉTICA DA MONOCLONALIDADE

O controle eletroforético da monoclonalidade foi realizado a partir do líquido ascítico obtido e anticorpo monoclonal purificado. Realizou-se a eletroforese sobre lâminas de vidro em gel de ágar a 1%, de acordo com o protocolo operacional padrão desenvolvido no Laboratório de Bioquímica do Hemocentro da FMB. As lâminas de vidro numeradas foram cobertas por gel de ágar a 1% diluído em tampão Veronal (pH 8.9) e, após secagem, foram formadas finas canaletas de 1,2cm de comprimento. Em cada lâmina de vidro foi aplicada 5µL da amostra. As lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, aplicando-se 80mÁ e 180 V durante 60 minutos. Após a corrida eletroforética as lâminas foram deixadas em solução contendo álcool, ácido acético e água (70% de álcool, 5% de ácido acético e 25% de água) durante 20 minutos para fixação, cobertas por papel filtro e deixadas em estufa a 37°C por 12 horas para secagem (OLIVEIRA, 2009). Para evidenciar a separação das proteínas, utilizou-se o corante negro de amido e a leitura em scanner com o software SDS-60 para eletroforese (CELM®)

### 3.11 CONFIRMAÇÃO DE ESPECIFICIDADE E VALIDAÇÃO MULTICÊNTRICA

Uma etapa inicial foi realizada utilizando hemácias fenotipadas do Banco de Sangue – Hospital Sírio Libanês. Como segunda etapa, avaliou-se a concentração dos anticorpos produzidos pelo método de titulação do soro, utilizando hemácias de diferentes fenótipos. Posteriormente, nova etapa será realizada, utilizando painéis comerciais, painéis próprios e eventualmente painéis de centros de referência internacional.

Os anticorpos monoclonais foram testados pela técnica clássica de aglutinação em tubos, mas em uma etapa posterior, após a caracterização, os anticorpos serão testados e padronizado nas técnicas: Microplacas, Colunas de gel, Citometria de fluxo e Western blotting. Uma vez caracterizados os anticorpos, a produção em média escala, utilizando batch de cultura pela técnica de Spinners será realizada seguida das etapas de controle de qualidade a ajuste de titulação. *A posteriori*, os anticorpos serão aliquotados e enviados em centro parceiros para

controle em paralelo com reagentes comerciais disponíveis. Cada centro receberá o anticorpo produzido *in house*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PERFIL FENOTÍPICO E GENOTÍPICO DAS HEMÁCIAS UTILIZADAS NA IMUNIZAÇÃO

Para a apresentação dos resultados, diferentes etapas metodológicas serão apresentadas, entre elas, o perfil fenotípico e genotípico dos doadores de hemácias utilizadas como imunógeno. Foram selecionados dois doadores de sangue do Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês que inicialmente apresentaram os seguintes resultados: Doador 1 (protocolo DIVS), Grupo sanguíneo ABO/Rh O Rh+; fenótipo Dccee (Ror), K-k+; Kp(a-b+); Fy(a-b+); Jk(a+b+); M-N+; S-s+; U+; Tja+; Di(a-) e Doador 2 (protocolo DIVSP), grupo sanguíneo O Rh+, fenótipo Dccee (Ror); K-k+; Kp(a-b+); Fy(a+b+); Jk(a+b+); M+N-; S-s+; U+; Tja+; Di(a-). Os doadores, foram fenotipados para um outro antígeno do sistema Rh ( $Go^a$ ), que é um antígeno associados a variantes de D categoria IV<sup>a</sup>. Os resultados demonstraram a presença do antígeno de baixa frequência ( $Go^a$ ) nas hemácias dos doadores.

Diante destes resultados, as hemácias dos doadores foram testadas contra um painel de soros monoclonais dirigidos aos epítomos do antígeno D provenientes do III e IV Workshop Internacional de Anticorpos Monoclonais (Nantes, 1996/ Paris, 2000) e os resultados demonstraram ausência de reatividade com os epítomos 1, 2, 3 e 9, como descrito no Quadro 2, característica do fenótipo D categoria IV<sup>a</sup>.

Os doadores foram analisados pela técnica de PCR multiplex, para confirmação do genótipo *RHD* (Figura 11). Observou-se ausência dos exons 3 e 7 confirmando o genótipo *DIV<sup>a</sup>*.

epD	D categorias																		doador
	DII	DIII	DIVa	DIVb	DVa1	DVa2	DVa3	DVa4	DVa	DVb	DVI	DVII	DFR	DBT	DHA	DHM	DNB	DAR	
1.3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	V
2.1	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	V
2.2	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	V
3.1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	V	+	+	+	-	-	+	V	+	+
5.1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
5.2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
5.3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
5.4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	V
6.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	-	+	+	+	V
6.3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	-	-	+	+	+	V
6.4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	V
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
6.6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	V	+	+	V
6.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	V	+	V
6.8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+
8.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	V	+	-	V
8.2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
8.3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
9.1	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
15.1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
16.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Quadro 2 – Pannel de anticorpos monoclonais (workshop internacional) dos doadores utilizados no protocolo de imunização.

