GABRIELLE REINOLDES BIZARRIA GUILHERME

**Caracterização e validação de anticorpo monoclonal
murino anti-Linfócitos B humanos para uso em citometria
de fluxo e imunoquímica**

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

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Co-Orientadora: Dra. Márjorie de Assis Golim

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

Guilherme, Gabrielle Reinoldes Bizarria.

Caracterização e validação de anticorpo monoclonal murino anti-linfócitos B humanos para uso em citometria de fluxo e imunoquímica / Gabrielle Reinoldes Bizarria Guilherme. – Botucatu, 2010.

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

Orientadora: Elenice Deffune

Co-orientadora: Márjorie de Assis Golim

Assunto CAPES: 40101037

1. Imunologia 2. Imuno-histoquímica

Palavras-chave: Anticorpos monoclonais; Citometria de fluxo; Imuno-histoquímica; Linfócitos B; Neoplasias

Dedicatória

Á meus pais e minha irmã

Agradecimentos

Sobretudo e todos, agradeço a meus pais, Luzia e Manoel, por todo esforço realizado, por aceitarem, apoiarem e entenderem minhas escolhas, sem nunca duvidar da minha capacidade, e por sempre andarem do meu lado, me ajudando a levantar toda vez que caia. Meus pilares de exemplo, honestidade e sabedoria. Não há palavras para expressar meu sentimento de gratidão.

À minha irmã Michelle, meu exemplo de perseverança e profissionalismo. Pelas críticas sempre construtivas e pela presença mesmo que distante. Muito obrigada.

Às minhas sobrinhas, Nicole, Carolina e Manuela por nunca me deixarem esquecer da criança dentro de mim.

Meu cunhado, Luis Eduardo, pelos conselhos valiosos.

Ao Bruno, amigo, conselheiro e guia. Você sempre segurou minha mão. Obrigada pela capa.

À Dra. Elenice, professora de genialidade e experiência incontestável, que sempre me deu liberdade de expressão, apoiando minhas decisões e ensinando que os caminhos da ciência e da pesquisa quase nunca são fáceis. São seis anos aprendendo todos os dias.

À Dra. Márjorie, amiga que me aceitou como aluna. Obrigada pelos ensinamentos, por “quebrar a cabeça” comigo, por me colocar no eixo quando necessário e pela amizade fornecida.

À Dra. Rosana, professora que ultrapassa a barreira do laboratório, sendo amiga e mãe sempre que necessário. Obrigada pelo sorriso quando o mundo parecia desmoronar.

À amiga Vitória. À irmã Xuxu. À colega Pink. Não há palavras para expressar minha gratidão nesses três anos passados junto à você. Obrigada por me acolher, alimentar, ajudar, fazer rir, e dizer que tudo vai dar certo. Nós ainda “Vamos dominar o mundo!”, e sim, tem que ser agora.

À Priscila, Josy, Marina, Daniel e Andrei. Companheiros de laboratório desde o início de minhas aventuras. Amigos dentro e fora da Faculdade. Obrigada pelas brilhantes idéias que contribuíram para o desenrolar-se deste trabalho.

Às amigas Tata e Léa por tornarem os dias menos pesados.

À Michelle, que em um mês se transformou de uma colega para uma amiga. Obrigada por todo esforço colocado neste trabalho, todo sangue dado, que não teria se concretizado sem sua preciosa ajuda.

À todos do Laboratório de Engenharia Celular, pela contribuição e amizade, mesmo que em curtos períodos de convivência.

À Janice por resolver todas as burocracias.

Carlinhos (biotério) pela paciência e dedicação.

Ao Valdir, Ângela, Rita, Priscila, Patrícia, Cléo, Dra. Rejane, Dadá e Denise por toda ajuda e ensinamento que levarei comigo para sempre.

Aos colegas da Patologia, que facilitaram de diversos modos este trabalho: Luciano, Luciandro, Dra. Mariângela e, especialmente, Dra. Maria.

Aos professores da morfologia: Dr. Sérgio e Dr. Robson; da parasitologia: Dra. Semirmes e da anestesiologia: Dr. Thadeu.

À Rita, departamento de genética, e à Camila, departamento de imunologia, por tentarem encaixar peças do quebra-cabeça.

À Cilene, departamento de Biofísica, exemplo de solidariedade.

Aos amigos da Engenharia Química – FEI, (Mari R., Tati, Dafne, Fernando, Mari S., Maite, e especialmente Mari, Pri, Tamires, Léo, Báh e Woody), obrigada pela força e pela amizade. Sem a ajuda de cada um, este trabalho não teria se desenvolvido.

Às amigas, irmãs de coração, Irina, Roberta, Sheila, Camile (Mi), Julieta e Camila (kk) por toda cooperação, pelo ombro para chorar, pelo riso para dar, pela cumplicidade dividida. Só tenho a agradecer as amigas maravilhosas que tenho. Aos amigos Bruno, Guilherme e Fernando Cardia.

Ao André. Uma amizade que surgiu sem querer e é fortalecida a cada dia. Obrigada por tornar meus dias em Botucatu melhores.

À Janaína por permitir a invasão de privacidade nos últimos dois anos. À Vivian por emprestar a Vi quando necessitei.

A todos os outros que ajudaram e contribuíram, direta ou indiretamente, a este trabalho. Com certeza a ajuda de cada um foi essencial e me trouxe um pouco mais de aprendizado.

Epígrafe

Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma,
Até quando o corpo pede um pouco mais de alma,
A vida não pára
Enquanto o tempo acelera e pede pressa,
Eu me recuso faço hora e vou na valsa
A vida é tão rara.
(Paciência – Lenine)

Lista de Figuras

Figura 1: Representação das imunidades inata e adaptativa, focando especificidade e tempo de resposta	22
Figura 2: Representação estrutural da imunoglobulina	24
Figura 3: Estruturas gerais das cinco classes de anticorpos secretados	26
Figura 4: Organização das seqüências gênicas dos cromossomos humanos 14, 2 e 22	27
Figura 5: Rearranjo genético para construção das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas	28
Figura 6: Esquema da produção de imunoglobulinas ligadas a membrana e secretadas	30
Figura 7: Elementos que compõe a superfamília das imunoglobulinas	31
Figura 8: Moléculas de superfície dos linfócitos B marcadores de maturação celular	32
Figura 9: Desenvolvimento das células B na medula óssea	33
Figura 10: Arranjo do receptor de célula B (BCR)	34
Figura 11: Complexo co-receptor e BCR para amplificação do sinal de ativação	36
Figura 12: Resumo da maturação dos linfócitos B até células plasmáticas e células de memória	37
Figura 13: Esquema da produção de anticorpo monoclonal	40
Figura 14: Esquematisação do ensaio de <i>Western Blotting</i>	49
Figura 15: Esquema do citômetro de fluxo e de um gráfico tipo <i>dot plot</i> de sangue total	51
Figura 16: Esquematisação da imunofluorescência indireta	53
Figura 17: Esquema de trabalho das imunizações dos testes in vivo	53
Figura 18: Padrão de gráficos obtidos pelo método de CBA para IgG ₁	58
Figura 19: Padrão de gráficos obtidos pelo método de CBA para IgM	59
Figura 20: Gráfico obtido na purificação de IgG _{2b}	60
Figura 21: Gráfico obtido na purificação de IgM	61
Figura 22: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de ágar 1% da purificação da IgG	65
Figura 23: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de ágar 1% da purificação da IgM	66
Figura 24: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de ágar comercial da purificação da IgG	67
Figura 25: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de Ágar comercial da purificação da IgM	68
Figura 26: Gel de SDS-PAGE que representa o padrão obtido na purificação das IgG	69
Figura 27: Figura que demonstram o resultado obtido com gel de SDS-PAGE da purificação da IgM	70
Figura 28: Demonstração da marcação obtida através do <i>Western Blotting</i> realizado com ascite diluído 1:1000	71

Figura 29: Demonstração da marcação obtida através padrão do <i>Western Blotting</i> realizado com purificado e no sistema semi-automatizado Phast System™	73
Figura 30: Gráfico obtido a partir do <i>Western Blotting</i> da figura 29	74
Figura 31: SDS-PAGE com os extratos feitos <i>in house</i>	76
Figura 32: SDS-PAGE 4-15 com extratos comerciais de BJAB, RAMOS e JURKAT corados com azul de Coomassie	76
Figura 33: Gráficos de quantidade de células marcadas <i>versus</i> quantidade de anticorpo utilizada, teste realizado para LINB B,C e E	79
Figura 34: Padrão encontrado de histogramas e dot plots (A) em testes com indivíduos normais com anti-CD107b (B) e com LINB E (C)	80
Figura 35: Gráfico do desempenho do LINB C e Anti-CD19 em indivíduos normais com relação a porcentagem de células marcadas	81
Figura 36: Gráfico do desempenho do LINB C e Anti-CD19 em indivíduos com neoplasias hematológicas com relação a porcentagem de células marcadas	82
Figura 37: Gráfico do teste de correlação entre LINB C e anti-CD19 em indivíduos com neoplasias hematológicas	84
Figura 38: Gráfico do teste de correlação entre LINB C e anti-CD20 em indivíduos normais	86
Figura 39: Gráfico do teste de correlação entre LINB B e anti-CD171 em indivíduos com neoplasias hematológicas	88
Figura 40: Gráfico do teste de correlação entre LINB B e anti-CD45RA em indivíduos normais	90
Figura 41: Gráfico do teste de correlação entre LINB E e anti-CD107b em indivíduos normais	92

Lista de Tabelas

Tabela 1: Clones secretores de imunoglobulinas e quantidade de ascite estocada	57
Tabela 2: Determinação de classe, sub-classe e expressão da cadeia leve das imunoglobulinas secretadas	58
Tabela 3: Volumes obtidos a partir das purificações das ascites	62
Tabela 4: Dosagens de proteínas totais (mg/mL)	63
Tabela 5: Dosagem de proteínas totais (mg/mL) pós concentração com sacos de diálise	64
Tabela 6: Dosagem de proteínas totais (mg/mL) e número de vezes concentrado após utilização do sistema da Millipore	64
Tabela 7: Pesos moleculares encontrados no primeiro <i>Western Blotting</i> com ascite diluído 1:1000	71
Tabela 8: Tabela com os pesos moleculares encontrados a partir das análises dos <i>Western Blottings</i> realizados com extrato da linhagem RAMOS e JURKAT	74
Tabela 9: Prováveis reconhecimentos dos anticorpos testados. Grifado de amarelo estão os escolhidos para continuidade dos testes	75
Tabela 10: Comparação entre pesos moleculares encontrados nos extratos comerciais (RAMOS e JURKAT) e produzido <i>in house</i> (extrato 4)	77
Tabela 11: Comparação entre os pesos moleculares encontrados nos diferentes extratos com uso de anticorpos comerciais	77
Tabela 12: Resumo da estatística descritiva de teste de inespecificidade dos anticorpos	78
Tabela 13: Resumo da estatística descritiva da comparação do LINB C com o anti-CD19	83
Tabela 14: Comparação do LINB C e anti-CD19 por <i>scores</i> de normalidade	84
Tabela 15: Resumo da estatística descritiva da comparação do LINB C com o anti-CD20	85
Tabela 16: Comparação do LINB C e anti-CD20 por <i>scores</i> de normalidade	86
Tabela 17: Resumo da estatística descritiva da comparação entre o LINB B e o anti-CD171	87
Tabela 18: Comparação do LINB B e anti-CD171 por <i>scores</i> de normalidade	88
Tabela 19: Resumo da estatística descritiva da comparação entre o LINB B e o anti-CD45RA	89
Tabela 20: Comparação do LINB B e anti-CD45RA por <i>scores</i> de normalidade	90
Tabela 21: Resumo da estatística descritiva da comparação entre o LINB E e o anti-CD107b	91
Tabela 22: Comparação do LINB E e anti-CD107b por <i>scores</i> de normalidade	92

Resumo

RESUMO

O sistema imunológico é dividido em imunidade natural e adquirido (humoral e celular). Os linfócitos B são os principais efetores da resposta humoral. Junto aos linfócitos T, mediam diversas reações imunológicas. Todos os leucócitos possuem antígenos de superfície (*clusters of differentiation* – CD) determinados que possuem as mais diferentes funções. As expressões destes CDs podem variar na maturação e na presença de patologias, sendo as de maior prevalência e gravidade as leucemias e linfomas, tornando-se marcadores importantes que podem ser avaliados por citometria de fluxo ou imunoquímica através do uso de anticorpos monoclonais murinos (AcMm). Após produção dos AcMm é necessário caracterizar e validá-los. Utilizou-se 11 clones que apresentaram especificidade somente contra linfócitos B. Pela técnica de *Western Blotting*, 5 anticorpos (3 do tipo IgM e 2 do tipo IgG) foram escolhidos de acordo com sua possível especificidade e importância clínica. A validação dos anticorpos tipo IgM foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpo comercial para comparação de quantidade de células marcadas, sendo testados em 20 amostras de indivíduos normais e 20 de indivíduos portadores de neoplasias hematológicas diversas. O LINB B, que foi comparado com o anti-CD171 e anti-CD45RA, apresentando diferença estatística somente em relação ao anti-CD45RA, e identidade com o anti-CD171. O LINB C, que foi comparado com o anti-CD20 e anti-CD19, não apresentou diferença estatística significativa quando frente a ambos anticorpos comerciais. No teste de regressão linear, houve maior correlação dos resultados com o anti-CD19. O LINB E foi comparado somente contra o anti-CD107b, havendo grande identidade entre os dois. Dos resultados apresentados, conclui-se que o LINBs B e E apresentam grandes chances de serem específicos contra o CD171 e CD107b, respectivamente, necessitando de expansão dos testes de validação (estudo multicêntrico). Para o LINB C, deve-se aumentar significativamente a amostra utilizada para delimitar melhor a validação. Os dois AcMm tipo IgGs, prováveis anti-CD138, estão em fase de teste.

Palavras-chave: linfócitos B, citometria de fluxo, anticorpos monoclonais, imuno-histoquímica, neoplasias.

ABSTRACT

The immunological system is divided into: natural immunity and acquired immunity (celular and humoral responses). The B lymphocytes are the main effectors of the humoral response. Together with the T lymphocytes, they make several immunological reactions. All leucocytes have antigens on the surface (*clusters of differentiation* – CD) that possess lot of functions. The expressions of these CDs may be altered during maturation and pathologies, like leukemia and lymphomas, becoming important markers that can be evaluated by flow cytometry or immunochemistry thought murine monoclonals antibodies (Mab). After production of Mabs it's necessary characterize and validated them. We used 11 clones that presented Mab against B lymphocytes only. By Western Blotting method 5 Mab (3 IgM and 2 IgG) were chosen according you possible especifity and clinical importance. The validation of IgM Mabs were made by flow cytometry using commercial antibody to compare the quantity of marked cells, being used 20 samples from normal people and 20 samples from person with hematological cancer. The LINB B, compared to anti-CD171 and anti-CD45RA, presented statistical difference from anti-CD45RA and identity to anti-CD171. The LINB C, compared to anti-CD19 and anti-CD20, didn't presented any statistical difference from both commercial antibodies, although it correlates better with anti-CD19. The LINB E was compared to anti-CD107b, where it appears great identity between then. By the present results, we conclude that LINB B and E need multicentre studies to expand validation, and LINB C, needs to increase the samples to have a statistical validation. The two IgGs LINB, possible anti-CD138, weren't test yet.

Key-words: B lymphocytes, flow cytometry, monoclonal antibodies, immuno-histochemistry, cancer.