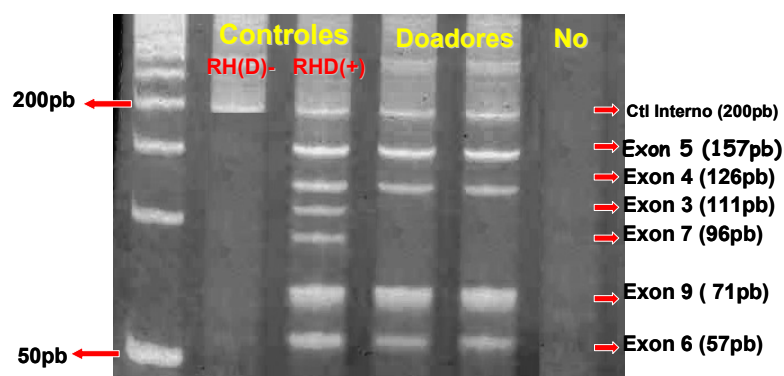


Figura 11: Técnica de PCR multiplex para caracterização molecular do gene *RHD* dos doadores utilizados na imunização dos camundongos (Fonte: Laboratório de Biologia Molecular – Banco de Sangue Hospital Sírio Libanês, 2009).

## 4.2 OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Utilizaram-se 05 camundongos da linhagem BALB/c para os protocolos de imunização anteriormente descritos sendo que todos os animais do protocolo DIVSP permaneceram vivos até o dia da fusão. Entretanto, no protocolo DIVS, 01 animal morreu impedindo o procedimento de fusão celular. Realizaram-se nove fusões celulares a partir de dois protocolos de imunização diferentes, sendo protocolo DIVS

para imunização utilizando hemácias D categoria IV<sup>a</sup> e protocolo DIVSP para imunização utilizando hemácias D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína, correspondendo a um total de 2.470 células construídas envolvendo os dois protocolos no período de março a agosto de 2009 (Tabela 1).

Tabela 1 - Híbridos construídos nos protocolos de imunização utilizando como antígeno hemácias Rh(D)+ fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> (DIVS), e hemácias D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína (DIVSP) segundo o rendimento.

<b>FUSÃO</b>	<b>Nº placas de 96 poços</b>	<b>Nº de híbridos distribuídos</b>	<b>Nº de híbridos testados</b>	<b>% de híbridos testados</b>
DIVS 1	3	289	56	19,4
DIVS 2	3	289	66	22,8
DIVS 3	2	179	179	100,0
DIVS 4	2	179	179	100,0
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>936</b>	<b>480</b>	<b><math>\bar{X}=60,5</math></b>
DIVSP 1	4	347	347	100,0
DIVSP 2	2	171	171	100,0
DIVSP 3	3	211	211	100,0
DIVSP 4	4	343	343	100,0
DIVSP 5	5	462	462	100,0
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>1.534</b>	<b>1.534</b>	<b><math>\bar{X}=100,0</math></b>

Três dias após a fusão, iniciou-se a observação das placas de cultura para identificação dos híbridos que se desenvolveram (figura 8). O método de triagem definido como padrão foi o de hemaglutinação em microplacas utilizando as mesmas hemácias ou hemácias com a mesma característica fenotípica da hemácia que serviu à imunização dos animais.

Do total de 2470 células construídas, 2014 (81%) foram testadas inicialmente. Os híbridos considerados reagentes no primeiro teste foram expandidos e progressivamente testados para se definir a estabilidade dos mesmos em cultura. No protocolo DIVS dos 480 híbridos testados foram identificados 259 híbridos cujo desempenho no teste de hemaglutinação em microplacas mostrou-se reagente. Para o protocolo DIVSP, partindo de 1534 híbridos testados, obtiveram-se 105 híbridos

reagentes. À medida que os híbridos eram expandidos, o desempenho de reatividade foi decrescente, como é descrito na literatura, pois nem todos os rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a fusão celular são estáveis. Entre cada teste houve um intervalo de tempo de no mínimo 72 horas. Desta forma, o desempenho dos testes foi de 206 e 29 híbridos reagentes para o protocolo DIVS (no 2º e 3º retestes, respectivamente) e 71 e 30 para o protocolo DIVSP. As figuras 11 e 12 mostram a reatividade dos híbridos nos diferentes testes de triagem de cada protocolo.

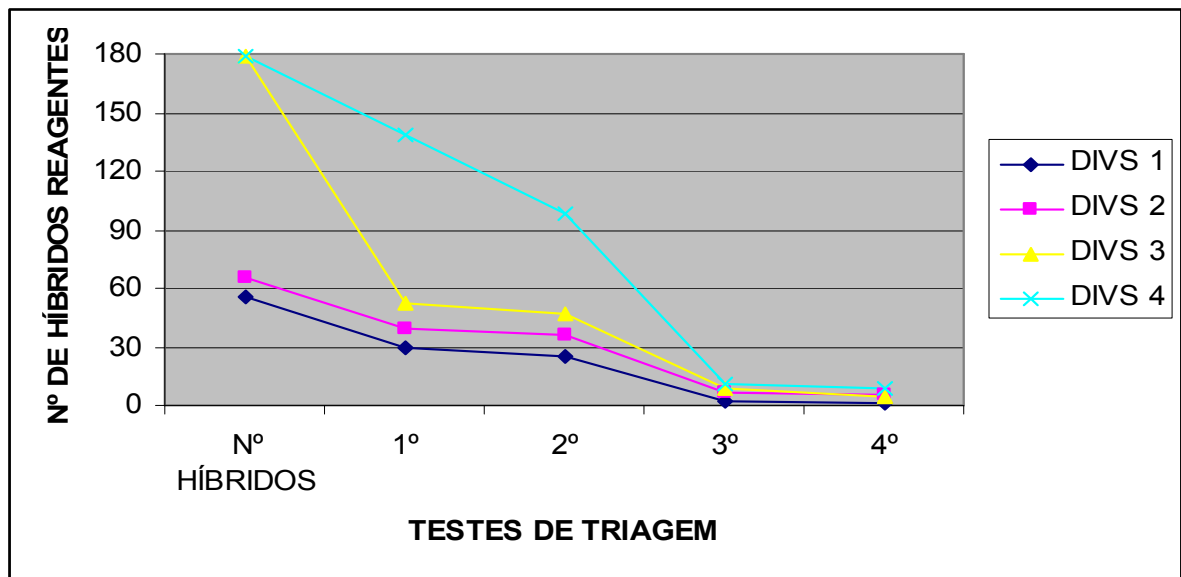


Figura 12: Desempenho da reatividade dos sobrenadantes de cultura dos híbridos reagentes ao longo do tempo (DIVS).

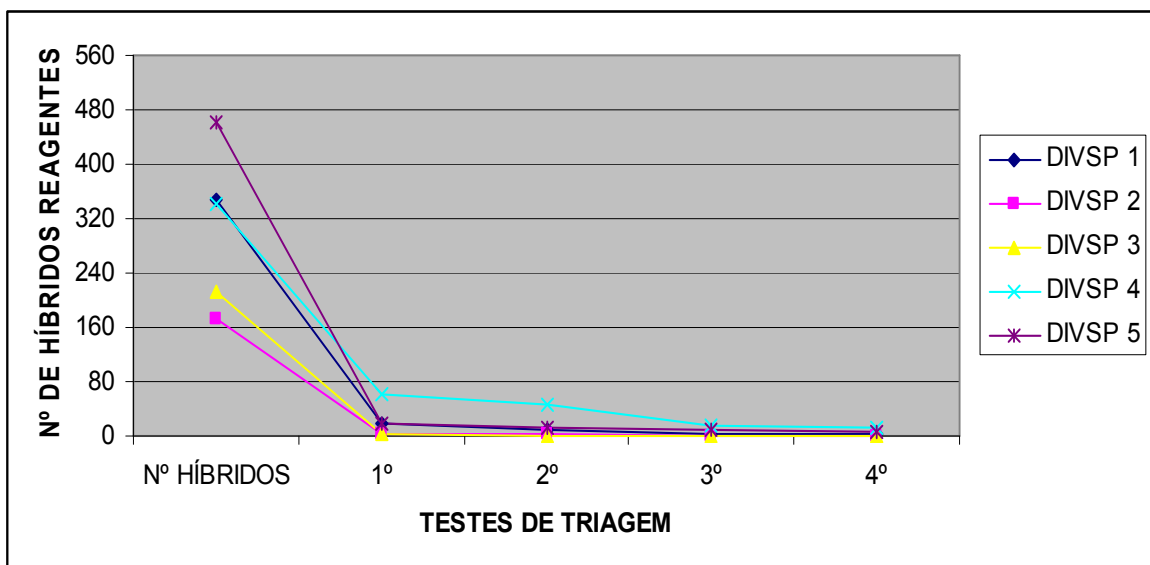


Figura 13: Desempenho da reatividade dos sobrenadantes de cultura dos híbridos reagentes ao longo do tempo (DIVSP).

Durante o processo de expansão celular, alguns híbridos não apresentaram crescimento satisfatório ou contaminação bacteriana e foram eliminados do experimento; foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido 20 híbridos do protocolo DIVS e 21 híbridos do protocolo DIVSP para a constituição do banco de células. Estes híbridos foram clonados, cujo procedimento visa garantir que a imunoglobulina obtida no final do processo seja oriunda de células de padrão único. Para assegurar uma clonagem eficiente, os híbridos em cultura foram submetidos ao teste de viabilidade. Segundo DAVIS (1994), as células devem apresentar viabilidade igual ou acima de 90% para serem clonadas, entretanto, os valores obtidos foram abaixo, porém próximos a 90% e decidiu-se por realizar a clonagem. Os percentuais de viabilidade, em cada processo de clonagem estão expressos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> (DIVS) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por hemaglutinação.

<b>Protocolo</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>Nº clones testados</b>	<b>Nº clones obtidos</b>	<b>Nº clones retidos no 3º teste</b>
DIVS 2 - 12	89,5	78	32	5
DIVS 2 - 56	83,3	56	19	5
DIVS 2 - 65	81,8	28	10	5
DIVS 2 - 196	84,4	9	3	1
DIVS 2 - 225	85,7	17	17	5
DIVS 3 - 22	91,6	15	5	5
DIVS 3 - 81	50,0	17	16	5
DIVS 4 - 65	69,5	17	2	2
DIVS 4 - 71	72,2	12	11	5
DIVS 4 - 88	74,0	19	9	5
<b>TOTAL</b>	<b><math>\bar{X}</math> 78,2</b>	<b>268</b>	<b>124</b>	<b>43</b>

TABELA 3 – Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína (DIVSP) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por hemaglutinação.