Sumário

Sumário

Lista de Ilustrações

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução	20
2. Objetivos	42
3. Materiais e Métodos	44
3.1 Levantamento e escolha dos anticorpos utilizados	44
3.2 Determinação de classe e sub-classe pelo método CBA	44
3.3 Purificação de imunoglobulinas por cromatografia	44
3.4 Dosagem de concentração de proteínas totais	45
3.5 Concentração de proteínas	46
3.6 Controle de monoclonalidade	46
3.7 Determinação de especificidade por <i>Western Blotting</i>	47
3.8 Produção de extrato de membrana	49
3.9 Bioinformática	49
3.10 Escolha dos anticorpos para testes	49
3.11 Validação por citometria de fluxo	50
3.12 Análise estatística	51
3.13 Imunofluorescência indireta	51
3.14 Imunoquímica	52
3.15 Imuno-histoquímica	52
4. Resultados e Discussão	55
5. Conclusões	95
6. Perspectivas	95
7. Referências	97

Introdução

1. Introdução

Todos os seres vivos existentes possuem de alguma forma, um sistema de proteção contra agentes externos. Os vertebrados desenvolveram o sistema imunológico, que durante mais de 500 milhões de anos foi se adaptando as necessidades dos organismos mais recentes, o que resultou num sistema altamente complexo e com mecanismos de defesa adaptáveis as diferentes ameaças (COOPER e ALDER, 2006). O principal objetivo é a proteção contra agentes externos possivelmente nocivos, já que organismos vivos são seres passíveis de ataques constantes do ambiente que os cerca. A evolução orquestrou essa proteção de modo que mecanismos regulatórios controlassem o reconhecimento de antígenos externos, diferenciando esses das substâncias endógenas, atacando quando necessário, prevenindo dano tissular extenso e impondo limites de duração da resposta (ABBAS et al., 2008; MURPHY et al., 2008).

O sistema imune em humanos atingiu um nível de complexidade que para explicá-lo é essencial criar divisões didáticas, sendo as categorias mais abrangentes as imunidades: natural e a adquirida.

A imunidade natural (ou inata) possui quatro barreiras de defesa:

1. barreira anatômica: são barreiras físicas, consideradas a primeira linha de defesa contra patógenos, como pele e mucosas;
2. barreiras fisiológicas: incluem fatores aos quais diversos patógenos não sobrevivem, como temperatura, pH e mediadores químicos (ácidos e enzimas);
3. barreiras fagocíticas e/ou endocíticas: células (células dendríticas, mastócitos, monócitos, macrófagos e neutrófilos) que tem a capacidade de ingerir qualquer material particulado (fagocitose/endocitose) que consegue vencer os dois primeiros tipos de barreiras;
4. barreiras inflamatórias: quando agente causa dano ao tecido, gera-se uma resposta inflamatória (vasodilatação, edema, e perda de função). Todas essas barreiras, respondem da mesma maneira independentes do antígeno e essas respostas são consideradas imediatas (ABBAS et al., 2008; GOLDSBY et al., 2002).

A imunidade adquirida (específica) está presente somente em vertebrados e possui como marcos ser dependente da estimulação antigênica e necessitar de microambiente específico gerado por substâncias mediadoras. Atua através de dois mecanismos distintos, que ocorrem simultaneamente e são dependentes entre si: o primeiro é a resposta celular, onde os

linfócitos T (citotóxicos e auxiliares) agem diretamente sobre o antígeno com a função principal de amplificar a resposta imunológica. O segundo é a resposta humoral, na qual ocorre produção de anticorpos específicos contra o antígeno (eliminação ou neutralização) pelos plasmócitos derivados de linfócitos B e produção de células de memória imunológica (Figura 1) (BURMESTER e PEZZUTTO, 2003; PARKIN e COHEN, 2001).

Figura 1: BURMESTER e PEZZUTO, 2003. Representação das imunidades inata e adaptativa, focando especificidade e tempo de resposta.

Para desenvolver uma resposta imune apropriada é recrutada uma grande diversidade celular tendo cada uma sua responsabilidade dentro da organização. As células são: basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas, células *natural killers* (NK), linfócitos T e linfócitos B. Algumas dessas células são diferenciáveis em microscopia com colorações determinadas, mas o método visual deixa lacunas para interpretações errôneas (BURMESTER e PEZZUTTO, 2003). Todas essas células possuem vários antígenos de membrana, isto é, moléculas expressas na bicamada lipídica que atingem o exterior celular e possuem as mais diversas funções como receptores e ligantes. É através dessas moléculas de superfície que as células interagem entre si determinando uma resposta imune. Além disso, a expressão destas moléculas pode ser regulada de acordo com a necessidade da célula em questão. Para uniformizar a nomenclatura de tais moléculas, na década de 1980, a Organização Mundial de Saúde, através dos Workshops de Diferenciação dos Antígenos Leucocitários criou a designação de “clusters of differentiation” (CD), seguida de um algarismo arábico, permitindo distinguir as moléculas, padronizando mundialmente tais marcadores de superfície, utilizados para diferenciar as células e seus estágios de desenvolvimento através de diversas técnicas. Até o último workshop que ocorreu em 2008,

foram catalogados 339 CD's humanos, sendo que apenas 6 deles são exclusivos da linhagem de linfócitos B maduros (ZOLA e al 2007).

Como descrito, os linfócitos B são os principais mediadores da imunidade humoral. Nesta resposta ocorre interação do linfócito B com o antígeno, proliferação (expansão clonal), diferenciação em células plasmáticas secretoras de anticorpos e em células de memória.

As moléculas efetoras da resposta humoral são as imunoglobulinas – Igs (anticorpos) que possuem estrutura básica de quatro cadeias peptídicas, sendo duas cadeias idênticas denominadas de cadeias leves (L) por apresentarem cerca de 25kDa cada e duas cadeias também idênticas (H) (50-75kDa cada) designadas de cadeias pesadas. Cada cadeia L está ligada a uma cadeia H principalmente por pontes dissulfídicas. As porções aminoterminais de todas as cadeias possuem seqüências de aminoácidos com alta variabilidade, determinadas como regiões V. Esta variabilidade peptídica é explicada pela presença das regiões determinantes de complementaridade (CDRs), onde poderá ocorrer ligações em 3 sítios com o antígeno em cada cadeia (regiões hipervariáveis – HV). As regiões abaixo das porções V apresentam cadeias polipeptídicas com menores variações, chamadas de regiões constantes (C). As cadeias pesadas, em suas regiões C, possuem moléculas de glicosilação, medida que afeta diretamente a solubilidade da molécula. As porções constantes das cadeias leves podem ser do tipo kappa (κ) ou lambda (λ), e as porções constantes das cadeias pesadas podem ser do tipo alpha (α), gamma (γ), delta (δ), épsilon (ϵ), e mi (μ) (Figura 2) (FLAJNIK e KASAHARA, 2010; GOLDSBY et al., 2002).

Figura 2: GOLDSBY et al., 2002 (modificado). Representação estrutural da imunoglobulina. L representando cadeia leve, H: cadeia pesada, V: região variável, C: região constante, S-S: pontes dissulfídicas, NH₃⁺: porção aminoterminal, COO⁻: porção carboxiterminal, Fab: fragmento de ligação do antígeno, Fc: fragmento cristalizável.

Os anticorpos possuem os quatros tipos de organização protéica no espaço: estrutura primária feita pelas simples cadeias de aminoácidos, a secundária estruturada pela formação das dobras das cadeias polipeptídicas sobre ela mesma (formação das folhas β -pregueadas antiparalelas), terciária que também compreende dobras que compactam as folhas β -pregueadas em domínios globulares, e finalmente a quaternária abrangendo a interação de várias estruturas terciárias, formando então a proteína final. Essa formação é essencial para facilitar interações entre ligações mais fracas como àquelas não-covalentes, além de prover a ligação entre cadeia leve e pesada corretamente (V_H/V_L, C_H1/C_L, C_H2/C_H2, C_H3/C_H3, C_H4/C_H4) (MURPHY et al., 2008; ABBAS et al., 2008).

As porções constantes possuem até 4 domínios distintos. Os domínios C_H1/C_L tem como função principal aumentar a porção Fab de modo que sua “flexibilidade” (rotação e abertura) é aumentada facilitando a ligação com o antígeno. Entre os domínios C_H1 e C_H2, alguns tipos de cadeias pesadas (γ , δ , α), possuem uma região de dobradiça (flexível) rica em resíduos de prolina que auxiliam a flexibilidade dos braços Fab. Os domínios C_H2 (γ , δ , α) e C_H3 (μ e ϵ) possuem função mais explícita de ativação do sistema complemento pela IgG e IgA. Os domínios C_H3 (γ , δ , α) e C_H4 (μ e ϵ) fazem parte das porções finais carboxiterminais, cujos tamanhos podem determinar se a imunoglobulina será secretada ou ligada à membrana.

Todos os domínios permitem maior variação genética das CDR's, além de , direcionar a função principal destas, determinam a classe da imunoglobulina (MURPHY et al., 2008; ABBAS et al., 2008).

As principais funções das imunoglobulinas consistem em neutralizar antígenos específicos, opsonizar antígeno favorecendo fagocitose por células com receptores de porções Fc, ativarem o sistema complemento que promoverá lise da membrana celular infectada e gerará o subproduto C3b (que amplifica a ligação antígeno-anticorpo-receptor), fazer parte do processo de citotoxicidade mediado por células dependentes de anticorpos e servir como receptor de membrana de linfócitos B (GOLDSBY et al., 2002; WANG et al., 2007; MARTIN e CHAN, 2006).

Cada classe de anticorpos possui maior especificidade para determinadas funções. A cadeia tipo γ determina a imunoglobulina G (IgG), com 150kDa é a mais abundante no soro. Algumas diferenças constantes, como número e organização das pontes dissulfídicas, levam a subclasses dessa imunoglobulina, sendo em humanos: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄; e murinas: IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃. Algumas das IgG protegem fetos já que algumas conseguem atravessar a placenta materna, ativam o complemento e facilitam a opsonização. A cadeia tipo μ origina a IgM, que pode existir em dois formatos: monômeros de 180kDa (imunoglobulinas de membrana) ou pentâmeros de 900kDa (imunoglobulinas secretadas). Cada pentâmero possui uma cadeia J que, supõe-se, ser essencial para a polimerização dos monômeros. É o segundo tipo mais expresso, além de ser mais eficaz já que possui 10 sítios de reconhecimento de antígenos (5 vezes mais que a IgG), sendo portanto evocada na primeira resposta imune. A cadeia tipo α origina a IgA, também expressa em dois formatos: dímeros ou tetrâmeros. Tem por característica ser a imunoglobulina dominante em secreções. A cadeia tipo ϵ determina a IgE, que está diretamente relacionada com as reações de hipersensibilidade imediata, portanto está presente em baixas concentrações no soro normal. Por último, a cadeia tipo δ origina a IgD, que está presente na membrana de linfócitos B durante sua maturação e participa da ativação das células B (Figura 3) (GOLDSBY et al., 2002; ABBAS et al., 2008).

Figura 3: GOLDSBY et al., 2002. Estruturas gerais das cinco classes de anticorpos secretados – Fab é a porção onde o antígeno se liga e Fc é a porção que fica livre. Cadeias leves são representadas em rosa, cadeias pesadas em azul, laranja, verde, roxo e amarelo. IgA, IgG e IgD possuem região flexível entre porções Fab e Fc. IgA e IgM possuem ponte de ligação: cadeia J. Linhas pretas representam pontes dissulfídicas.

Embora existam várias classes de anticorpos, a estruturação deles é comum e depende da expressão dos genes corretos em momentos determinados da maturação dos linfócitos B. O modelo genético atual compatível com a estruturação das imunoglobulinas corresponde às três premissas fundamentais:

1. Abranger a imensa diversidade de especificidade dos anticorpos.
2. Respeitar a composição de cadeias leves com cadeias pesadas.
3. Admitir que várias classes possam apresentar a mesma especificidade para o antígeno em questão (GOLDSBY et al., 2002).

Os genes da cadeia κ estão presentes no cromossomo humano 2 e murino no 6, já os da cadeia λ , em humanos estão no cromossomo 22 e em murinos no 16. Por fim, os genes que codificam as cadeias pesadas estão presentes no cromossomo humano 14 e no murino de

número 12. Em ambas as espécies, as cadeias leves possuem segmentos genéticos codificantes (éxons) denominados V, J e C, sendo que o rearranjo dos dois primeiros gera as porções variáveis (VJ) e o último é responsável pela região constante dessas cadeias. Já as cadeias pesadas, possuem regiões codificantes determinadas de V,D,J e C, sendo que os rearranjos variáveis são dados pela combinação VDJ enquanto as porções constantes pela região C (BURMESTER e PEZZUTTO, 2003).

Em humanos, o cromossomo 22 possui 30 segmentos gênicos para codificação de V_λ , e 4 segmentos tanto para a codificação J_λ quanto C_λ . O cromossomo 2 contém 40 porções codificantes da região V_κ , 5 para a região J_κ e apenas um para a C_κ . Por fim, os genes codificantes das cadeias pesadas apresentam 40 segmentos gênicos das porções V_H , 25 das porções D_H , 6 da J_H e inúmeros segmentos das C_H , sendo que esses são em ordem 5' para 3': C_μ , C_δ , $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 1}$, $C_{\alpha 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 4}$, C_ϵ , $C_{\alpha 2}$ (Figura 4) (MURPHY et al., 2008).

Figura 4: MURPHY et al., 2008. Organização das seqüências gênicas dos cromossomos humanos 14, 2 e 22. V, D, J: segmentos gênicos codificantes de regiões variáveis, C: segmentos gênicos codificantes de regiões constantes, λ: cadeia leve tipo lambda, κ: cadeia leve tipo kappa, H: cadeia pesada.

Basicamente, ocorre rearranjo gênico das seqüências VDJ das cadeias pesadas, ocorrendo os seguintes processos: (1) junção de uma região J_H com uma D_H ; (2) junção $J_H D_H$ com uma porção V_H e seu peptídeo sinalizador L seguido por todas as cadeias C_H ; (3) transcrição do DNA em RNA primário com todos os íntros e éxons de interesse; (4) remoção dos íntros, *splicing* e poliadenilação da cauda do RNA mensageiro; (5) tradução fora do núcleo celular em polipeptídeos; e por fim (6) clivagem do peptídeo sinalizador L (JUNG, et al. 2006). O arranjo das cadeias leves é quase idêntico ao arranjo das cadeias pesadas em humanos, com as seguintes diferenças: (1) não há região D, portanto ocorre junção V_L com J_L ; (2) $V_L J_L$ posiciona-se próximo a cadeia C_L , formando o composto $V_L J_L C_L$ precedido pelo peptídeo sinalizador L; (3) transcrição de todos os éxons e íntros necessários para o RNA

primário; (4) remoção dos íntros, splicing e poliadenilação da cauda do RNA mensageiro; (5) tradução fora do núcleo celular em polipeptídeos; e por fim (6) clivagem do peptídeo sinalizador L (Figura 5) (MURPHY et al., 2008; GOLDSBY et al., 2002).

Figura 5: MURPHY et al., 2008. Rearranjo genético para construção das cadeias leve e pesada das imunoglobulinas.

Embora existam várias regiões codificantes para as porções VJ (ou VJD), que são responsáveis pela variabilidade de especificidade dos anticorpos, a simples combinação dessas não supriria a diversidade protéica existente. Portanto, mecanismos de rearranjos moleculares são propostos até hoje. Os mais conhecidos são:

1. Presença de seqüências dos sinais de recombinação (RSSs) que rodeiam cada segmento V, J e D e funcionam como sinalizadores de recombinação genética, permitindo que porções V se juntem somente a porções J e D, nunca ocorrendo rearranjo V/V, J/J ou D/D.
2. Presença de enzimas do grupo recombinase V(D)J: RAG-1, RAG-2 e transferase desoxinucleotidil terminal (TdT) que possuem as mais diversas funções:
 - a. reconhecimento das RSSs e junção das porções sinalizadas pelas RSSs;
 - b. clivagem da fita de DNA;

- c. formação dos grampos durante os splicing, podendo originar splicing alternativos;
 - d. adição opcional de quantidades incertas de nucleotídeos nas regiões P (adição de sequência palindrômica) e N (nucleotídeos introduzidos durante exclusão dos íntros para junção dos éxons).
3. Exclusão alélica garantindo que apenas um alelo do gene será produtivo.
 4. Hipermutação somática: mutações aleatórias (inserções, deleções e a mais comum: substituições pontuais) nas regiões HV, mas direcionadas às CDRs que não encontraram complementaridade com os epítomos (MAIZELS, 2005; TENG e PAPAVALIOU, 2007; JUNG et al., 2006).

Todos esses arranjos mudam a leitura de fase dos RNA mensageiros, o que pode resultar em rearranjos: não produtivos ou produtivos. Rearranjos não produtivos são formados quando não é possível manter a integridade física do componente formado, já que inúmeros códons de parada interrompem a tradução. Já os produtivos ocorrem quando a integridade física do componente formado é mantida, mesmo com alta variabilidade de composição peptídica. Caso produtiva, as células precursoras saem da medula óssea para o organismo. Caso não produtivos, recebem sinalização que induz a apoptose precoce (MAIZELS, 2005; TENG e PAPAVALIOU, 2007).

Além disso, a combinação quaternária das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas ao final do processo de montagem também contribui efetivamente para a ampla diversidade resultante (GOLDSBY et al., 2002).

O modelo genético atual, ainda permite explicar mais dois fatos relevantes: troca de classe expressa e expressão de imunoglobulinas de membrana e de superfície. Lembrando que em ambos os casos a porção hipervariável (HV) se mantém constante, especialmente as regiões CDRs (ABBAS et al., 2008).

A troca de classe, determinada pela mudança das regiões constantes codificada ocorre devido a segmentos gênicos denominados regiões de troca (S) localizadas anteriormente as regiões constantes. Essas regiões conseguem se unir quando ativadas formando uma grande alça que contém os genes a serem excluídos. As enzimas recombinases então clivam esta alça e unem as pontas de modo que somente a região constante da classe requerida fique no gene, sendo então transcrita num RNA mensageiro e traduzida em polipeptídios (MAIZELS, 2005; GOLDSBY et al., 2002).

Já no processo de diferenciação entre imunoglobulinas de membrana e secretadas, a peculiaridade está no tamanho da porção carboxiterminal produzida. A forma secretada

não necessita de aminoácidos de ancoragem e, portanto possui cerca de 20 aminoácidos na porção final da imunoglobulina, codificado pela região S (sítios de poli-A) da última porção gênica C. Já a forma ligada a membrana citoplasmática, possui o dobro de aminoácidos na mesma porção, sendo eles divididos em três funções: segmento hidrofílico, que fica externo a célula (codificado pelo mesmo segmento S), segmento transmembrana hidrofóbico (éxon M1) e segmento citoplasmático curto (éxon M2). Dependendo do local da clivagem do transcrito primário de RNA pode-se obter anticorpos secretados ou ligados a membrana (Figura 6) (MAIZELS, 2005; GOLDSBY et al., 2002).

Figura 6: GOLDSBY et al., 2002. Esquema da produção de imunoglobulinas ligadas a membrana e secretadas.

A síntese das cadeias leves e pesadas das Igs ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER) e quando prontas, passam pelo lúmen do RER e atingem as cisternas, onde

ocorre a montagem das imunoglobulinas. Então, atingem o complexo de Golgi, são envoltas por vesículas e transportadas até a membrana. A vesícula se funde à membrana e caso a imunoglobulina não possua ancoragem necessária ela é secretada. Se contrário, ela se adapta e ancora na membrana citoplasmática servindo de receptor (GOLDSBY et al., 2002).

Os genes dos linfócitos B possuem informação para codificar as imunoglobulinas, e proteínas que possuem homologia a certos domínios existentes nas Igs, com ações efectoras das mais distintas. Essas proteínas fazem parte do grupo da Superfamília das Imunoglobulinas (Figura 7) (ARICESCU e JONES, 2007; ABBAS et al., 2008).

Figura 7: GOLDSBY et al. 2002. Elementos que compõe a superfamília das imunoglobulinas.

Algumas moléculas da Superfamília são consideradas marcadores de maturação dos linfócitos B, função também exercida por outras proteínas que não pertencem a família descrita (Figura 8) (BURMESTER e PEZZUTTO, 2003).

Figura 8: BURMESTER e PAZZUTTO, 2003. Moléculas de superfície dos linfócitos B marcadores de maturação celular.

Os linfócitos B são gerados, após o nascimento, exclusivamente na medula óssea. Isso porque somente as células estromais da medula proporcionam o microambiente ideal para a diferenciação das células tronco através da expressão de moléculas de superfície aderente e liberação de citocinas como a interleucina-7 (IL-7). Essas, então, originam células tronco linfóides que dão origem a linhagem mais precoce: as células B progenitoras (células pró-B) que se multiplicam intensamente preenchendo inúmeros espaços da medula óssea até se diferenciarem em células B precursoras (células pré-B). Para essa diferenciação, é necessário primariamente um estímulo proveniente das células estromais. O ligante VLA-4 das células estromais se conecta ao ligante VCAM-1 das células pró-B e em seguida, a molécula de superfície c-Kit liga-se ao fator de célula-tronco (SCF) que promove a multiplicação e diferenciação da pró-B em pré-B. As pré-B recém formadas expressam em sua superfície receptores de IL-7, que após se ligar na molécula específica, regula negativamente a expressão das moléculas de aderência (VCAM-1) o que faz com que as células estromais se desliguem das células pré-B (Figura 9) (MURPHY et al., 2008; PARKIN e COHEN, 2001).

Figura 9: MURPHY et al., 2008. Desenvolvimento das células B na medula óssea.

O determinante na troca de fases é o rearranjo genético. As células pró-B iniciam o arranjo de cadeia pesada variável VDJ, e a célula só se torna pré-B quando um arranjo VDJ produtivo for alcançado. Nesta fase também ocorre tradução da cadeia pesada tipo μ tipo monômero para ligação na membrana citoplasmática. Com a região variável da cadeia pesada (pré-B) a célula passa a organizar a região variável das cadeias leves, que através da exclusão alélica garante que somente um tipo (κ ou λ) seja produzido com sucesso. Neste momento, a célula pré-B se torna célula B imatura com a expressão marcante do receptor de célula B, essencial para a continuação da maturação (MURPHY et al., 2008; HARWOOD e BATISTA, 2010).

A célula tipo pró-B apresenta inserida em sua membrana, heterodímeros Ig- α /Ig- β (moléculas que fazem parte da Superfamília das Imunoglobulinas). Durante o estágio pré-B ocorre inserção das cadeias pesadas da IgM ($V_H D_H J_H C_\mu$) na membrana entre dois pares de heterodímeros. Neste estágio ainda não há produção das cadeias leves, portanto há cadeia leves substitutas, que consistem em duas porções: pré-B V na região variável e $\lambda 5$ na região constante, montando o receptor de célula pré-B. É o sinal inferido por este receptor que estimula a exclusão alélica para dar continuidade a maturação. Antes, essas células pré-B passam por inúmeras divisões cada uma com rearranjos das cadeias variáveis, a fim de gerar maior diversidade no repertório de anticorpos. Uma vez concluído o rearranjo das cadeias leves, então essas tomam os lugares das cadeias leves substitutas completando o receptor de célula B (BCR – CD79a e CD79b) (Figura 10) (HARWOOD e BATISTA, 2010; MARTENSSON et al., 2007).

Figura 10: GOLDSBY et al., 2002. Arranjo do receptor de célula B (BCR).

Antes de deixar a medula óssea, as células B imaturas ainda passam por um processo de seleção negativa, isto é, quando uma célula apresenta um BCR com especificidade por um antígeno próprio (auto-anticorpo) ela não deve circular no organismo, pois será ativada erroneamente podendo levar a uma resposta imune incorreta. Para prevenir tal dano, é feita uma pré-seleção com os diversos complexos antigênicos existentes na medula. As células reacionais podem ter dois destinos: eliminação clonal, onde é induzida morte celular por apoptose ou resgate através do rearranjo dos genes de cadeia leve. Neste resgate, a maturação é interrompida, e as enzimas RAG-1 e RAG-2 são reativadas enquanto a célula B imatura deve reprogramar a região variável nas cadeias leves. Após isso, inicia-se novamente a seleção negativa (YOUINOU, 2007; ROLINK, 2001).

Após a seleção, as células B imaturas desenvolvem em sua superfície, monômeros de IgM e de IgD com mesma especificidade, resultando então numa célula B madura.

A célula B madura sai da medula óssea e começa a circular no organismo em busca de seu antígeno complementar. Caso isso não ocorra, as células B virgens entram em apoptose em pouco tempo (semanas). Uma vez circulante na periferia do organismo, entrarão em contato com os mais diversos antígenos possíveis. Caso um receptor celular localize alguma complementaridade com o antígeno, dá-se início a resposta imune efetiva (ABBAS et al., 2008).

Existem dois tipos de antígenos: (1) os dependentes de timo (células T auxiliares) e os (2) independentes de timo. No primeiro caso, é necessário contato direto entre os linfócitos B e as células T auxiliares. No segundo caso, este contato não é necessário, mas podem precisar do microambiente criado pelas citocinas liberadas pelos linfócitos T. A

estimulação independente do timo pode levar a duas sinalizações distintas: sinalização policlonal, isto é, ativação de mitoses mesmo de células B inespecíficas, sendo ela maduras ou imaturas ou ativação via ligações cruzadas com o BCR, que desencadeiam uma resposta direcionada não mitógena e que somente acomete células B maduras (GOLDSBY et al., 2002).

Como explicado anteriormente, as imunoglobulinas IgM de superfície possuem pequenos domínios citoplasmáticos e portanto estão sempre inseridas nas membranas ao meio de heterodímeros Ig- α /Ig- β . A Ig- α possui uma cauda citoplasmática com 61 aminoácidos e a Ig- β possui 48 aminoácidos. Quando ocorre uma ligação cruzada dos antígenos com duas moléculas de IgM de superfície, as moléculas laterais são responsáveis pela transdução do sinal para o interior celular, já que a porção carboxiterminal da IgM é incapaz de fazê-lo devido ao curto tamanho. A sinalização intracelular é iniciada por tirosinas quinases que são recrutadas pelas longas caudas dos heterodímeros, e se estende por inúmeras outras vias, formando cascatas de ativação, que levam a alteração da expressão gênica (HARWOOD e BATISTA, 2010; YOUINOU, 2007).

Outro modo de estímulo dessas cascatas compreende ao uso de complexo co-receptor de célula B. Este é formado por três partes: CD19, CD21 e CD81. O CD21 é um receptor do componente C3b do complemento. Quando um antígeno se liga a IgM do BCR atrai o C3b, que se liga no CD21. O CD19 é estimulado a interagir com os heterodímeros do complexo BCR, já que tem longa terminação intracelular, que recruta inúmeras tirosinas quinases para o complexo. Esse mecanismo é o mais conhecido para amplificar o sinal de ativação (Figura 11) (ABBAS et al., 2008).

Figura 11: GOLDSBY et al., 2002. Complexo co-receptor e BCR para amplificação do sinal de ativação.

A ligação do antígeno com a IgM do BCR também pode estimular a internalização do complexo antígeno-anticorpo. Após processado internamente, os epítomos são apresentados via moléculas de histocompatibilidade de classe II junto ao ligante B7 co-estimulatório às células T auxiliares. Os linfócitos B passam a ser células apresentadoras de antígeno (APC) etapa importante na resposta imune já que necessitam de baixíssimos níveis antigênicos para apresentarem tais epítomos, ao contrário das outras APCs. Quando as células T auxiliares interagem com as células B formam um complexo que estimula a liberação de citocinas direcionadas aos linfócitos B. Neste complexo, o CD40 da célula B interage com o ligante específico presente na membrana das outras células (CD40L), o que também ativa a cascata de fosforilação interna que regula a expressão gênica e aumenta a expressão de receptores de interleucinas, essenciais para o progresso da resposta (PARKIN e COHEN, 2001).

Esses processos de ativação dos linfócitos B ocorrem na região paracórtex dos linfonodos. Uma vez ativados, migram para o córtex e iniciam pequenos focos de proliferação. Depois de atingirem seu tamanho máximo, células B e T auxiliares migram para os folículos primários e posteriormente, para os secundários. Esses locais são essenciais para o desenvolvimento do linfócito B já que provêm um microambiente regulado. No centro dos folículos secundários, o complexo T-B estimula a formação dos centros germinativos (é essencial a ligação CD40/CD40L). Nestes centros, os linfócitos B passam por extensas proliferações e passam a ser chamados de centroblastos. Estes migram para a borda do centro

germinativo formando o que se chama de zona escura devido à alta compactação celular. Os centroblastos não apresentam imunoglobulinas de superfície. Após cessarem as divisões, as Igs de superfície retornam e então as células passam a ser chamadas de centrócitos. Eles se movem em direção a uma região com células dendríticas foliculares (zona clara). As células dendríticas foliculares apresentam grande superfície contendo inúmeros epítomos do antígeno. Os centrócitos que se ligam a esses epítomos ganham um sinal de sobrevivência e estímulo para diferenciação em células plasmáticas e células de memória. Os plasmoblastos migram para a medula do linfonodo onde se diferenciam em plasmócitos e secretam os anticorpos específicos. Os centrócitos que forem incapazes de se ligar nas células dendríticas foliculares morrem por apoptose no próprio centro germinativo (Figura 12) (HARWOOD e BATISTA, 2010; KLEIN e DALLA-FAVERA, 2008).

Figura 12: GOLDSBY et al., 2002 Resumo da maturação dos linfócitos B até células plasmáticas e células de memória.

O centro germinal é essencial, pois é nele que ocorrem os seguintes fatos:

1. Maturação de afinidade: aumento da especificidade do anticorpo através de rearranjos genéticos e hipermutação somática conforme as células multiplicam-se;

2. Mudança de classe da imunoglobulina secretada para aumento da função biológica efetora mantendo a região variável já codificada;

3. Geração das células secretoras de anticorpos e das células B de memória, induzidas graças às citocinas específicas do microambiente (KLEIN e DALLA-FAVERA, 2008).

Como visto por essa breve descrição, a regulação da maturação dos linfócitos B é extremamente complexa e dependente de vários outros fatores externos. Como é de se esperar, todo o sistema imune, deve ser estritamente controlado, já que sua resposta depende diretamente de hipervariação genética. Quaisquer desregulações podem levar a perda do balanço fino deste sistema, gerando inúmeras patologias, como linfomas e leucemias.