<b>Protocolo</b>	<b>Viabilidade (%)</b>	<b>Nº clones testados</b>	<b>Nº clones obtidos</b>	<b>Nº clones retidos no 3º teste</b>
DIVSP 1 - 321	85,0	23	15	5
DIVSP 2 – 4		2	2	2
DIVSP 3 – 65		9	6	5
<b>TOTAL</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>40</b>	<b>23</b>	<b>12</b>

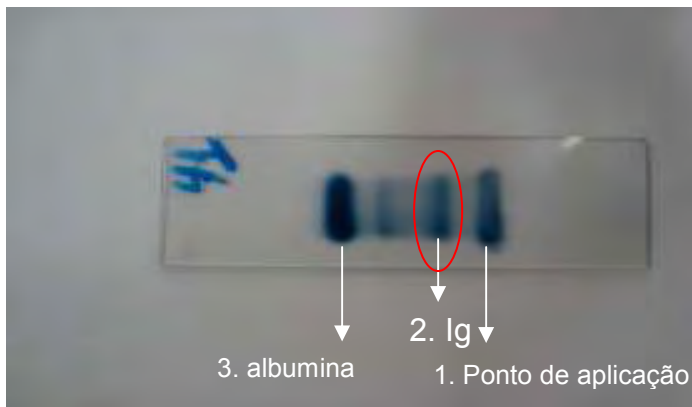
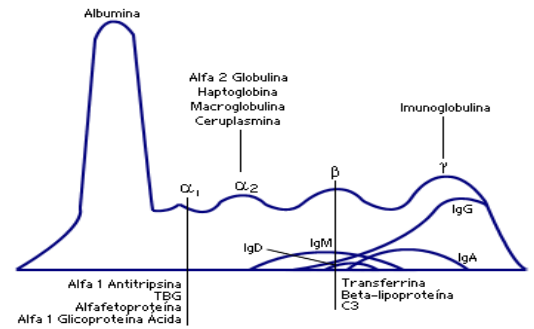
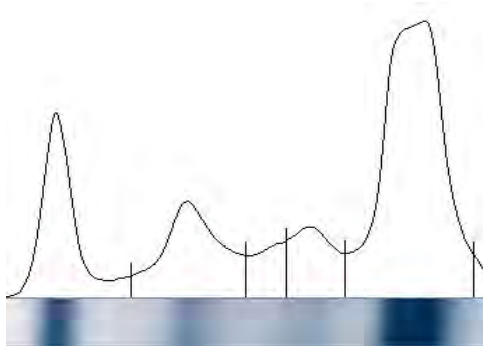
O controle da clonalidade foi realizado pela técnica de eletroforese em gel de ágar a 1%. A Figura 14 representa o controle realizado com o teste coradol com azul de Coomassie.

Uma vez identificado a clonalidade pela eletroforese, foram realizadas as determinações de classe pela técnica de Ouchterlony e posteriormente classe e sub-classe por citometria de fluxo usando kit CBA-BD<sup>®</sup>.

Pelo método Ouchterlony foram identificadas 10 IgM e 17 IgG. A Figura 15 mostra o arco de precipitação do teste realizado e corado por azul de Coomassie.

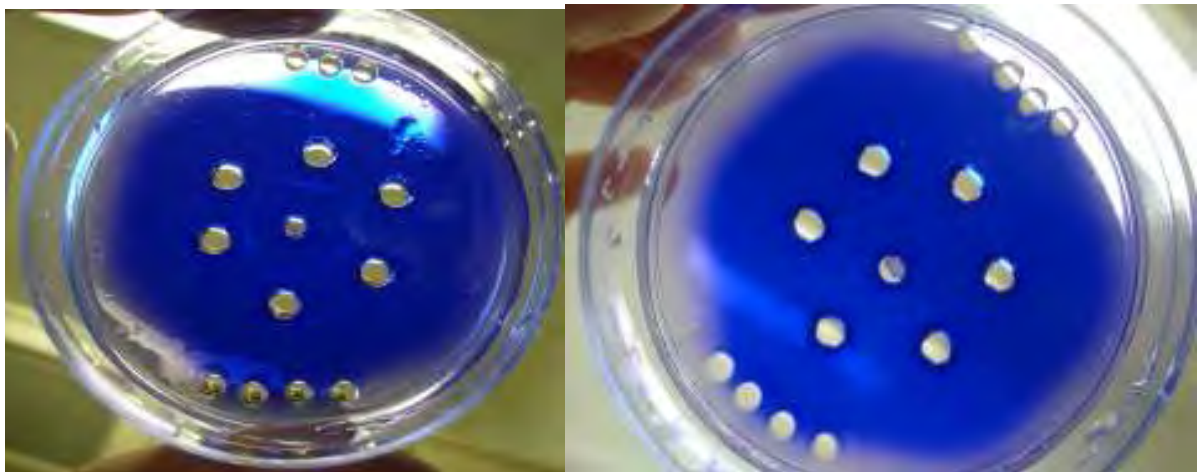
Os desempenhos dos 27 clones testados por citometria de fluxo estão listados na Tabela 4. Este método, mais sensível e específico confirmou a classe das imunoglobulinas determinando a sub-classe de IgG.