Essas patologias têm por característica básica apresentar inúmeras mutações genéticas em diversos genes e cromossomos, o que leva a fenótipos celulares anormais. Moléculas de superfície podem sofrer variações quantitativas ou qualitativas, lembrado que estas são essenciais para determinação de população e estágio celular. As variações quantitativas se devem ao fato da função celular estar aumentada ou diminuída, podendo formar complexos repetidos de moléculas. As variações qualitativas podem ser de dois tipos: (1) estrutura anormal das moléculas que acabam perdendo ou ganhando novas funções ou (2) perda da capacidade de interromper as cascatas intracelulares se necessário, o que leva a aberração no formato molecular que passa a ser hiper fosforilado ou glicosilado. Isso é essencial para que a célula anormal sobreviva num contexto para o qual ela não está programada (GOLDSBY et al., 2002; LEBIEN e TEDDER, 2008).

Tanto os antígenos de superfície normais quanto os anormais foram descobertos graças ao advento dos anticorpos monoclonais. Os anticorpos produzidos numa resposta imune não são ideais para serem utilizados como ferramenta de investigação já que são anticorpos policlonais. Estes anticorpos são uma mistura homogênea, provenientes de inúmeros clones de linfócitos B, cada qual com sua especificidade para determinado epítopo do antígeno. Anticorpos monoclonais somente são produzidos no sistema imune em determinadas patologias, portanto não sendo indicados para uso em pesquisa e/ou diagnóstico (MCCULLOUGH e SPIER, 1990; RASMUSSEN et al., 2007).

Os anticorpos monoclonais são de extrema importância na área médica, sendo considerada a segunda grande inovação da indústria biotecnológica, perdendo, atualmente, apenas para as proteínas recombinantes. Embora esse mercado cresça no setor industrial privado aproximadamente 37% ao ano (quantia que em 2008 foi equivalente (em investimentos e lucros) a US\$ 16 bilhões), essa tecnologia, surgiu em 1975 nos setores de

pesquisa pública e privada com os pesquisadores Jerne, Milstein e Köhler (ganhadores do Premio Nobel de Fisiologia em 1984) (BARADARAN et al., 2005; REICHERT e PAVLOU, 2004).

O método de produção de anticorpos monoclonais desenvolvido por Köhler e aperfeiçoado por Milstein consiste em várias etapas que devem ser extremamente controladas quanto aos possíveis fatores de influência externa (tempo, pH, temperatura, entre outros).

Resumidamente, inicia-se com a imunização do animal escolhido com o antígeno em questão. Após a estimulação do animal para produção de linfócitos B (células com vida útil limitada e que possuem a enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase - HGPRT+), é feita a retirada do baço e coleta das células B do órgão. Os linfócitos são então fusionados com células de mieloma (células com crescimento indefinido e que não possuem a HGPRT). As células são colocadas em meio HAT (meio com hipoxantina, aminopterina e timidina) e somente as células fusionadas – hibridomas (linfócitos B e mieloma) irão sobreviver. Isso depende da característica da célula em poder sintetizar nucleotídeos por duas vias. A primeira via a produção de DNA e RNA depende de ácido fólico, mas no meio de cultura existe apenas aminopterina, que embora tenha estrutura análoga ao ácido fólico, bloqueia esta via ao ser incorporada, isso faz com que a célula utilize a segunda via (via de salvamento). Nela, ocorre utilização da timina e da hipoxantina para síntese de DNA e RNA. Mas para esses dois componentes serem utilizados, é necessário que a célula produza duas enzimas: a HGPRT e timidina quinase (TK). Portanto, os hibridomas (HGPRT+, secretores de Ig, de crescimento irrestrito) e os linfócitos B não fusionados (HGPRT+) sobrevivem em meio HAT, e as células de mieloma não fusionadas (HGPRT-) morrem. Os linfócitos B, embora HGPRT+ têm vida útil muito curta, o que faz com que esse tipo de célula não sobreviva muito tempo durante o cultivo celular, restando apenas os hibridomas (linfócitos B *versus* mieloma). Por diluição, faz-se com que um único clone seja cultivado por cultura, dando início a um cultivo homogêneo com a mesma secreção de Ig (Figura 13). Após cultura celular em laboratório, testa-se o sobrenadante para verificar a especificidade da Ig secretada, geralmente por teste ELISA indireta (ensaio imunoadsorvente ligado à enzima) ou por citometria de fluxo (KÖHLER e MILSTEIN, 1975).

Figura 13: ABBAS et al., 2008. Esquema da produção de anticorpo monoclonal.

As fases da produção de um anticorpo monoclonal resumem-se a: (1) produção, (2) *screening*, (3) expansão e concentração do anticorpo, (4) identificação de especificidade, (5) purificação com comprovação da monoclonalidade, (6) validação com material de indivíduos

normais e com neoplasias hematológicas, (7) comparação de eficiência com reagente comercial.

Tendo em vista a importância de anticorpos monoclonais para uso em técnicas de citometria de fluxo, imuno-histoquímica, ELISA e *Western Blotting*, e o impacto econômico que pode gerar para Ministério da Saúde, já que este gasta milhões de reais importando esses reagentes para uso no Sistema Único de Saúde, o Laboratório de Engenharia Celular da Seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu, se viu na necessidade de tornar esses imunoensaios mais econômicos, investindo em protocolos de obtenção de anticorpos monoclonais murinos anti-linfócitos B humanos.

Este protocolo foi denominado Protocolo LINB. Nele, camundongos de linhagem isogênica BALB/c, fêmeas, com idade entre 6-8 semanas, foram inoculadas com células mononucleares de sangue periférico (PBMC) provenientes de paciente portador de leucemia linfóide crônica de células B, estocadas no banco de células do mesmo Laboratório de Engenharia Celular. O *screening* foi realizado pela técnica de citometria de fluxo, selecionando clones secretores que apresentavam perfil de reconhecimento anti-linfócito B humanos (total de 11 clones). Nesta primeira parte, desenvolveu-se o trabalho até etapa 3 de expansão e concentração do anticorpo.

As etapas subsequentes de (3) a (7) estão sendo propostas neste trabalho que visa a caracterização e validação dos reagentes produzidos em laboratório, comparando-os com reagentes comerciais utilizados na rotina de fenotipagem de pacientes portadores de linfomas, estabelecendo a relação entre a eficácia e custo.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

✓ Caracterização e validação de anticorpos monoclonais murinos (AcMm) anti-linfócitos B humanos provenientes do protocolo LINB estocados no Laboratório de Engenharia Celular – Divisão Hemocentro – Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP para uso em técnicas de citometria de fluxo e imunoquímica.

2.2 Objetivos secundários

- ✓ Purificação dos anticorpos monoclonais e comprovação da monoclonalidade;
- ✓ Identificação da especificidade por *Western Blotting*;
- ✓ Produção de extrato de membrana de linfócitos B;
- ✓ Validação dos AcMm em indivíduos normais e com neoplasias hematológicas;
- ✓ Comparação de eficiência frente a reagentes comerciais.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Levantamento e escolha dos anticorpos utilizados

Através dos arquivos de protocolos do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, escolheu-se para análise, dos 20 anticorpos do protocolo LINB, produzidos pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, aqueles que apresentaram perfil unicamente contra linfócitos B humanos descrito por GOLIM et al., em 2008, totalizando 11 anticorpos distintos.

3.2 Determinação de classe e sub-classe pelo método CBA

A determinação foi realizada pelo método de citometria de fluxo utilizando equipamento FACSCALIBUR™ BD com auxílio do software Cell Quest™ BD, sendo posteriormente analisado no software FCAP Array™ BD, específico para análises da plataforma CBA.

O método de CBA (*Cytometric Bead Array*) consiste em sete populações de micro partículas de polimetilmetilato (*beads*), com intensidades de fluorescências diferentes, recobertas com anticorpos monoclonais contra as cadeias pesadas das seguintes proteínas murinas: IgA, IgE, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ e IgM. As intensidades de fluorescência emitidas estão na faixa 670nm, lidas no display de FL3.

Os sobrenadantes de cultura são incubados com as *beads* e posteriormente, reveladas com dois anticorpos secundários marcados com fluorocromos diferentes: anticorpo contra cadeia *kappa* do camundongo conjugado com PE (ficoeritrina) e anticorpo contra cadeia *lambda* do camundongo conjugado com FITC (isoticianato de fluoresceína).

3.3 Purificação de imunoglobulinas por cromatografia

3.3.1 Purificação de IgG por imunoafinidade à Proteína-A Sepharose

A proteína A advém de cepas de *Staphylococcus aureus* e possui 42 kDa. É constituída por seis domínios, dos quais cinco possuem alta afinidade pela porção Fc da IgG,

sendo que cada molécula de proteína A se liga ao menos a duas imunoglobulinas. A ligação e eluição da IgG à coluna deve ser realizada por meio de gradiente de pH. A ligação ocorre em pH neutro (aproximadamente 7,0), e a eluição das imunoglobulinas de interesse ocorre em pH mais ácidos: pH 6,0 ocorre eluição da IgG₁, pH 5,0 ocorre eluição da IgG_{2a}, pH 4,0 ocorre eluição da IgG_{2b} e IgG₃.

O sistema semi-automatizado AKTA-PrimeTM da GE e a coluna rHi-Trap Protein-ATM da GE foram utilizadas na purificação. A coluna foi utilizada segundo especificações do fabricante. Aproximadamente, 98% do volume de líquido ascítico armazenado nos freezers - 80°C foi submetido a este procedimento.

3.3.2 Purificação de IgM por imunoafinidade à 2-mercaptopiridina

Nessas colunas, existe um meio de afinidade tiofílica com 2-mercaptopiridina conjugado a Sepharose. Na purificação ocorre adsorção tiofílica promovida por sais. Sugere-se que as interações entre moléculas e proteína resultam ou de uma combinação entre doação de elétrons da molécula e recepção pela proteína ou de uma interação hidrofílica – hidrofóbica. Em ambos os casos essas interações são promovidas por eletrocondutividade.

Foi utilizada a HiTrap IgM PurificationTM de 1mL segundo especificações do fabricante para purificação de imunoglobulinas tipo IgM, na qual, aproximadamente, 98% do volume de líquido ascítico armazenado nos freezers -80°C foi submetido a este procedimento. Também se utilizou o sistema semi-automatizado AKTA-PrimeTM da GE.

3.4 Dosagem de concentração de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais da ascite, do purificado e do sobrenadante de cultura foi realizada por espectrofotometria com microdosagens, no sistema NanoDrop2000TM da ThermoSciences .

3.5 Concentração de proteínas

Para concentração de proteínas, testaram-se dois métodos.

3.5.1 Diálise Protéica

Este protocolo utilizou sacos de diálise de 33mm x 21mm da Inlab®. A solução contendo os anticorpos foi colocada dentro dessas bolsas, e esta dentro de uma solução hipotônica (PBS tamponado) em geladeira sob agitação constante por no mínimo 18 horas. Ao fim do período, o concentrado dentro dos sacos foi novamente retido para análise.

3.5.2 Membrana de celulose

O sistema utilizado foi o Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units with Ultracel-100 membrane™ da Millipore. Essa unidade possui uma membrana de celulose regenerável, com área ativa de 3cm² e poros de 100 kDa. Esta unidade vertical permite concentração de 80-100 vezes e diminuição da concentração polarizada.

Utilizou-se tubos com capacidade de 4mL. A amostra foi colocada na unidade filtrante, e este conjunto no tubo cônico de 15mL. Em centrífuga com rotor móvel, centrifugou-se por 7 minutos a 4000g a 15°C. O concentrado localizou-se na unidade filtrante e o restante no tubo cônico.

3.6 Controle da monoclonalidade

O controle da monoclonalidade foi realizado em eletroforese.

A técnica convencional consiste em utilizar gel de Ágar. A amostra é inserida no gel e submetida a uma corrente elétrica de 150 Volts por 30 minutos. Neste caso as proteínas, de carga negativa, migram do pólo negativo para o positivo por afinidade elétrica. Foram utilizadas duas concentrações de gel de Ágar a 1% e gel de Ágar comercial a de concentração não informada, mas com garantia de maior sensibilidade (CELM®). Os géis foram corados com negro de amido a 1% em solução de ácido acético a 5% e descorados com solução alcoólica acética.

Outra técnica experimentada foi a eletroforese em sistema Phast SystemTM da GE na unidade de separação, utilizando gel comercial de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*SDS-PAGE*) com gradiente de concentração 4-15. A corrida foi feita a 250 Volts, 3 Watts, 0,001 Ampéres, 15°C, 75Vh durante 25 minutos. O indicador de corrida utilizado foi peso molecular Precision Plus Protein Dual Color StandardsTM da BioRad, que possui pesos moleculares variando entre 10 e 250kDa, sendo que os pesos de 25, 50 e 75kDa são considerados de alta precisão. As proteínas foram separadas de acordo com o peso molecular. A coloração primária, realizada na unidade de desenvolvimento no mesmo sistema, foi realizada com azul de Coomassie a 3% em solução de ácido acético a 5%, com o mesmo decolorante alcoólico acético, e glicerol a 5% como preservante, todos os processos a 50°C.

Para visualização de bandas que não foram reveladas e para aumentar a intensidade das já observadas, utilizou-se uma coloração com nitrato de prata. Essa substância possui maior afinidade por proteínas. Para tal, fixa-se o gel por 30 minutos em solução alcoólico acética a 4°C. Após desprezar o conteúdo líquido, incuba-se por mais 10 minutos a mesma temperatura com solução de nitrato de prata. Para revelação, utilizou-se solução de hidróxido de sódio a 3% com gotejamento, sob agitação constante de formaldeído a 37%. A reação foi parada com a troca do líquido por água destilada.

3.7 Determinação de especificidade por *Western Blotting*

Esta metodologia caracteriza-se por ser imunoquímica. Testaram-se dois protocolos.

O primeiro está descrito por VICENTINI-OLIVEIRA, 2009 e a corrida de BJAB foi realizada em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE de tamanho 9 cm x 8 cm e 0,75 mm de espessura, com gel de separação 12% e empilhamento de 5%. A transferência foi realizada para membrana de nitrocelulose de 0,45µm em sistema semi-seco (Biorad Trans-Blot^TSD Semi-Dry Transfer CellTM) nas condições padrões. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução tamponada acrescida de leite em pó desnatado. As tiras foram incubadas com os ascites diluídos 1:1000. Para revelação utilizou-se anti-IgG/A/M de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma). O substrato utilizado foi a solução de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato/ Nitroblue Tetrazolium (BCIP/NBT).

Para o segundo teste realizou-se eletroforeses em gel de SDS-PAGE, como descrito no item 3.6, com extrato de membrana de células B (linhagem RAMOS) e células T (linhagem JURKAT), tanto comercial quanto o extrato produzido em laboratório. Ao invés de

corar o gel, as proteínas de sua superfície foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45µm previamente hidratada (por no mínimo uma hora a 4°C) com água destilada. A transferência também foi realizada no sistema Phast System™ da GE, em conjunto semi-úmido (sanduiche de membrana de nitrocelulose e *SDS-PAGE*) por 2 horas a 15°C. O peso molecular da BioRad colorido serviu de controle da transferência. Quando completa, a membrana então foi bloqueada com leite a 5%. Em seguida passa por incubações com os anticorpos primárias (purificados concentrados) e secundárias, sendo este último conjugado com fosfatase alcalina. A revelação foi realizada com o composto BCIP/NBT comercial. Após visualização das bandas, a reação foi parada com água destilada (Figura 14).

Figura 14: Esquemática do ensaio de *Western Blotting*.

3.8 Produção de extrato de membrana

Para a produção de extrato de membrana celular foram utilizadas células mononucleares proveniente de amostra de um indivíduo com leucemia linfóide crônica de célula B, foram testados 4 protocolos:

3.8.1 com inibidores de protease comercial PhosSTOP™, utilizando protocolo de TOLOSA, et al. 2007, com sonicação mecânica por 5 minutos em gelo e nas mesmas condições com sonicação mecânica por 10 minutos em gelo;

3.8.2 uso do coquetel inibidor de protease do Kit de Extração Nuclear™ da Cayman Chemical (segundo recomendação do fabricante) com uso de centrífuga de rotor fixo a 300g e 4°C;

3.8.3 Com inibidores de protease comercial PhosSTOP™, utilizando protocolo de TOLOSA et al. 2007 com ultrasonicação por ondas de ultrassom (20%), 10 ciclos de 30 segundos cada no gelo.

3.9 Bioinformática

Para analisar com precisão dos géis de eletroforese e dos resultados dos *Western Blottings*, utilizou-se o software VDS™ da GE, segundo protocolo operacional padrão do Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP.

Este programa computacional tem a capacidade de analisar as bandas de interesse dos gráficos, dando um resultado preciso dos pesos moleculares encontrados.

3.10 Escolha dos anticorpos para testes

Com base na análise computacional dos 11 resultados obtidos através dos *Western Blottings* realizados, comparou-se o peso molecular adquirido com a tabela internacional de todos os CD humanos do último *Workshop* de Diferenciação de Antígenos Leucocitários (2008) que possui todos os pesos moleculares dos CDs em condições normais.

Para facilitar as análises realizadas selecionaram-se CDs presentes somente em linfócitos B e sem expressão em linfócitos T.

3.11 Validação por citometria de fluxo

A citometria de fluxo consiste em uma tecnologia baseada a laser que é utilizada para avaliar características de partículas em suspensão. Um sistema fluído de alta pressão hidrostática alinha as partículas num fluxo determinado. Um laser, gerado a partir de um sistema de iluminação, atinge as células, uma de cada vez. Os parâmetros primários adquiridos pelo citômetro são: tamanho da partícula e complexidade interna (granulosidade), por onde, conseguimos determinar grupos celulares como os linfócitos. No caso dessas células, só conseguimos diferenciar os subtipos T e B através do uso de anticorpos monoclonais anti-CD específico conjugados com fluorocromos. O resultado da luz difundida pela fluorescência é reunido por um sistema eletrônico e óptico que transforma a luz emitida em informações que serão armazenadas pelo computador (Figura 15). Um software transforma as informações em gráficos para análise.

Figura 15: BURMESTER e PEZZUTTO, 2003. Esquema do citômetro de fluxo e de um gráfico tipo *dot plot* de sangue total.

O protocolo básico consiste em incubar 1×10^6 células (sangue total ou células linfomononucleares) com o anticorpo murino primário sem marcação. Os anticorpos tipo IgG foram incubados a temperatura de 20°C e o tipo IgM a 4°C, por 30 minutos. Então nova incubação foi necessária para revelar o complexo antígeno-anticorpo. Nesta fase utilizou-se um anticorpo comercial contra imunoglobulinas murinas conjugado com FITC, respeitando a classe do anticorpo primário. Os protocolos seguidos foram os indicados pelos fabricantes dos anticorpos comerciais, apenas com a modificação de temperatura para IgM. As leituras em FL1 e análises via histograma foram feitas pelo software Cell QuestTM da BD. Para validação, utilizou-se sangue total de 20 indivíduos normais e células linfomononucleares de 20 amostras de neoplasias hematológicas diversas, como leucemias linfóide crônica e aguda de células B e T, leucemias mielóides crônicas e agudas e linfomas não Hodgkin.

Protocolos de padronização dos testes por citometria de fluxo foram necessários.

Primeiramente, ajuste de dose dos anticorpos produzidos em laboratório. Nesta fase, utilizou-se anti-CD20 humano comercial (segundo recomendações do fabricante) para padronizar as quantidades de linfócitos B nas amostras. Os anticorpos produzidos no laboratório foram testados em 10 dosagens: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100µL a fim de evitar efeitos pró-zona e marcações inespecíficas.

Foram realizados ainda, 15 testes com sangue total de camundongo, extraído por punção cardíaca. Nesses testes, foram utilizados anticorpos provenientes de: (1) ascite purificado, (2) sobrenadante de cultura e (3) IgM murinas inespecíficas.

3.12 Análise estatística

Primeiramente, comparou-se o desempenho na porcentagem de células marcadas dentro do *gate* de linfócitos para indivíduos normais, e do *gate* específico para as neoplasias, em relação aos anticorpos produzidos no laboratório e os comerciais hipotéticos.

Também foi necessário, tabulação dos dados extraídos dos gráficos, fazendo uma estatística descritiva, calculando suas medianas e comparando-as para intervalos de confiança de 95%.

Para análise de tendências foi efetuado teste de regressão linear (correlação). Por fim, compararam-se os resultados obtidos com os padrões utilizados em hemogramas, observamos as concordâncias e discordâncias entre os anticorpos produzidos e os comerciais.

Por esta avaliação, foi possível finalizar a caracterização dos anticorpos monoclonais produzidos *in house*.

3.13 Imunofluorescência Indireta

O princípio deste teste é semelhante a citometria de fluxo. Neste caso, um esfregaço laminar previamente fixado com Metanol P.A. durante 30 minutos a 4°C, é incubado com os anticorpos escolhidos, tanto comerciais quanto produzidos em laboratório, respeitando a mesma regra de temperatura para IgG e IgM. Para revelação, utiliza-se o mesmo anticorpo secundário conjugado com FITC. As células marcadas são então visualizadas através de microscopia fluorescente. Foram feitas ao total 10 lâminas cada uma com um anticorpo primário, de um indivíduo sadio e 10 lâminas de um indivíduo portador de leucemia linfóide crônica de linfócitos B (Figura16).

Figura 16: BURMESTER e PEZZUTTO, 2003. Esquemática da imunofluorescência indireta.

3.14 Imunoquímica

O anticorpo C que foi produzido em laboratório e suas respectivas hipóteses comerciais foram testados *in vivo*. Doze camundongos Balb/c foram divididos em 4 grupos: grupo controle (com injeção de salina), grupo G1 (proteção com LINB C), grupo G2 (proteção com anti-CD20 comercial) e grupo G3 (proteção com anti-CD19 comercial). As imunizações foram feitas de acordo com a Figura 17. Foram inoculados 136µg de cada anticorpo. A coloração final foi realizada com hematoxilina-eosina, respeitando o protocolo apresentando GOLIM et al. em 2008:

Figura 17: Esquema de trabalho das imunizações dos testes *in vivo*.

3.15 Imuno-histoquímica

O protocolo utilizado na imuno-histoquímica seguiu como descrito por SODRÉ, 2009. Inicialmente, foram testados 7 diluições (1:100, 1:300, 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000 e 1:10000) dos anticorpos LINBs escolhidos. Medulas ósseas provenientes de biópsias de pacientes com mieloma múltiplo e biópsias de melanoma maligno foram incluídas em parafina e cortadas em micrótomo, então preparadas em lâminas histológicas de vidro previamente tratadas com *poly-d-lysine* (aderente). As lâminas foram riscadas com diamante, cercado os cortes histológicos para contenção dos reagentes sobre os tecidos, e deixadas em

estufa a 56°C por no mínimo 18 horas. Após este período, foram desparafinizadas em xilol. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena, recuperação de epítomos pelo calor (microondas) e incubação com os anticorpos testados. Para revelação, utilizou-se anticorpo secundário biotilado e streptavidina. O cromógeno utilizado para visualização da marcação foi o DAB (diaminobenzidina).

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

O protocolo LINB foi iniciado em 2004 pelo Laboratório de Engenharia Celular em parceria com o Laboratório de Citometria de Fluxo, ambos do Hemocentro de Botucatu da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Como fonte de imunização dos camundongos utilizou-se células mononucleares (isoladas por gradiente de densidade Ficoll-HypaqueTM) do sangue periférico de paciente portador de leucemia linfóide crônica de células B (com mais de 90% de linfócitos B na amostra) estocadas em nitrogênio líquido com protetor criogênico dimetilsulfóxido (DMSO) com soro fetal bovino no mesmo laboratório. Foram imunizados camundongos BALB/c, via intraperitoneal com alúmen (sulfato duplo de potássio e alumínio) como adjuvante. Após eutanásia e remoção do baço, os linfócitos B foram fusionados com células de mieloma múltiplo da linhagem NS1 através de polietilenoglicol (métodos de fusão química). A seleção dos híbridos ocorreu em meio HAT. Esta etapa resultou em 2496 híbridos, dos quais 22 foram mantidos em cultura pós *screening* por citometria de fluxo, por serem produtores dos anticorpos que apresentam alta positividade frente às células utilizadas como imunógenos. Desses, 10 foram escolhidos com base em critério de crescimento celular e viabilidade da cultura sendo, então, clonados pelo método de diluição limitante, gerando 28 clones que satisfaziam as condições de crescimento. Pós *screening* dos clones, selecionou-se 20 produtores de imunoglobulinas que apresentavam alta especificidade. Foi realizado ascite para obtenção de maior concentração protéica. Os líquidos ascíticos foram congelados em freezer a -80°C. Os clones foram separados de acordo com o perfil de reatividade celular frente a: (1) linfócitos B – 11 clones, (2) linfócitos T – 1 clone, (3) linfócitos T e B – 2 clones, (4) linfócitos T, B, monócitos e células NK – 6 clones (GOLIM et al., 2008).

Para o desenvolvimento deste trabalho, escolheu-se caracterizar anticorpos secretados dos 11 clones que possuíam perfil anti-linfócitos B humanos. As quantidades de ascite e os nomes dos clones estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Clones secretores de imunoglobulinas e quantidade de ascite estocada.

Identificação do Clone	Volume (mL) de ascite congelado
LINB A	1,0
LINB B	15,0
LINB C	12,0
LINB D	19,5
LINB E	15,0
LINB F	34,5
LINB G	12,0
LINB H	34,5
LINB I	30,0
LINB J	9,0
LINB L	10,5

Para purificar as ascites, foi necessário identificar a classe e subclasse de imunoglobulina secretada pelos clones em questão, já que o método de purificação (cromatografia por afinidade) difere para cada classe de anticorpo. O método de CBA é considerado atualmente padrão ouro de determinação de classe e subclasse, visto que detecta pequenas quantidades de anticorpos na amostra sendo, portanto altamente específico e sensível. Dos 11 sobrenadantes de cultura testados, 6 anticorpos são da classe IgM, 5 da classe IgG, sendo 4 da subclasse de IgG₁ e 1 da subclasse IgG_{2b}. Todos apresentaram expressão da cadeia leve tipo *kappa*, resultado coerente com a literatura que indica que 95% das cadeias leves expressa em camundongos são do tipo *kappa*, e somente 5% do tipo *lambda*. Proporção esta que se altera em humanos, sendo em torno de 60% das cadeias tipo *kappa* e 40% do tipo *lambda* (GOLDSBY et al., 2002). Os resultados finais estão sumarizados tabela 2.

Tabela 2: Determinação de classe, sub-classe e expressão da cadeia leve das imunoglobulinas secretadas.

AcMm	Classe e Sub-classe	Cadeia leve
LINB A	IgM	Kappa
LINB B	IgM	Kappa
LINB C	IgM	Kappa
LINB D	IgG ₁	Kappa
LINB E	IgM	Kappa
LINB F	IgG ₁	Kappa
LINB G	IgG ₁	Kappa
LINB H	IgG _{2b}	Kappa
LINB I	IgM	Kappa
LINB J	IgM	Kappa
LINB L	IgG ₁	Kappa

A figura 18A demonstra a seleção da população de *beads* em *dot plot* nos parâmetros de tamanho *versus* granulosidade das partículas. A 18B mostra reconhecimento padrão IgG₁ com expressão da cadeia *kappa*, num gráfico de FL3 *versus* FL2.

Figura 18: Padrão de gráficos obtidos pelo método de CBA para IgG₁. A: *dot plot* das *beads* e B: gráfico de fluorescência FL3 x FL2

A figura 19A demonstra novamente a seleção da população de *beads* nos mesmos parâmetros citados. A 19B mostra reconhecimento padrão IgM com expressão da cadeia *kappa*, num gráfico de FL3 *versus* FL2.

Figura 19: Padrão de gráficos obtidos pelo método de CBA para IgM. A: *dot plot* das *beads* e B: gráfico de fluorescência FL3 x FL2

O LINB A não prosseguiu para as etapas subseqüentes, visto que o volume de ascite armazenado (1mL) era insuficiente para viabilizar as etapas de caracterização.

Com as devidas classes determinadas, foi possível selecionar as colunas de purificação a serem utilizadas. Nas purificações das IgGs deve-se observar o parâmetro de acidez da solução (pH), já que a afinidade à coluna ocorre em meio neutro ou básico e a eluição ocorre em meio ácido, sendo que diferentes classes das imunoglobulinas murinas eluem em determinados pH, como no caso das imunoglobulinas murinas: no pH 6,0 ocorre eluição das IgG₁, no pH 5,0 das IgG_{2a} e no pH 4,0 ou inferior das IgG_{2b} e IgG₃. A purificação das IgG₁ ocorreu em pH próximo a 5,75 e da IgG_{2b} o pH foi de 4,70. O primeiro pico é referente ao primeiro eluato constituído de proteínas não adsorvíveis em proteína Sepharose-A, sendo a albumina a proteína predominante e o segundo pico a imunoglobulina purificada. A figura 20 mostra o gráfico padrão obtido pelo software PrimeViewTM.

Figura 20: Gráfico obtido na purificação de IgG_{2b}, sendo o primeiro pico de albumina e o segundo de imunoglobulina. A linha rosa indica o pH, a verde a concentração e a azul a leitura UV.

Já nas purificações das IgM, devido a interação ocorrer por adsorção tiofílica, o parâmetro observado deve ser a condutividade do meio que varia de 0 a 110 mS/cm. A imunoglobulina se fixa na coluna em solução com alta condutividade e a queda brusca deste quesito permite eluição imediata das IgMs. Neste caso, o primeiro pico também é referente a albumina, o pico intermediário é a IgM purificada e o terceiro pico é o tampão de lavagem da coluna e outras proteínas. Na figura 21 há o padrão gráfico obtido no mesmo software.

Figura 21: Gráfico obtido na purificação de IgM, sendo o primeiro pico de proteínas não fixadas, o segundo de imunoglobulina e o terceiro de tampão de lavagem. A linha vermelha indica a condutância, a verde a concentração e a azul a leitura UV.

As colunas de purificação de IgG de 5mL (que permite purificação de 10mL de ascite) são economicamente viáveis e possuem maior vida útil além de permitir reutilizações. Já as colunas de purificação de IgM de 1mL são dispendiosas e permitem somente a purificação de no máximo 4mL de ascite. Além disso, estas apresentaram maior instabilidade, sendo que a reutilização fica mais restrita, tornando este ensaio menos viável. Como as quantidades de ascite utilizadas inicialmente na purificação são diferentes, e os rendimentos das colunas de IgG são maiores que os das colunas de IgM, é aceitável o fato de que foram obtidos no mínimo 8,0mL de purificado da coluna de IgG e o máximo obtido na coluna de IgM foi de 3,2mL. Os resultados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Volumes obtidos a partir das purificações das ascites.