Frações	%
Gama	17.7
Beta	16.5
Alfa 2	4.9
Alfa 1	8.8
Albumina	51.2
Pré-Albumina	0.9

**Figura 14:** Técnica clássica de eletroforese em gel de agar a 1%: **1** Ponto de aplicação, **2** Imunoglobulinas (Ig) e **3** albumina.



**Figura 15:** Método de imunoprecipitação Ouchterlony. Método onde ocorre precipitação na região de equivalência quando antígeno e anticorpo se difundem no ágar. **Centro:** **Anticorpo anti-IgG**, **Anticorpo 1:** Ocorreu precipitação (IgG), **Anticorpo 2:** Ocorreu precipitação (IgG) e **Anticorpo 3:** Não ocorreu precipitação (IgG).

Tabela 4 – Classe e sub-classe, determinada por citometria de fluxo, dos anticorpos produzidos pelos clones obtidos nos protocolos de imunização com hemácias fenótipo D categoria IV<sup>a</sup> (DIVS) e com hemácias D categoria IV<sup>a</sup> tratadas com enzima papaína (DIVSP).

<b>Clone</b>	<b>Classe/subclasse</b>
DIVS 2 – 12A47, A74	IgG1k
DIVS 2 – 56A68, A77	IgM k
DIVS 2 – 65A48, A65	IgG1k
DIVS 2 – 196A54	IgM k
DIVS 2 – 225A06, A56	IgM k
DIVS 3 – 22A27, A38, A43	IgG1k
DIVS 3 – 81A05, A36, A46	IgG1
DIVS 4 – 65A31, A95	IgG1 k
DIVS 4 – 71A22, A23, A48	IgG2a k
DIVS 4 – 88A35, A47	IgG2a k
DIVSP 1 – 321A31, A44, A65	IgG1 k
DIVSP 2 – 4A75, A90	IgM k
DIVSP 3 – 65A21, A24, A30	IgM k

Na figura 16 estão representados os gráficos de “dot plot” do *software Cell Quest* – (BD Bioscience®) do controle negativo, dois controles positivos e análise de classe e subclasse de alguns dos clones testados.

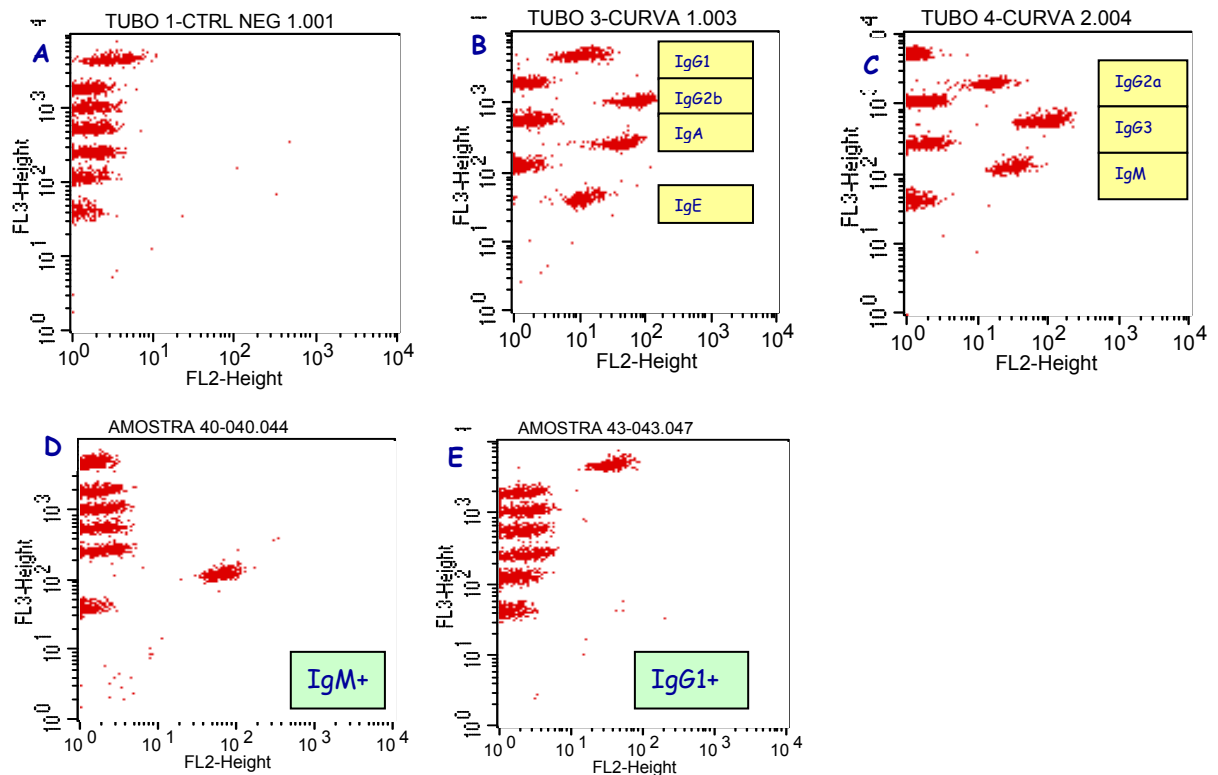


Figura 16: Determinação de Classe e Subclasse de Imunoglobulinas murinas pelo método *CBAFlow* (BD Bioscience®). (A) Controle negativo; (B) controle positivo para IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgA, IgE; (C) controle positivo para IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgM; (D) Amostra 56A68 IgM; (E) Amostra 12A47 IgG<sub>1</sub>.