AcMm	Volume purificado (mL)
LINB A	Não realizado
LINB B	2,3
LINB C	0,7
LINB D	8,0
LINB E	1,2
LINB F	12,0
LINB G	8,0
LINB H	12,0
LINB I	3,2
LINB J	2,6
LINB L	9,0

Foram dosados por espectrofotometria os sobrenadantes de cultura, as ascites e os purificados. As ascites apresentaram concentrações mais elevadas (de 30 a 51 mg/mL). Devido a diferença de rendimento, as concentrações dos purificados também se apresentaram variáveis, sendo que todas as IgGs apresentam concentração mínima de 1,0mg/mL e as IgM concentração máxima de 0,30mg/mL. Frente a baixa quantidade de proteínas disponíveis, principalmente para as IgMs, optou-se pelo uso dos sobrenadantes de cultura (SNC) congelados. Os SNC possuem inúmeras proteínas presentes no meio de cultura indutoras do crescimento celular, no entanto entre estas proteínas não há imunoglobulinas senão as secretada pelo próprio clone. Portanto, como se apresentavam armazenados em meio de cultura completo com 10% de soro fetal bovino, para cálculo da concentração final dosou-se os SNC e separadamente o meio de cultura. As concentrações foram calculadas subtraindo-se a dosagem do meio de cultura da concentração inicial encontrada. Os valores encontrados variaram de 1,6mg/mL até 4,41mg/mL. Os clones em cultura secretam na ordem de nanogramas de proteínas diariamente, e para minimizar a influência desta variável, preconizou-se o uso dos SNC dos clones que foram colocados para “morrer” já que seu meio de cultura não foi trocado por mais de 15 dias. Os resultados estão sumarizados na tabela 4.

Tabela 4: Dosagens de proteínas totais (mg/mL)

Dosagens de proteínas totais (mg/mL)			
AcMm	Sobrenadante de cultura	Ascite	Purificado
LINB A	n/r	n/r	n/r
LINB B	4,96	33,23	0,25
LINB C	6,62	51,46	0,22
LINB D	5,14	35,09	1,69
LINB E	5,52	35,39	0,27
LINB F	5,35	35,07	1,86
LINB G	6,27	46,36	1,66
LINB H	6,11	41,48	1,23
LINB I	5,36	38,38	0,06
LINB J	4,13	30,71	0,30
LINB L	6,94	43,90	2,52
Meio de Cultura			
Completo com SFB	2,53	n/r	n/r
10%			

Obs: n/r = não realizado

Para otimizar os volumes de imunoglobulina purificada, dois protocolos de concentração de proteínas foram testados. O primeiro, pelo método de diálise, não garantiu bons resultados já que a concentração diminuiu ao fim dos processos. Como a padronização de método foi realizada com determinada marca de sacos de diálise e o experimento realizado com material de outra marca, nossa hipótese baseia-se na probabilidade de diferença de porosidade das membranas de diálise, visto que os fabricantes não especificam tal informação. É provável que os poros do material da marca utilizada no experimento sejam de maior tamanho permitindo a passagem difundindo a proteína de interesse no meio hipotônico (tabela 5).

Tabela 5: Dosagem de proteínas totais (mg/mL) pós concentração com sacos de diálise

AcMm	Dosagem de proteínas totais (mg/mL)
LINB D	1,40
LINB L	2,01

Já as colunas de concentração da Millipore, houve concentração efetiva das proteínas, ocorrendo o aumento da concentração em até 6,74 vezes, o que facilitou os testes subsequentes expressos na tabela 6.

Tabela 6: Dosagem de proteínas totais (mg/mL) e número de vezes concentrado após utilização do sistema da Millipore.

AcMm	Dosagem de proteínas totais (mg/mL)	Número de vezes concentrado
LINB A	n/r	n/r
LINB B	0,38	1,52
LINB C	0,46	2,10
LINB D	11,22	6,64
LINB E	0,47	1,74
LINB F	5,50	2,96
LINB G	11,19	6,74
LINB H	1,49	1,21
LINB I	0,27	4,5
LINB J	2,02	6,73
LINB L	9,22	3,66

Obs: n/r = não realizado

Para controle de monoclonalidade, primeiramente fez-se eletroforese em gel de Ágar a 1%. Os resultados obtidos mostram a purificação do anticorpo monoclonal para as IgGs com a presença de somente uma banda próximo ao ponto de aplicação. Já para as IgMs essa banda de monoclonalidade fica difícil de ser visualizada já que a concentração inicial, mesmo da purificado concentrado, era baixa. Através de análise computadorizada, foi possível visualizar graficamente a presença de um pico que demonstra a existência banda monoclonal. Conclui-se que esta técnica possui baixa sensibilidade para IgMs.

Na figura 22 é mostrado o padrão de IgG, e na figura 23 o padrão de IgM. Foram utilizados no mínimo 4,0 μ g de proteína. Os itens A demonstram corrida eletroforética de ascite e os B demonstram os purificados.

Figura 22: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de ágar 1% da purificação da IgG. A: ascite e B: purificado.

Figura23: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de ágar 1% da purificação da IgM. A: ascite e B: purificado

Para confirmar este resultado testou-se também em gel de Ágar Celm, cujo fabricante atesta maior sensibilidade que o Ágar a 1%. Para as IgGs o resultado foi novamente satisfatório, permitindo a visualização da banda monoclonal. Para IgM, tanto purificada quanto concentrada, há o aparecimento de bandas visíveis que determinaram picos de maior intensidade, comprovando a maior sensibilidade do gel comercial. Mesmo assim, por ambas as técnicas, outras bandas protéicas desaparecem, dando falsa impressão de que a purificação funcionou 100%.

Nas ilustrações abaixo é demonstrado os géis de Ágar comerciais mais sensíveis. O padrão de IgG está na figura 24 e de IgM na figura 25. Novamente, os itens A: ascite, B: purificado e C: sobrenadante de cultura.

Figura24: Figuras que demonstram o resultado obtido com gel de ágar comercial da purificação da IgG. A: ascite e B: purificado

Figura 25: Figura que demonstram o resultado obtido com gel de Ágar comercial da purificação da IgM. A: ascite, B1: purificado, B2: purificado concentrado e C: sobrenadante de cultura

Sabe-se que cada purificação tem rendimento variável, podendo chegar até 60%. Para comprovar tal hipótese, foi feito eletroforese em gel de poliacrilamida das ascites e purificados. A coloração por azul de Coomassie continua com a mesma impressão determinada pelo Ágar, já que há aparecimento de somente uma banda monoclonal. Quando corado por nitrato de prata, coloração com maior afinidade por proteínas, observamos o aparecimento de bandas inespecíficas, principalmente de uma com 65 kDa, determinada pela albumina restante.

Abaixo, perfil eletroforético em gel de poliacrilamida. Foi utilizada no mínimo 1µg de amostra. A figura 26 indica o padrão de IgG e a 27 o padrão de IgM coradas com azul de Coomassie e nitrato de prata. As letras A. B e C continuam com o mesmo significado.

Figura 26: Gel de SDS-PAGE que representa o padrão obtido na purificação das IgGs. A: ascite e B: purificado. Azul de Coomassie a esquerda e nitrato de prata a direita

Figura 27: Figura que demonstram o resultado obtido com gel de SDS-PAGE da purificação da IgM. A: ascite, B1: purificado, B2: purificado concentrado e C: sobrenadante de cultura

O primeiro *Western Blotting* foi realizado em gel de 9 cm x 8 cm e 0,75 mm de espessura e com ascite diluído 1:1000, conforme descrito por VICENTINI-OLIVEIRA, 2009. Foi utilizado extrato de membrana celular comercial de células da linhagem BJAB (linfoma de células B). Para obtenção de quantidade protéica ideal para o gel, era necessário 20µL de extrato numa concentração de 2,5mg/mL por pista de gel. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose deste protocolo teve baixo rendimento, pois no gel, posteriormente corado, as bandas do extrato ainda eram evidentes. Na revelação, as ascites dos LINB B,C,D,F,G,H,I apresentaram pelo menos duas bandas. Esse resultado foi considerado insatisfatório por se tratar de anticorpos monoclonais, espera-se reconhecimento de única proteína, somente uma banda de peso molecular específico, visto que na técnica não foi utilizado agente redutor, como por exemplo 2-mercaptoetanol, preservando assim a proteína íntegra. As fotos que exemplificam a análise estão na figura 28, onde múltiplas bandas foram encontradas, sendo a legenda 1: peso molecular, 8:LINB B e 9: LINB C, e os resultados gerais estão na tabela 7.

Figura 28: Demonstração da marcação obtida através do *Western Blotting* realizado com ascite diluído 1:1000. Pista 1: peso molécula, pista 8: LINB B e pista 9: LINB C, forte evidenciamento de múltiplas bandas.

Tabela 7: Pesos moleculares encontrados no primeiro *Western Blotting* com ascite diluído 1:1000

AcMm	Pesos moleculares encontrados (kDa)
LINB A	n/r
LINB B	67,3 e 60,5
LINB C	84,3/ 61,7/ 23,7
LINB D	82,1/ 60,7/ 42,6/ 23,4
LINB E	60,0
LINB F	70,4 e 29,2
LINB G	103,0/ 66,7/ 64,3/ 58,9/ 15,1
LINB H	79,7 e 58,4
LINB I	64,3 e 52,9
LINB J	n/r
LINB L	n/r

Obs: n/r = não realizado

Optou-se por fim, re-padronizar o protocolo utilizando o sistema semi automatizado Phast SystemTM da GE. Os géis comerciais de poliácridamida possuem 4,5cm x 5cm e a área de corrida 3,0cm x 4,0cm, e o máximo de amostra utilizada é 4µL. A transferência neste caso possui alto rendimento, não sobrando bandas visíveis pós coloração do gel transferido. A padronização de quantidade de proteína de anticorpos primários e secundários é necessária uma vez que as pistas das corridas são bem menores. Neste caso, utilizou-se extrato de membrana celular da linhagem RAMOS (linfócitos B maduros de linfoma de Burkitt) e como controle positivo anti-CD20. Este anticorpo foi testado nas diluições 1:100, 1:250, 1:500, 1:750 e 1:1000. Todas as diluições apresentaram uma mesma banda de 89kDa, sendo que a espessura das bandas diminuiu conforme aumentou-se a diluição do anticorpo. O anticorpo secundário utilizado foi um anticorpo anti-Ig murino polivalente (IgG, IgM e IgA) produzido em cabra e conjugado com fosfatase alcalina. A diluição desta, recomendada pelo fabricante é de 1:1000. Testou-se então: 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500 e 1:10000, sendo que as três primeiras diluições apresentaram uma banda inespecífica de 144kDa. A literatura, aponta que o CD20 possui de 35 a 37 kDa (POLYAK, LI, et al. 2008). A banda encontrada pelo anticorpo comercial anti-CD20 apresentou banda de 89 kDa. Essa explicação se dá pela alteração quantitativa e/ou qualitativa dos antígenos de superfície em células neoplásicas, como as de Linfoma de Burkitt.

Embora o mecanismo seja desconhecido, existem evidências que alguns antígenos de superfície, como o CD20, existam em vários formatos distintos, como: monômeros que funcionam como sinalizadores de superfície ou complexos multiméricos que formam canais de troca de íons de cálcio, possuindo peso molecular variante (35 a mais que 200 kDa). Além disso, células neoplásicas podem apresentar hiper-fosforilação da cauda citoplasmática, o que também pode influenciar no peso molecular final (BUBIEN et al., 1993; POLYAK et al., 2008; POLYAK e AYER et al., 2003).

Após os testes realizados com ascite apresentarem bandas múltiplas, neste processo optou-se por utilizar os anticorpos purificados. Os AcMm LINBs foram testados contra extrato de membrana celular das linhagens RAMOS (células B maduras) e JURKAT (linfoma de células T), funcionando este último como controle negativo de marcação. O uso da bioinformática (análise através do software VDSTM) permitiu determinar o peso molecular encontrado nas bandas com base no padrão utilizado. O software transforma todas as bandas em gráfico e seus picos, tornando a análise muito mais precisa. Cada LINB apresentou

marcação de uma única banda. Somente o LINB I marcou uma banda no extrato RAMOS e também uma banda no extrato JURKAT. O padrão de banda revelada com o anticorpo LINB F está na figura 29. Em 30 há o gráfico de análise gerado pelo software. Na tabela 8 encontram-se resumidos todos os pesos moleculares encontrados.

Figura 29: Demonstração da marcação obtida através padrão do *Western Blotting* realizado com purificado e no sistema semi-automatizado Phast SystemTM. Aqui se encontra uma banda com peso molecular de 127 kDa.

Figura 30: Gráfico obtido a partir do *Western Blotting* da figura 29. Em verde demonstrando a banda reconhecida pelo LINB F (linhagem RAMOS). Em amarelo e azul o peso molecular.

Tabela 8: Tabela com os pesos moleculares encontrados a partir das análises dos *Western Blottings* realizados com extrato da linhagem RAMOS e JURKAT.

AcMm	Pesos moleculares encontrados (kDa)	
	RAMOS	JURKAT
LINB A	n/r	n/r
LINB B	213	Neg
LINB C	92	Neg
LINB D	142	Neg
LINB E	122	Neg
LINB F	127	Neg
LINB G	130	Neg
LINB H	135	Neg
LINB I	113	68
LINB J	242	Neg
LINB L	248	Neg

Obs: n/r = não realizado, neg = negativo

Todas as bandas reconhecidas pelos LINB foram comparadas com a tabela internacional de CD leucocitários do último workshop realizado em 2008. Através do peso molecular, restringindo a seleção a CDs existentes exclusivamente em linfócitos B, e CDs hiper-expressos em células neoplásicas, constituiu-se a tabela 9. Para validação e testes adicionais, escolheram-se os CDs de maior relevância clínica: CD19, CD20, CD45RA, CD107b, CD138 e CD171.

Tabela 9: Prováveis reconhecimentos dos anticorpos testados. Grifado de amarelo estão os escolhidos para continuidade dos testes.

AcMm	Possíveis CDs
LINB A	n/r
LINB B	CD45RA, CD45RB, CD171, CD35
LINB C	CD19, CD20, CDw131, CD138, CD150, CD307
LINB D	CD21, CD135, CD138
LINB E	CD6, CD60, CD107b, CDw131, CD138
LINB F	CD6, CD138
LINB G	CD6, CD138, CD135
LINB H	CD6, CD21, CD85, CDw131, CD138
LINB I	CD6, CD21, CD85, CD138
LINB J	CD35, CD227
LINB L	CD35, CD227

Obs: n/r = não realizado

Frente a relevância da técnica imunoquímica para a caracterização dos monoclonais, e da importância dos extratos celulares, decidiu-se padronização de 4 protocolos na tentativa de obtenção de extrato celular próprio, todos utilizando inibidores de protease. Os protocolos utilizando sonicação mecânica não promoveram quebra da membrana celular. O protocolo utilizando centrifugação com alta rotação também não demonstrou presença de bandas. Já o protocolo de extrato 4, utilizando sonicação com ondas de ultrassom apresentou inúmeras bandas visíveis com coloração de azul de Coomassie (Figura 31).

Figura 31: SDS-PAGE com os extratos feitos *in house*. PM: Peso molecular, pista 1: inibidores de protease comercial PhosSTOP™ e sonicação mecânica por 5 minutos em gelo, pista 2: inibidores de protease comercial PhosSTOP™ e sonicação mecânica por 10 minutos em gelo, pista 3: coquetel inibidor de protease do Kit de Extração Nuclear™ da Cayman Chemical com uso de centrifuga de rotor fixo a 300g e 4°C, pista 4: inibidores de protease comercial PhosSTOP™, com ultrasonicação por ondas de ultrassom (20%), com 10 ciclos de 30 segundos cada no gelo.

Para comparação, com os extratos comerciais BJAB, RAMOS e JURKAT foram realizadas em eletroforese no mesmo tipo de gel 4-15. A figura 32 mostra a coloração em azul de Coomassie.

Figura 32: SDS-PAGE 4-15 com extratos comerciais de BJAB, RAMOS e JURKAT corados com azul de Coomassie

A análise no software VDSTM revelou algumas bandas compatíveis, mas relevantes diferenças entre as mais pesadas (maiores que 50kDa).

Os *Western Blotting* com os LINB B,C e E foram refeitos com o extrato 4. A análise mostrou bandas reconhecidas com tamanhos próximos às bandas do extrato RAMOS (tabela 10).

Tabela 10: Comparação entre pesos moleculares encontrados nos extratos comerciais (RAMOS e JURKAT) e produzido *in house* (extrato 4).

AcMm	Pesos moleculares encontrados (kDa)		
	RAMOS	JURKAT	Extrato 4
LINB B	213	Neg	217
LINB C	92	Neg	98
LINB E	122	Neg	106

Novamente, para confirmação, realizou-se *Western Blotting* com todos os extratos (RAMOS, JURKAT e Extrato 4) com os anticorpos comerciais adquiridos (anti-CD19, anti-CD20, anti-CD45RA, anti-CD107b e anti-CD171). Os pesos moleculares encontrados foram semelhantes aos pesos iniciais obtidos. Na tabela 11 estão resumidos todos os pesos moleculares encontrados.

Tabela 11: Comparação entre os pesos moleculares encontrados nos diferentes extratos com uso de anticorpos comerciais.

Anticorpos comerciais	Pesos moleculares encontrados (kDa)		
	RAMOS	JURKAT	Extrato 4
Anti-CD19	95	Neg	93
Anti-CD20	89	Neg	88
Anti-CD45RA	221	Neg	197
Anti-CD171	199	Neg	206
Anti-CD107b	137	Neg	114

As disparidades de concentração final dos purificados tipo IgM e SNC levaram à hipótese de um possível reconhecimento inespecífico do camundongo durante a ascite, o que levaria a uma reação das IgM monoclonais com o sangue murino e absorção dessas pelo organismo do animal. A fim de verificar possíveis inespecificidades entre uso de material proveniente de sobrenadante de cultura e anticorpo purificado, testaram-se ambos com sangue total de camundongo. Analisando pelo teste de *Mann-Whitney* houve diferença estatística extremamente significativa ($p < 0,0001$) entre os testes com sobrenadante de cultura e com o purificado. Como durante a cromatografia, a purificação da ascite isola tanto as IgM monoclonais de interesse quanto as IgM policlonais murinas, concluiu-se que o purificado possui IgMs inespecíficas. Por se apresentarem de forma pentamérica e, portanto, com alto peso molecular (900kDa), formulou-se a hipótese de que essas IgMs inespecíficas estariam de alguma forma se complexando durante a marcação com o anticorpo secundário, resultando em maior quantidade de células marcadas. Para satisfazer uma explicação, testou-se o sangue total dos camundongos com uma IgM murina purificada sem especificidade definida. Pela mesma análise comparou-se o resultado final com o sobrenadante de cultura e com o purificado, sendo que frente ao primeiro houve grande diferença estatística ($p < 0,0001$) e ao segundo não houve diferença estatística ($p > 0,001$). A estatística descritiva destes testes está na tabela 12.

Tabela 12: Resumo da estatística descritiva de teste de inespecificidade dos anticorpos.

	Sobrenadante de cultura	Purificado	IgM murina
N	15	15	15
Média	3,58	18,82	23,77
Desvio padrão	7,76	17,75	4,76
Valor mínimo	0,17	1,85	21,96
Valor máximo	27,97	5,95	27,28
Mediana	1,66	10,06	24,15
Teste aplicado	Mann-Whitney		

OBS: n = número amostral se sangue total de camundongos testados

Optou-se por trabalhar com os SNC. Antes de iniciar a validação por citometria de fluxo, foi feita curva de dosagem dos LINB B, C e E com sangue periférico de indivíduos

normais. Os gráficos 1, 2 e 3 da Figura 33 mostram respectivamente os pontos de padronização. Foi adicionada curva de tendência (utilizando polinômios de grau 6), lembrando que quanto mais próximo o coeficiente de correlação r estiver de 1 mais verdadeira é a tendência.

Figura 33: Gráficos de quantidade de células marcadas *versus* quantidade de anticorpo utilizada, teste realizado para LINB B,C e E

A porcentagem de células marcadas foi comparada com a marcação do anti-CD20 (média de 14,6%) comercial e para os três anticorpos escolheu-se trabalhar com 20 μ L.

Na validação, os histogramas obtidos pela análise dos anticorpos comerciais, há evidente separação entre o pico negativo e positivo, isto é, duas populações de células distintas. Quando utilizados os anticorpos produzidos *in house*, os picos apresentaram-se mais próximos no entanto, esta diferença foi suplantada com a composição com os controles negativos realizados em todas as reações.

A Figura 34 abaixo demonstra o padrão encontrado de histogramas e *dot plots* em testes com indivíduos normais e com neoplasias hematológicas dos testes com LINB E e anti-CD107b de um individuo normal.

Figura 34: Padrão encontrado de histogramas e *dot plots* com seleção da população de linfócitos (A) em testes com indivíduos normais com anti-CD107b (B) e com LINB E (C).

Os desempenhos dos monoclonais produzidos (LINBs) acompanharam o desempenho dos anticorpos comerciais testados, não havendo prevalência constante, maior ou menor, de nenhum anticorpo tanto em indivíduos normais quanto aqueles que apresentavam neoplasias.

O desempenho comparativo do parâmetro avaliado em indivíduos sadios pelo LINB C e anti-CD19 está descrito na Figura 35.

Figura 35: Gráfico do desempenho do LINB C e Anti-CD19 em indivíduos normais com relação a porcentagem de células marcadas.

A mesma análise também foi realizada em indivíduos com hematologias neoplásicas. A Ilustração 36 representa o desempenho dos anticorpos.

Figura 36: Gráfico do desempenho do LINB C e Anti-CD19 em indivíduos com neoplasias hematológicas com relação a porcentagem de células marcadas.

Para a validação por citometria de fluxo considerou-se como valores de referência para linfócitos B 10-15% da população de linfócitos. Não houve relação entre porcentagem de células marcadas e grupo de doenças específica. Todos os gráficos foram gerados, automaticamente pelo software de análise: GraphPad Instat3.0TM.

4.1 Comparação LINB C versus anti-CD19

A estatística descritiva está relatada na tabela 13. Empregou-se o teste de Dunett, onde se usa um dos itens como controle (anticorpo comercial). Não houve diferença significativa entre os dois anticorpos analisados.

Tabela 13: Resumo da estatística descritiva da comparação do LINB C com o anti-CD19

	Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
	Anti-CD19	LINB C	Anti-CD19	LINB C
N	20	20	20	20
Média	14,712	14,547	37,788	39,145
Desvio padrão	5,245	5,287	29,558	29,558
Valor mínimo	6,0	5,35	4,22	9,35
Valor máximo	23,97	24,32	89,02	90,86
Mediana	14,020	14,785	32,025	29,86
Teste aplicado	Dunett		Dunett	
P value	p>0,05		p>0,05	
Resultado	Não significativa		Não significativa	

O teste relacionando *scores* de normalidade está apresentado abaixo (tabela 14) Considerando os três grupos onde A, B e C, onde A (baixo): de 0 a 33%, B (médio): de 33 a 66% e C (alto): de 66 a 100%, houve alta concordância entre os resultados obtidos entre o LINB C e anti-CD19, com 80% de concordância dos anticorpos em amostras de indivíduos normais e 90% em indivíduos com neoplasias hematológicas.

Tabela 14: Comparação do LINB C e anti-CD19 por *scores* de normalidade

		Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
Comercial	Produzido	N	Freq (%)	n	Freq (%)
Baixo	Baixo	3	15	2	10
Baixo	Normal	1	5	2	10
Baixo	Alto	0	0	0	0
Normal	Baixo	0	0	0	0
Normal	Normal	6	30	1	5
Normal	Alto	2	10	0	0
Alto	Baixo	0	0	0	0
Alto	Normal	1	5	0	0
Alto	Alto	7	35	15	75
Comercial = produzido		16	80 (C)	18	90 (C)
Comercial > produzido		1	5 (A)	0	0 (A)
Comercial < produzido		3	15 (A)	2	10 (A)

Ainda foi realizado teste de regressão linear para avaliar a correlação entre os dois anticorpos utilizados. Para os indivíduos normais o coeficiente de correlação (r) foi de 0,8846. Já para indivíduos com neoplasias esse coeficiente foi de 0,9678. O gráfico de regressão linear desses últimos indivíduos está representado na Figura 37.

Figura 37: Gráfico do teste de correlação entre LINB C e anti-CD19 em indivíduos com neoplasias hematológicas.

4.2 Comparação LINB C versus anti-CD20

A análise desta comparação não revelou diferença significativa entre os anticorpos analisados. A tabela descritiva está abaixo (tabela 15).

Tabela 15: Resumo da estatística descritiva da comparação do LINB C com o anti-CD20

	Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
	Anti-CD20	LINB C	Anti-CD20	LINB C
N	20	20	20	20
Média	15,145	14,547	41,228	39,145
Desvio padrão	4,593	5,287	28,265	29,558
Valor mínimo	4,48	5,35	8,36	9,35
Valor máximo	24,57	24,32	90,38	90,86
Mediana	15,02	14,785	29,93	29,86
Teste aplicado	Dunett		Dunett	
P value	p>0,05		p>0,05	
Resultado	Não significativa		Não significativa	

O teste relacionando *scores* de normalidade está apresentado abaixo (tabela 16). Utilizando os mesmos parâmetros de classificação, houve alta concordância entre os resultados obtidos entre o LINB C e anti-CD20, com, novamente, 80% de concordância dos anticorpos em amostras de indivíduos normais e 85% em indivíduos com neoplasias hematológicas.

Tabela 16: Comparação do LINB C e anti-CD20 por *scores* de normalidade

		Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
Comercial	Produzido	N	Freq (%)	n	Freq (%)
Baixo	Baixo	2	10	1	5
Baixo	Normal	0	0	1	5
Baixo	Alto	0	0	0	0
Normal	Baixo	1	5	0	0
Normal	Normal	6	30	1	5
Normal	Alto	1	5	0	0
Alto	Baixo	0	0	1	5
Alto	Normal	2	10	1	5
Alto	Alto	8	40	15	75
Comercial = produzido		16	80 (C)	17	85 (C)
Comercial > produzido		3	15 (A)	2	10 (A)
Comercial < produzido		1	5 (A)	1	5 (A)

O teste de regressão linear apresentou para os indivíduos normais o coeficiente de correlação (r) foi de 0,7423. Já para indivíduos com neoplasias esse coeficiente foi de 0,4420. O gráfico de regressão linear dos indivíduos normais está representado na figura abaixo (Figura 38).

Figura38: Gráfico do teste de correlação entre LINB C e anti-CD20 em indivíduos normais.

4.3 Comparação entre LINB B e anti-CD171

Novamente foi realizado o teste de Dunett. Neste caso também não houve diferença estatística significante, sendo que os detalhes estão na tabela 17.

Tabela 17: Resumo da estatística descritiva da comparação entre o LINB B e o anti-CD171

	Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
	Anti-CD171	LINB B	Anti-CD171	LINB B
N	20	20	20	20
Média	11,203	11,699	41,196	40,538
Desvio padrão	8,422	8,461	31,152	26,020
Valor mínimo	0,35	1,0	4,22	9,35
Valor máximo	28,68	30,15	91,39	90,86
Mediana	11,285	11,81	23,050	23,50
Teste aplicado	Dunett		Dunett	
P value	p>0,05		p>0,05	
Resultado	Não significante		Não significante	

Quando realizado o teste de *scores*, também houve concordância com os anticorpos avaliados (tabela 18). Utilizando, novamente, os mesmos parâmetros de classificação, houve alta concordância entre os resultados obtidos entre o LINB B e anti-CD171, com 90% de concordância dos anticorpos em amostras de indivíduos normais e 80% em indivíduos com neoplasias hematológicas.

Tabela 18: Comparação do LINB B e anti-CD171 por *scores* de normalidade

		Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
Comercial	Produzido	N	Freq (%)	n	Freq (%)
Baixo	Baixo	9	45	1	5
Baixo	Normal	0	0	0	0
Baixo	Alto	0	0	0	0
Normal	Baixo	0	0	0	0
Normal	Normal	3	15	1	5
Normal	Alto	0	0	2	10
Alto	Baixo	0	0	0	0
Alto	Normal	2	10	1	5
Alto	Alto	6	30	15	75
Comercial = produzido		18	90 (C)	17	80 (C)
Comercial > produzido		2	10 (A)	1	5 (A)
Comercial < produzido		0	0 (A)	2	10 (A)

O coeficiente de correlação em indivíduos normais foi de 0,9726 e para indivíduos não sadios foi de 0,9895. A Figura 39 ilustra a segunda correlação.

Figura 39: Gráfico do teste de correlação entre LINB B e anti-CD171 em indivíduos com neoplasias hematológicas.

4.4 Comparação entre o LINB B e o anti-CD45RA

Neste teste de Dunnett houve diferença significativa para somente o grupo de indivíduos normais. Já no grupo de indivíduos com neoplasias não houve diferença significativa (tabela 19).

Tabela 19: Resumo da estatística descritiva da comparação entre o LINB B e o anti-CD45RA

	Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
	Anti-CD45RA	LINB B	Anti-CD45RA	LINB B
N	20	20	20	20
Média	39,126	11,699	47,557	40,538
Desvio padrão	16,635	8,461	26,03	26,020
Valor mínimo	0,88	1,0	12,39	9,35
Valor máximo	63,18	30,15	87,21	90,86
Mediana	40,95	11,81	46,95	23,50
Teste aplicado	Dunett		Dunett	
P value	P<0,01		p>0,05	
Resultado	Extremamente significativa		Não significativa	

Quando realizado o teste de *scores*, também houve discordância dos anticorpos avaliados (tabela 20). Com os mesmos parâmetros de classificação, houve alta discordância entre os resultados obtidos entre o LINB B e anti-CD45RA.

Tabela 20: Comparação do LINB B e anti-CD45RA por *scores* de normalidade

		Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
Comercial	Produzido	N	Freq (%)	n	Freq (%)
Baixo	Baixo	0	0	0	0
Baixo	Normal	0	0	0	0
Baixo	Alto	2	10	0	0
Normal	Baixo	0	0	0	0
Normal	Normal	0	0	2	10
Normal	Alto	0	0	1	5
Alto	Baixo	9	45	1	5
Alto	Normal	4	20	0	0
Alto	Alto	5	25	16	80
Comercial = produzido		5	25 (A)	18	90 (C)
Comercial > produzido		13	65 (B)	1	5 (A)
Comercial < produzido		2	10 (A)	1	5 (A)

O coeficiente de correlação em indivíduos normais foi de -0,2148 e para indivíduos não sadios foi de 0,5690. O a ilustração abaixo se refere à primeira correlação (Figura 40).

Figura 40: Gráfico do teste de correlação entre LINB B e anti-CD45RA em indivíduos normais.

4.5 Comparação entre LINB E e anti-CD107b

Para esta comparação não houve diferença estatisticamente significativa. A estatística descritiva dos resultados esta expressa na tabela 21.

Tabela 21: Resumo da estatística descritiva da comparação entre o LINB E e o anti-CD107b

	Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
	Anti-CD107b	LINB E	Anti-CD107b	LINB E
N	20	20	20	20
Média	7,25	7,38	36,74	44,59
Desvio padrão	5,48	7,21	28,46	29,90
Valor mínimo	0,83	0,48	3,88	3,16
Valor máximo	22,10	29,45	90,10	97,93
Mediana	5,38	4,69	22,95	39,03
Teste aplicado	Dunett		Dunett	
P value	p>0,05		p>0,05	
Resultado	Não significativa		Não significativa	

Para os testes de *scores*, (tabela 22), houve alta concordância entre os resultados obtidos entre o LINB E e anti-CD107b, com, novamente, 50% de concordância dos anticorpos em amostras de indivíduos normais e 75% em indivíduos com neoplasias hematológicas.