#### 4.3 CONFIRMAÇÃO DA ESPECIFICIDADE

Esta etapa foi realizada inicialmente com auxílio de hemácias fenotipadas do Banco de Sangue – Hospital Sírio Libanês. A técnica de screening para verificação da reatividade do anticorpo escolhida foi o método convencional de aglutinação clássica em tubos. Todos os anticorpos monoclonais obtidos apresentaram reatividade 4+ com todas as hemácias testadas. Diante de tais resultados, propõe-se a titulação de anticorpos monoclonais comerciais com hemácias Rh(D)+ e Rh(D)-, e fez-se a comparação com os títulos dos monoclonais obtidos *in house*. Os resultados demonstraram mesmo padrão de título utilizando diferentes hemácias, o que descarta o propósito inicial de produção de anticorpos anti-D. Os anticorpos monoclonais estão sendo analisados com outras hemácias e em outras técnicas, para uma posterior caracterização da especificidade.

## 5 DISCUSSÃO

Os sobrenadantes de cultura analisados por citometria de fluxo revelaram que os anticorpos monoclonais obtidos na presente pesquisa foram na maior parte imunoglobulinas da classe IgG<sub>1</sub>. No entanto, também foram produzidos imunoglobulinas da classe IgM e IgG<sub>2a</sub>.

O foco do trabalho foi a produção de anticorpos monoclonais dirigidos ao antígeno D (RH1), no entanto, as hemácias utilizadas para a imunização dos camundongos carregavam em sua membrana outros antígenos eritrocitários, o que pode ter levado a formação de outros anticorpos eritrocitários, justificando diferentes classes de imunoglobulinas.

Os clones obtidos foram selecionados para obtenção de anticorpos por líquido ascítico. A produção do líquido ascítico se fez necessária para garantir seu uso posterior na rotina imuno-hematológica, por conter concentrações mais altas de imunoglobulinas secretadas que os sobrenadantes de cultura.

Infelizmente, é uma realidade brasileira, não termos em diversas situações, condições de encerrar nossos estudos imuno-hematológicos, não por falta de interesse, e sim por falta de reagentes disponíveis no mercado, necessários para conclusão dos casos.

Os anticorpos monoclonais continuam em estudo, para uma posterior caracterização da(s) especificidade(s).

## 6 CONCLUSÕES

A produção de hibridomas secretores de anticorpos contra antígenos eritrocitários humanos foi possível.

Os anticorpos monoclonais produzidos foram da classe IgG<sub>1</sub>, IgM e IgG<sub>2a</sub>.

Os anticorpos monoclonais produzidos, em uma primeira fase do estudo de caracterização, não demonstraram de imediato, a especificidade foco do presente trabalho que foi a produção de anticorpos anti-D, dirigidos a fenótipos D categoria, no entanto, os hibridomas podem ter secretado diferentes especificidades de anticorpos monoclonais, de acordo com os antígenos presentes na membrana das hemácias dos doadores utilizados para a imunização dos camundongos.

Uma segunda fase do projeto está sendo feita para confirmação da(s) especificidade(s) dos anticorpos monoclonais produzidos, utilizando novos testes para a identificação das imunoglobulinas.

## 7 PERSPECTIVAS

A pesquisa será mantida com a caracterização dos anticorpos monoclonais obtidos, utilizando outros métodos de identificação de anticorpos. Depois de caracterizados estes anticorpos monoclonais, pretende-se colocá-los na rotina imuno-hematológica e para o futuro, de acordo com a caracterização dos anticorpos, há o interesse de registro e /ou patenteamento dos produtos obtidos.

### 7.1 VALIDAÇÃO MULTICÊNTRICA

Uma vez caracterizados os anticorpos, a produção em média escala, utilizando batch de cultura pela técnica de Spinners será realizada seguida das etapas de controle de qualidade a ajuste de titulação. *A posteriori*, os anticorpos serão aliquotados e enviados em centro parceiros para controle em paralelo com reagentes comerciais disponíveis.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSART-PIRENNE, H.; ASSO-BONNET, M.; LE PENNEC, P.Y.;ROSSEL, M.; PATEREAU, C.; NOIZAT-PIRENNE, F. RhD variants in Caucasians: consequences for checking clinically relevant alleles. *Transfusion*, v.44, p.1282-1286, 2004.

BLANCHARD, D. Biochemical Approaches to the Detection and Characterization of Membrane Proteins Carrying Blood Group Determinants. *Transf.Clin.Biol*, v.4, p.217-22, 1995.

BROW, G.; LING, N.R.; SHAPIRO, H. *Practical flow cytometry*. 3.Ed. New York: Iley Liss, 1995, 353p.