Tabela 22: Comparação do LINB E e anti-CD107b por *scores* de normalidade

		Indivíduos normais		Indivíduos com neoplasias	
Comercial	Produzido	N	Freq (%)	n	Freq (%)
Baixo	Baixo	9	45	0	0
Baixo	Normal	4	20	1	5
Baixo	Alto	1	5	1	5
Normal	Baixo	4	20	0	0
Normal	Normal	0	0	0	0
Normal	Alto	0	0	0	0
Alto	Baixo	1	5	0	0
Alto	Normal	0	0	1	5
Alto	Alto	1	5	17	75
Comercial = produzido		10	50 (B)	17	75
Comercial > produzido		5	25 (A)	1	5
Comercial < produzido		5	25 (A)	2	10

Para indivíduos normais o r foi de 0,6448 e os com neoplasias o r foi de 0,8617. Este último está demonstrado na ilustração abaixo (Figura 41).

Figura 41: Gráfico do teste de correlação entre LINB E e anti-CD107b em indivíduos normais.

Embora o LINB C tenha apresentado identidade estatística (concordância), apontando similaridade biológica, com o anti-CD19 e o anti-CD20 comerciais, resultado já esperado, pois a expressão de ambos os CDs ocorre na maioria das vezes de maneira qualitativamente uniforme, variando somente em determinadas patologias, o coeficiente de regressão linear (r) apontou uma maior tendência de se tratar de um anti-CD19. Os testes *in vivo* estão em andamento e os resultados serão apresentados *a posteriori*. O CD19 é uma proteína de 95 kDa, transmembrânica, que faz parte do complexo CD19/CD21/CD81/CD225, expresso somente em linfócitos B. Este complexo é responsável pela amplificação e modulação dos sinais recebidos pelo receptor BCR. Esta amplificação é essencial para ativação dos linfócitos B. O CD19 é um alvo freqüente em quase todas as leucemias de células B quando comparado ao CD20. Anticorpos monoclonais anti-CD19 possuem atividade de bloquear parcialmente a ativação das células B e a proliferação celular (CARTER e MYERS, 2008; MURPHY et al., 2008).

O LINB B apresentou identidade estatística (concordância), com similaridade biológica ao anti-CD171 em ambos os grupos testados. Já em comparação com anti-CD45RA, não houve diferença significativa quando comparado com o grupo de indivíduos com neoplasias, embora os testes de *score* apontaram discordância dos resultados e os coeficientes de correlação foram baixos, sendo um deles negativo. O CD171 (L1CAM) possui cerca de 200 kDa e também é uma proteína transmembrânica. Como o CD19, também faz parte da superfamília das Imunglobulinas. É uma molécula de adesão celular, principalmente expressas em neurônios. Embora suas principais funções conhecidas estejam ligadas a migração celular, sabe-se que é um marcador de superfície que sofre forte influência em neoplasias, estando associado a resistência a tratamentos. Em alguns tipos de câncer de cólon, a super-expressão da L1CAM é um indicador de mal prognóstico, já que pesquisas sugerem que este CD protege células da apoptose durante quimioterapia. Embora haja poucos estudos em neoplasias hematológicas, já se conhece vínculo direto com algumas patologias como Linfoma de *Mantle Cell* (GHOBRIAL et al., 2005; EK et al., 2002; OBRADOR-HEVIA et al., 2009).

O LINB E também apresentou identidade estatística (concordância) e similaridade biológica com o anti-CD107b, e os coeficiente de correlação apontaram à mesma tendência. CD107b é uma proteína de membrana associada ao lisossoma (LAMP-2), com 120 kDa. É uma glicoproteína que possui função de proteção, manutenção e adesão dos lisossomas. Sabe-se que possui efeito de proteção contra possíveis enzimas degradadoras de lisossomo, e

protege a membrana plasmática contra hidrólise. Em linfócitos, está conectada à adesão celular e migração pelos vasos. Em células diferenciadas, sugere-se que esta glicoproteína esteja relacionada à fusão de membrana com as vesículas celulares internas. De certa forma está relacionado à invasão tumoral com geração de metástases (NABI e BOULAN, 1993; CALRSSON e FUKUDA, 1990; SAFTIG et al., 2008).

Para os testes da imuno-histoquímica, escolheu-se os LINB F e G, possíveis anti-CD138. Os testes serão realizados e os resultados serão apresentados se possível na aula de defesa.

O CD138 possui grande variedade de pesos moleculares, podendo variar de 100 a 180 kDa. É uma proteoglicana transmembrana, que medeia ligação intracelular, sinalização celular (migração e proliferação), organização do citoesqueleto entre outros. Sua expressão está alterada quantitativamente em diversos tumores, e sua quantidade aumentada geralmente está associada a mau prognóstico. Na imuno-histoquímica se torna um problema já que é marcador de inúmeras patologias. A maior dificuldade é a marcação inespecífica de mielomas múltiplos e melanomas malignos, mas seu uso é extremamente necessário, pois é um dos melhores indicadores prognósticos para os mielomas múltiplos (KHOTSKAYA, 2009 (O'CONNELL et al., 2004).

Conclusões e Perspectivas

5. Conclusões

✓ Testes estatísticos foram conclusivos para o AcMm denominado LINB B que possui perfil superponível ao anti-CD171 comercial e para AcMm denominado LINB E que apresenta perfil fenotípico correspondente ao anti-CD107b comercial.

✓ Testes estatísticos evidenciam clara tendência do AcMm LINB C de identidade com o anti-CD19 comercial. No entanto, pela técnica de citometria de fluxo, frente ao número amostral, a validação não foi conclusiva.

✓ As padronizações das seguintes técnicas foram alcançadas com sucesso:

- Método de CBA
- Purificação em sistema semi-automatizado
- Concentração protéica em membrana de celulose regenerável
- Determinação de concentração por microdosagens
- Controle de monoclonalidade de IgM em gel de Ágar comercial
- Controle de purificação em SDS-PAGE
- Extrato de membrana por ultrasonicação
- *Western Blotting*

6. Perspectivas

Os clones validados devem ser incorporados em estudo multicêntrico para comprovar os resultados obtidos no centro produtor, aumentando a amostragem antes de se garantir registro e/ou patente do produto.

O número amostral dos testes de validação do LINB C deve ser aumentado a fim de se obter resultados estatísticos precisos. Este aumento amostral se refere a amostras de indivíduos com neoplasias hematológicas, já que a expressão do CD19 e do CD20 é similar nos linfócitos B normais.

Referências

7 Referências

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI S. Propriedades gerais da resposta imunológica. In: ABBAS, A.K. et al. (Eds) **Imunologia celular e molecular**, 6ª ed. Elsevier, 2008. p. 3-17.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI S. Anticorpos e antígenos In: ABBAS, A.K. et al. (Eds) **Imunologia celular e molecular**, 6ª ed. Elsevier, 2008. p. 75-96.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI S. Ativação da célula B e produção de anticorpos In: ABBAS, A.K. et al. (Eds) **Imunologia celular e molecular**, 6ª ed. Elsevier, 2008. p. 221-241.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN A.H.; PILLAI S. Desenvolvimento dos linfócitos e o rearranjo e expressão dos genes dos receptores de antígenos. In: ABBAS, A.K. et al. (Eds) **Imunologia celular e molecular**, 6ª ed. Elsevier, 2008. p. 153-187.
- ARICESCU, A.R.; JONES, Y.. Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, p.543-550, 2007.
- BARADARAN, B. et al. Large scale production and characterization of anti-human IgG monoclonal antibody in peritoneum of Balb/c mice. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.1, p. 189-192, 2005.
- BUBIEN, J.K. et al. Transfection of the CD20 Cell Surface Molecule into Ectopic Cell Types Generates a Ca Conductance Found Constitutively in B Lymphocytes. **The Journal of Cell Biology**, v.121, p. 1121-1132, 1993.
- BURMESTER, G.R.; PEZZUTTO A. **Color atlas of immunology**. Georg Thieme Verlag, 2003.
- CALRSSON, S.R., FUKUDA, M.. The Polylactosaminoglycans of Human Lysosomal Membrane Glycoproteins Lamp- 1 and Lamp-2. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v.265, p. 20488-20495, 1990.
- CARTER, R.H., MYERS, R.. Germinal center structure and function: Lessons from CD19. **Seminars in Immunology**, v.20, p. 43-48, 2008.

COOPER, M. D., ALDER, M. N.. The Evolution of Adaptive Immune Systems. **Cell**, v.124, p. 815-822, 2006.

EK, S. et al. Mantle Cell Lymphomas Express a Distinct Genetic Signature Affecting Lymphocyte Trafficking and Growth Regulation as Compared with Subpopulations of Normal Human B Cells. **CANCER RESEARCH**, v.62, p. 4398–4405, 2002.

FLAJNIK, M.F., KASAHARA, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. **Nature Reviews**, v.11, p. 47-59, 2010.

GHOBRIL, I.M. et al. Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray. **Blood**, v.105, p. 3722-3730, 2005.

GOLDSBY, R. A., et al. Visão geral do sistema imune. In: GOLDSBY, R. A., et al; **Kuby Imunologia**, 4ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2002, p. 3-26.

GOLDSBY, R. A., et al. Imunoglobulinas: estrutura e função. In: GOLDSBY, R. A., et al; **Kuby Imunologia**, 4ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2002, p. 83-114.

GOLDSBY, R. A., et al. Geração, ativação e diferenciação da célula B. In: GOLDSBY, R. A., et al; **Kuby Imunologia**, 4ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2002, p. 269-300.

GOLDSBY, R. A., et al. Organização e expressão dos genes das imunoglobulinas.. In: GOLDSBY, R. A., et al; **Kuby Imunologia**, 4ª ed. Livraria e Editora Revinter Ltda, 2002, p. 115-148.

GOLIM, M.A. et al. **Obtenção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos da superfície de linfócitos B humanos para aplicações diagnósticas e terapêuticas**. 2009, 109 f., Doutorado em Clínica Médica, UNESP, Botucatu.

HARWOOD, N.E.; BATISTA, F.D. Early Events in B Cell Activation. **The Annual Review of Immunology**, v.28, p. 185-210, 2010.

JUNG, D., et al. Mechanism and Control of V(D)J Recombination at the Immunoglobulin Heavy Chain Locus. **The Annual Review of Immunology**, v.24, p. 541-570, 2006.

KHOTSKAYA, Y.B. et al. Syndecan-1 Is Required for Robust Growth, Vascularization, and Metastasis of Myeloma Tumors in Vivo. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v.294, p. 26085–26095, 2009.

KLEIN, U., DALLA-FAVERA, R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. **Nature**, v.8, p. 22-34, 2008.

KOHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p. 495-497, 1975.

LEBIEN, T.W., TEDDER, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v.112, p. 1570-1580, 2008.

MAIZELS, N. Immunoglobulin Gene Diversification. **The Annual Review of Genetics**. v.19, p. 23-46, 2005.

MARTENSSON, I.L., et al. The pre-B-cell receptor. **Current Opinion in Immunology**, v.19, p. 137-142, 2007.

MARTIN, F., CHAN, A.C. B Cell Immunobiology in Disease: Evolving Concepts from the Clinic. **The Annual Review of Immunology**, v.24, p. 467-496, 2006.

MCCULLOUGH, K. C., SPIER, R. E. Introduction: the immune response. In: MCCULLOUGH, K. C. et al. **Monoclonal Antibodies in Biotechnology: Theoretical and Practical Aspects**, Cambridge University Press 1990.

MURPHY, K., et al. Basic concepts in immunology In: MURPHY, K., et al. **Janeway's Immunobiology**, 7^a ed., Garland Science, 2008, p.1-38.

MURPHY, K., et al. Development of B lymphocytes. In: MURPHY, K., et al. **Janeway's Immunobiology**, 7^a ed., Garland Science, 2008, p.259-271.

MURPHY, K., et al. Primary immunoglobulin gene rearrangement. In: MURPHY, K., et al. **Janeway's Immunobiology**, 7^a ed., Garland Science, 2008, p.143-154.

MURPHY, K., et al. The structure of a typical antibody molecule. In: MURPHY, K., et al. **Janeway's Immunobiology**, 7^a ed., Garland Science, 2008, p.111-117.

NABI, I.R., BOULAN, E.R.. Increased LAMP-2 Polylactosamine Glycosylation Is Associated with Its Slower Golgi Transit During Establishment of a Polarized MDCK Epithelial Monolayer. **Molecular Biology of the Cell**, v.4, p.627-635, 1993.

O'CONNELL, F.P., et al. CD138 (Syndecan-1), a Plasma Cell Marker. **American Journal of Clinicial Pathology**, v.121, p. 254-263, 2004.

OBRADOR-HEVIA, A., et al. Molecular biology of mantle cell lymphoma: From profiling studies to new therapeutic strategies. **Blood Reviews**, v.23, p. 205-216, 2009.

PARKIN, J., COHEN, B. An overview of the immune system. **The Lancet**, v.357,p.1777-1789, 2007.

POLYAK, M.J., et al. CD20 Homo-oligomers Physically Associate with the B Cell Antigen Receptor. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v.283, p. 18545-18552, 2008.

POLYAK, M.J., AYER, L.M., et al. A cholesterol-dependent CD20 epitope detected by the FMC7 antibody. **Leukemia**, v.17, p. 1384-1389, 2003.

RASMUSSEN, S.K., et al. Manufacture of recombinant polyclonal antibodies. **Biotechnology Letters**, v.29, p: 845-852, 2007.

REICHERT, J., PAVLOU, A. Monoclonal antibodies market. **Nature Reviews: Drug discovery**, v.3, p. 383-384, 2004.

ROLINK, A.G. et al. Selection events operating at various stages in B cell development. **Current Opinion in Immunology**, v.13, p. 202-207, 2001.

SAFTIG, P., et al. LAMP-2. **Autophagy**, v.4, p. 510-512, 2008.

SODRÉ, L.P. **Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 obtido in house para utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica**. 2009, 60 f., Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) - UNESP, Botucatu.

TENG, G., PAPAVALIOU, F.N. Immunoglobulin Somatic Hypermutation. **The Annual Review of Genetics**, v.41, p. 107-120, 2007.

TOLOSA, J.M., et al. Column-based method to simultaneously extract DNA, RNA, and proteins from the sample. **BioTechniques**, v.43, p. 799-804, 2007.

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos de metacestóides de *Taenia saginata***. 2009, 103 f. Mestrado - UNESP, Botucatu.

WANG, H., CLARKE, S.H. Regulation of B-cell development by antibody specificity. **Current Opinion in Immunology**, v.16, p. 246-250, 2004.

WANG, W. et al. Antibody Structure, Instability, and Formulation. **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v.96, p. 1-26, 2007.

YOUINOU, P. B cell conducts the lymphocyte orchestra. **Journal of Autoimmunity**, v.28, p. 143-151, 2007.

ZOLA, H. "aking and using conventional mouse monoclonal antibodies. In: ZOLA, H. **Monoclonal Antibodies: The Sencond Generation**, BIOS Scientific Publishers LTDA., 1995, p.1-14.

ZOLA, H., et al. CD molecules 2006 — Human cell differentiation molecules. **Journal of Immunological Methods**, v.319, p.: 1-5, 2007.