CATTY, D.; RAYKUNDALIA, C. Immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunostaining. In: CATTY, D. *Antibodies: a practical approach*. Washington: IRL PRESS, 1998.v.I, cap.6, p.137-167.

COOPER, G.M. The cell surface In: *The cel: a molecular approach*. Washington: ASM Press 1997, cap.12, p.467-517

DANIELS, G. et al. Terminology for red cell surface antigens. ISBT working party Oslo report. *Vox Sang* 1999, v.77, p.52-7.

DANIELS, G. *Human Blood Groups*. Blackwell Science, 1995, cap.5, p.257.

DANIELS, G. et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Blood Cell Surface Antigens: Macao report. *Vox Sanguinis* v.96,p.153-156, 2009.

DANIELS, G.; BROMILOW, I. *Essential Guide to Blood Groups*. Blackwell Publishing, 2007, cap.4, p.33.

DAVIS, J.N. *Basic cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1994. 301p.

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

DEFFUNE, E. ; SECCO, V.D.N.P. ; MACHADO, P.E.A. *Manual GMP-BPL dos laboratórios de Imunohematologia – Botucatu*, Hospital das Clínicas, FMB. UNESP, 2ª versão, p.134, 1996.

DENOMME, G.A.; DAKE, L.R.; VILENSKY, D. RAMYAR, L.;JUDD, W.J. Rh discrepancies caused by variable reactivity of partial and weak D types with different serologic techniques. *Transfusion*, 48: 473-478, 2008

ENGELFRIET, C.P. et al. International Forum Testing for weak D, *Vox Sanguinis*, v.90; p.140-153, 2006.

FLEGEL, W.A.; WAGNER, F.F. Acesso em 18 jan.2010. On line. Disponível na Internet <http://www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/>

GALLAGER, P.G, FORGET, B.G., LUX, S.E. Disorders of Erythrocyte Membrane. In: NATHAN, D.G., OSKI, F.A., ORKIN, S.H. *Nathan and Oski's Hematology of Infancy and childhood*. 5ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. cap.16, p.544-664

GEUS, B. & HENDRIKSEN, C.F.M. In vivo and in vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives (74<sup>th</sup> Forum in Immunology) *Res. Immunol.* 149: 533-620, 1998.

GIRELLO, A.L.; KÜHN, T.I.B. *Fundamentos da Imuno-hematologia Eritrocitária*. 2ª edição, Editora Senac, 2002.

GORDON, J. Human Monoclonal Antibodies. In: CATTY, D. *Antibodies: a practical approach*. Washington: IRL Press, 1988. 1 (4), p.105-112.



HAYDEN, G.E.; WALKER, K.Z.; MILLER, J.F. Simultaneous cytometric analysis for the expression of cytoplasmic and surface antigens in activated T cells. *Cytometry*, 9(1): 44-51, 1988.

HARLOW, E.; LANE, D. Eds. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HUANG, C.H. Molecular insights into the Rh protein family and associated antigens. *Current Opinion in Hematology* ;v.4:p.94-103, 1997

International Society for Blood Transfusion (ISBT). Acesso em 18 jan.2010. On line. Disponível na internet <http://www.blood.co.uk/ibgri>.

JONES, J.; SCOTT, M.L.; VOAK, D. Monoclonal anti-D specificity and Rh D structure: criteria for selection of monoclonal anti-D reagents for routine typing of patients and donors. *Transfus Med*. V.5:p.171-84, 1995.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.

LOMAS-FRANCIS, C.; REID, M.E. The Rh blood group system: the first 60 years of discovery. *Immunohematology*. v16:p. 7-17, 2000.

MAASKANT-VAN WIJK, P.A. et al. Genotyping of *RHD* by multiplex polymerase chain reaction analyseis of six *RHD*-specific exons. *Immunohematology*. 38: 1015-1021, 1998.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J.A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytomeric bead assay: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin. Immunol*. 110: 252-266, 2004.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. *Rev.bras.hematol.hemoter.*,29(2):168-178,2007.

O'CONNOR, K.L. O sistema de Grupo Sanguíneo Rh. In: HARMENING, D. *Técnicas Modernas em Banco de Sangue e Transfusão*. 2ª edição, Revinter, 1992. cap.6, p.109.

OLIVEIRA, J.C.V. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos de Metacestóides de *Taenia saginata*. Botucatu, 2009. *Tese Mestrado* – Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

PRICE, K.M. Production and characterization of synthetic peptide-derived antibodies In: RITTER, M.A. & LADYMAN, H.M. (Eds.). *Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. Cap. 5, p.66-68.

REID, M.E.; LOMAS-FRANCIS, C. *The Blood Group antigen*. 2.ed.: Elsevier Academic Press, 2004, p.117.

ROITT, I. Técnicas imunológicas. In: ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D.K. *Imunologia*. 4.ed. São Paulo: Manole, 1997.cap.28, p1-15.

SCOTT, M. Rh serology – Coordinator's report. *Trans Clin Biol*. v.6:p.333-7, 1996.

TELEN, M.J. Erythrocyte Blood Group Antigens: Not Simple After All. *Blood*, v.85, p.299-306, 1995

TIPPETT, P. A speculative model for the Rh blood groups. *Ann Hum Genet*, v.50: p.241-7, 1986.

TIPPETT, P.; LOMAS-FRANCIS, C.; WALLACE, M. The Rh antigen D: partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sang*, v.70, p.123-31, 1996.

WAGNER, F.F.; FLEGEL, W.A. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. *Immunohematology*. v.20, p.23-36, 2004.

WESTHOFF, C.M. Rh complexities: serology and DNA genotyping. *Transfusion*, v.47: 17S-22S, 2007.

## **ANEXOS**

Anexo 1: Aprovação do Comitê Experimental do Hospital Sírio Libanês.

Anexo 2: Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – campus Botucatu, com protocolo nº 766/2009 – CEEA o comitê da Universidade Estadual Paulista

## Anexo 1: Aprovação do Comitê Experimental do Hospital Sírio Libanês



Hospital  
Sírio Libanês  
INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA

### PROJETO DE PESQUISA

#### Requisitos do Projeto

**Título:** ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS EM IMUNOHEMATOLOGIA

**Pesquisador:** Regina Aparecida Cardoso

#### Resumo / sumário do projeto (máximo 200 caracteres)

Produção de anticorpos monoclonais para auxílio no diagnóstico hemoterápico, pois não há no mercado brasileiro grande variedade de anti-soros, dificultando a conclusão de casos imunohematológicos.

#### Objetivos (máximo 3 grandes objetivos)

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos eritrocitários humanos.  
Estudar a expressão dos antígenos Rh(D) utilizando os anticorpos obtidos.  
Registrar e patentear os produtos obtidos.

#### Originalidade

A tecnologia de produção de anticorpos monoclonais revolucionou o diagnóstico e o tratamento na área médica, não só humana, como em veterinária. Apesar desta tecnologia já ter mais de 30 anos, desde a descrição em 1975, por Kohler e Milstein e sua ampla aplicação, a aspirada diminuição de custos para os serviços de saúde ainda não se tornou realidade. Trata-se de tecnologia dominada por países com grande investimento em biotecnologia, fato este não evidenciado fortemente no Brasil.

#### Metodologia (máximo 200 caracteres)

Imunização de animais e produção de anticorpos monoclonais murinos a partir de banco de hemácias, clonagem celular, confirmação da monoclonalidade e especificidade do anticorpo produzido.

#### Orçamento

Descrição	Valor Total
Consumo	38.330,08
Equipamento	
Outros:	

**Fonte de Financiamento:** A realização da pesquisa não trará ônus financeiro para nenhuma das instituições envolvidas: Hospital Sírio Libanês e Hospital das Clínicas

## Anexo 1: continuação



Hospital  
Sírio Libanês  
INSTITUTO DE ENSINO E PESQUISA

da FMB-UNESP, uma vez que se trata de uma das metas prevista no convênio existente entre a ANVISA-FAMESP nº 030, em vigência, com saldo em conta, sob coordenação da Dra. Elenice Deffune.

**Resultados esperados** (máximo 100 palavras)

Produzir anticorpo monoclonal para auxílio no diagnóstico dos pacientes que necessitam transfusões.


**Equipe envolvida** (Pesquisador principal e pesquisadores colaboradores)

Pesquisador principal: Regina Aparecida Cardoso  
Colaboradores: Dra. Elenice Deffune - Hemocentro de Botucatu, Dr. Silvano Wendel e Dra. Rita Fontão Wendel - Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês e ANVISA/MS ou outro centro de referência no exterior.

**Infra-estrutura disponível**

Toda a infra-estrutura necessária para a produção de anticorpos monoclonais murinos já existe instalada no Laboratório de Engenharia Celular - Hemocentro de Botucatu, não sendo necessário a aquisição de nenhum outro equipamento.

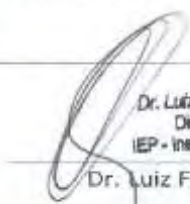
**Infra-estrutura necessária e não disponível**

  
Regina Aparecida Cardoso  
Pesquisador Principal

**PARECER DA DIRETORIA DE PESQUISA**

O projeto deverá ser todo executado na UNESP de Botucatu, sem nenhum impacto financeiro ou contribuição científica do HSL. O comitê de ética deverá estabelecer normas para que a pesquisadora tenha acesso às amostras necessárias à validação dos anticorpos.

Parecer: Aprovado

  
Dr. Luiz Fernando Lima Reis  
Diretor de Pesquisa  
IEP - Inst. de Ensino e Pesquisa  
Dr. Luiz Fernando Lima Reis

Anexo 2: Aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UNESP – campus Botucatu, com protocolo nº 766/2009 – CEEA o comitê da Universidade Estadual Paulista

 **Universidade Estadual Paulista**  
**Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distribuição Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

  
  
**Comissão de Ética em Experimentação Animal**

## C E R T I F I C A D O

**CERTIFICAMOS** que o Protocolo n.º 766 sobre o projeto de pesquisa "Anticorpos monoclonais em Imunohematologia", que será conduzido por Regina Aparecida Cardoso, orientada pela Profª Drª Elenice Deffune e apoio técnico de Fátima Regina Guimarães, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongo", são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a sanidade dos mesmo.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 29/10/2009.

Profª Drª Regina H. Garcia Martins  
Presidente da CEEA

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA