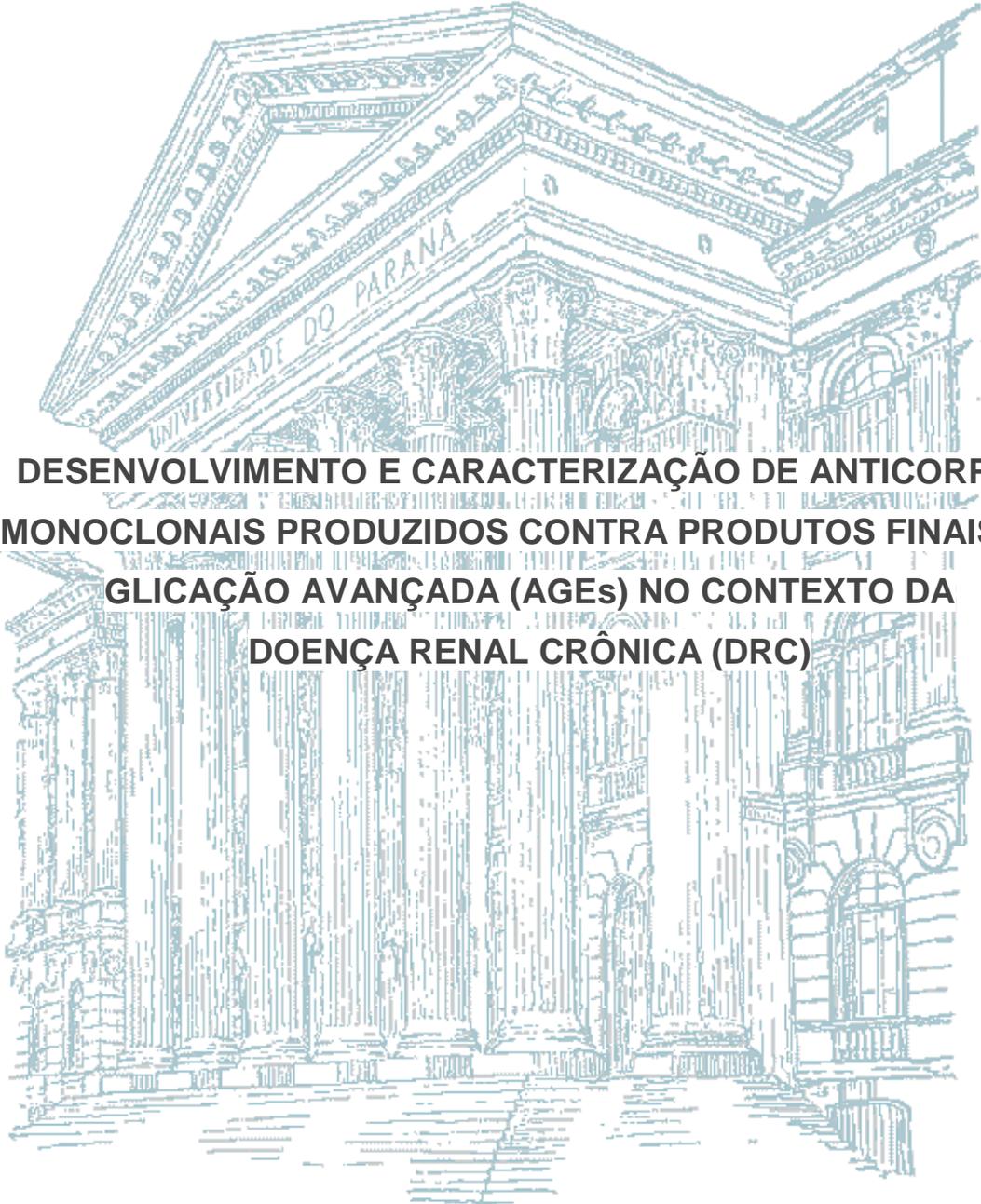


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

ALESSANDRA BECKER FINCO



**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA PRODUTOS FINAIS DE  
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) NO CONTEXTO DA  
DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)**

CURITIBA  
2016

**ALESSANDRA BECKER FINCO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA PRODUTOS FINAIS DE  
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs) NO CONTEXTO DA  
DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Área de Concentração: Patologia. Departamento de Patologia Básica. Setor de Ciências Biológicas do Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Larissa M. Alvarenga  
**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Andrea E. M. Stinghen  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Juliana F. de Moura

CURITIBA  
2016



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

**“DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS  
MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA PRODUTOS FINAIS DE  
GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES) NO CONTEXTO DA DOENÇA RENAL  
CRÔNICA (DRC)”**

por

**ALESSANDRA BECKER FINCO**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Magalhães Alvarenga - Presidente**

**Prof. Dr. Felipe Barreto**

**Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade**

**Prof. Dr. Glaucio Valdameri**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Giseli Klassen**

**Curitiba, 08 de abril de 2016.**

## **AGRADECIMENTOS**

À coordenação da pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná.

À minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Magalhães Alvarenga pela oportunidade concedida, pelo exemplo de pessoa, de pesquisadora, pelo seu tempo dedicado ao meu aprendizado, por acreditar em mim. Ao longo desses oito anos trabalhando ao seu lado eu aprendi a fazer ciência

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Andrea Stinghen pela sua dedicação, orientação, amizade, por estar sempre disponível me orientando, direcionando, tirando dúvidas. Obrigada pelo seu exemplo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana de Moura uma pessoa que eu tenho um carinho enorme, admiro pelo seu jeito leve de ser, admiro suas idéias, obrigada por estar sempre acessível.

Ao Prof<sup>a</sup>. Dr. Marcel Ramirez pela sua conduta acadêmica, pelo seu caráter, por me instigar a questionar, a pensar, a querer ser e fazer tudo melhor, por me incentivar a querer continuar pesquisando.

As lindas do laboratório de Imunoquímica, minhas amigas Sabrina, Rafaela, Carla, Isabel, Michele e não poderia faltar é claro Maíra pessoas maravilhosas, com o coração do tamanho do mundo sempre ao meu lado, vocês fazem com que os dias de trabalho sejam muito mais divertidos. Nossas conversas, cafés e chás no corredor do departamento serão lembrados para sempre.

Ao meu namorado pela paciência e dedicação, por fazer parte dessa jornada tão importante na minha vida, por trabalhar muitos sábados e domingos comigo enfim por estar sempre ao meu lado, você é muito especial.

À minha família maravilhosa, sem eles eu não estaria aqui. Especialmente aos meus pais pelo grande amor por mim demonstrado das mais diversas maneiras. A minha irmã e melhor amiga pelo apoio, parceria, carinho e por sempre estar disponível quando precisei.

Em especial, à minha filha Luana que me dá forças para seguir em frente e não desanimar nem desistir nunca.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a atingir este objetivo.

**MUITO OBRIGADA A TODOS!!!!**

## RESUMO

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são um grupo heterogêneo de moléculas que se acumulam no plasma e tecidos em diversas condições clínicas, tais como envelhecimento, diabetes e falência renal. Evidências crescentes apontam tais moléculas como toxinas urêmicas as quais são efetoras no processo fisiopatológico de complicações vasculares e renais, em virtude de sua capacidade de modificar de forma irreversível as propriedades químicas e funcionais de uma série de moléculas, entre elas as proteínas. Existem atualmente mais de 20 tipos de AGEs descritos, metilglioxal, N-carboximetilisina (CML) e pentosidina os melhores caracterizados até o momento, e que servem como marcadores de acúmulo de AGEs em uma ampla gama de tecidos, sendo a CML o domínio antigênico mais abundante e melhor caracterizado. O presente estudo teve como objetivo produzir e caracterizar anticorpos monoclonais anti-CML para uso na confecção de ensaios que possam detectar e quantificar essa toxina em fluídos biológicos e aplicação desta ferramenta no entendimento das vias de sinalização envolvidas com a progressão da Doença Renal Crônica (DRC). Para tanto, três diferentes moléculas protéicas carreadoras foram modificadas por glicação: hemocianina de molusco (KLH), soro albumina bovina (BSA) e soro albumina humana (HSA); caracterizadas por eletroforese e espectrometria de massa. As moléculas glicadas foram usadas como imunógenos em camundongos Balb-c para produzir anticorpos policlonais e monoclonais epítipo-específico capazes de reconhecerem o domínio CML. Sete clones e quatorze subclones foram obtidos e testados frente ao CML e respectivos controles. Dentre os subclones, o anticorpo monoclonal mAb 2D6G2, foi selecionado com base nos ensaios de especificidade para melhor caracterização e empregado na detecção de CML. Para validação dos anticorpos produzidos foram utilizados soros de pacientes em diferentes estágios de DRC. Posteriormente, diferentes condições como variação nas concentrações de antígenos, anticorpos e diluições dos soros foram avaliadas a fim de padronizar um teste de ELISA competitivo capaz de detectar e quantificar CML em soro. Os resultados obtidos permitiram correlacionar concentração de CML nos soros com os diferentes estágios da doença. Além disso, o mAb 2D6G2, foi empregado em ensaios *in vitro* em células THP-1 com intuito de avaliar a interação de CML-HSA no ambiente celular. Nossos resultados demonstram a eficiência do anticorpo produzido, e abrem novas perspectivas para o emprego de tais anticorpos como bioferramenta na detecção, quantificação e entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na toxicidade urêmica relacionada a DRC.

**Palavras chave:** Doença renal crônica, toxinas urêmicas, AGEs, CML, anticorpo monoclonal.

## ABSTRACT

The advanced glycation end products (AGEs) are a heterogeneous group of molecules that accumulate in the plasma and tissues in several clinical conditions such as aging, diabetes and renal failure. These molecules have been shown to act as uremic toxins and effectors in the pathophysiological vascular damage and renal complications, because of their ability to modify irreversibly chemical and functional properties of a number of molecules, among them proteins. Currently over 20 types of AGEs are described, including: methylglyoxal, N-carboxymethyllysine (CML) and, pentosidine, and they function as AGEs accumulation biomarkers widely used in several tissues, being CML the major antigenic domain. This work aimed the production and characterization anti-CML monoclonal antibodies for detection and quantification of this toxin in biological fluids. In addition this antibody may be used as a tool to investigate the signaling pathways involved in the CKD progression. Thus, three carrier proteins were modified by glycation: keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) and human serum albumin (HSA); characterized by gel electrophoresis and mass spectrometry. The glycated molecules were used in Balb-c as immunogens to have the production of epitope-specific polyclonal and monoclonal antibodies able to recognize CML. Fourteen hybridomas were obtained and tested against CML and their respective controls. Among the hybridomas, mAb 2D6G2 was selected based on specificity assays and employed for further CML toxin characterization and detection. Analysis of serum sample from patients who presented different CKD stages were used for validation of home-made antibody. Furthermore, different conditions of antigens and antibodies concentrations, and serum dilutions were evaluated to standardize a ELISA competitive test capable to detect and measure serum CML. The results allowed to correlate CML concentration in serum samples with the different CKD stages. Besides, mAb 2D6G2 was employed *in vitro* in order to assess CML-HSA interaction with THP-1 cells. These results demonstrate the efficiency of the antibody mAb 2D6G2, and our data open new avenues for the use antibodies as tools in the detection, quantification and understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in uremic toxicity related to CKD.

**Key words:** chronic kidney disease, uremic toxins, AGEs, CML, monoclonal antibody.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Processo de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)	22
<b>Figura 2.</b> Receptores multiligantes de AGE	23
<b>Figura 3.</b> Esquema da síntese de CML-proteína	29
<b>Figura 4.</b> Caracterização das proteínas modificadas	39
<b>Figura 5.</b> Reatividade dos anticorpos policlonais por ELISA	41
<b>Figura 6.</b> Principais etapas da produção de anticorpos monoclonais	42
<b>Figura 7.</b> Reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas por ELISA	43
<b>Figura 8.</b> Reatividade dos anticorpos monoclonais por ELISA	44
<b>Figura 9.</b> Especificidade do mAb 2D6G2 contra CML-proteína	45
<b>Figura 10.</b> Otimização dos parâmetros para o método de ELISA competitivo	47
<b>Figura 11.</b> Detecção de CML-HSA sintetizado por ELISA competitivo utilizando mAb 2D6G2	48
<b>Figura 12.</b> Curva correlacionando inibição e concentração de HSA-CML	50
<b>Figura 13.</b> Detecção da CML em soro de paciente DRC	51
<b>Figura 14.</b> Detecção de CML-HSA e relação com achados clínicos	51
<b>Figura 15.</b> Clonagem de cDNA que codifica os domínios variáveis do anticorpo mAb2D6G2	53
<b>Figura 16.</b> Avaliação de CML-HSA em células THP-1	55
<b>Figura 17.</b> Quantificação da detecção CML-HSA em células THP-1 através da intensidade de fluorescência	56

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Categorias de albuminúria na DRC segundo National Kidney Foundation, 2012.	17
Quadro 2 - Avaliação de risco da progressão da DRC baseada na TFG e Albuminúria.	18

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento da DRC de acordo com a TFG segundo <i>National Kidney Foundation</i> , 2012.	17
Tabela 2 - Classificação dos solutos de retenção urêmica.	20
Tabela 3 - Características clínicas da população estudada.	38
Tabela 4 - Descrição das amostras.	49
Tabela 5 - Características clínicas da população estudada.	52

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
2.1 Doença Renal Crônica (DRC)	15
2.2 Toxinas Urêmicas	19
2.3. AGEs	20
2.4 Detecção de AGEs	24
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1 Pacientes	28
4.2 Animais	28
4.3 Síntese CML-proteína	29
4.4 Caracterização de CML-proteína	29
4.5 Desenvolvimento de anticorpos murinos anti-CML	30
4.6 Obtenção dos hibridomas	30
4.7 Seleção e clonagem dos hibridomas	31
4.8 Análise de cDNA	32
4.9 Protocolos de ELISA	33
4.9.1 ELISA Formato Direto	33
4.9.2 ELISA Formato competitivo	34
4.10 Avaliação da interação de CML-HSA em células THP-1	35
4.10.1 Célula THP-1	35
4.10.2 Ensaio de viabilidade pelo método de exclusão com Trypan	35
4.10.3 Tratamento de THP-1 com CML-HSA e Imunofluorescência	35
4.11 Análise Estatística	37
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>38</b>

5.1 Produção e Caracterização de CML-proteína	38
5.2 Produção e Caracterização de anticorpos policlonais	40
5.3 Caracterização e Caracterização de anticorpos monoclonais	41
5.4 Padronização do ELISA de competição	45
5.4.1 Caracterização do mAb 2D6G2 frente aos soros de pacientes com DRC	47
5.5 Análise de cDNA dos domínios VH e VL do mAb 2D6G2	52
5.6 Avaliação da interação de CML-HSA com células THP-1	53
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>64</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda gradual da função renal ao longo do tempo, atualmente considerado como um dos mais importantes problemas médicos de saúde. Casos de DRC estão crescendo exponencialmente, e, juntamente com outras doenças crônicas não transmissíveis, são responsáveis por milhões de mortes ao ano (El Nahas, 2010; De Lima *et al.*, 2012). A DRC é classicamente definida pela presença de lesão do parênquima renal e/ou diminuição da função renal, durante um período igual ou superior a três meses, e proteinúria. Esta definição permite a classificação de DRC em cinco estágios: estágio 1 é o menos severo, com uma taxa de filtração glomerular (TFG)  $\geq 90$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, e estágio 5 é a mais grave, com um valor de TFG  $<15$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (ou diálise) (Bowling e Muntner, 2012). Como consequência na alteração da TFG, ocorre retenção progressiva de um grande número de componentes, que, normalmente, seriam eliminados pelos rins em condições saudáveis. O aumento da presença destas moléculas e seus efeitos patológicos no organismo permitem designá-las como toxinas urêmicas. O acúmulo dessas toxinas na circulação caracteriza a síndrome urêmica (Vanholder *et al.*, 2003).

Já foram descritos mais de 150 compostos urêmicos. Dentre estas toxinas, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são algumas das principais substâncias envolvidas em diversos processos fisiopatológicos, tais como lesões vasculares e toxicidade em glóbulos brancos e plaquetas (Vanholder *et al.*, 2003; Vanholder *et al.*, 2008). Os AGEs representam um grupo heterogêneo de substâncias formadas a partir de interações amino-carbonilo não-enzimáticas entre os açúcares redutores ou lipídios oxidados e proteínas, fosfolípidos, aminoácidos ou ácidos nucleicos (Stinghen *et al.*, 2016). Durante a formação dos AGEs, diferentes estruturas são formadas, incluindo carboxietilislina (CEL), imidazolona, pentosidina, pirralina, carboximetilcelulose e carboximetilislina (CML). No entanto, a modificação CML é a mais abundante que ocorre por glicação de proteínas (Ahmed, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que a formação de CML ocorre durante o envelhecimento, no estresse oxidativo e na patogênese de doenças tais como a nefropatia diabética, aterosclerose, retinopatia diabética, amiloidose associada à hemodiálise, doença de Alzheimer e disfunções no remodelamento óssea (Vanholder *et al.*, 2008; Won *et al.*, 2012; Vlassara e Striker, 2013). Na DRC, os níveis de AGEs

estão significativamente aumentados, não só devido ao aumento de sua produção, mas também em virtude da diminuição da excreção (Vanholder *et al.*, 2003).

No entanto, estas moléculas não são frequentemente detectadas, exceto a hemoglobina glicada (HbA1c), a qual é quantificada em pacientes com diabetes *mellitus* (Jaisson e Gillery, 2010). Desta forma, uma análise das propriedades bioquímicas e imunológicas dos AGEs pode fornecer informações importantes sobre estes biomarcadores. Atualmente, não existe nenhum exame de referência para dosar AGEs, assim torna-se necessário o desenvolvimento de ferramenta específica e sensível para a detecção e quantificação de AGEs e seu emprego no diagnóstico, para o melhor entendimento dos diferentes processos, aos quais essas moléculas estão envolvidas, como também auxiliar os pacientes com tratamentos mais apropriados (Nagai *et al.*, 2014).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doença Renal Crônica (DRC)

Os rins têm múltiplas funções, como a excreção de produtos finais de diversos metabolismos, produção de hormônios, controle do equilíbrio hidroeletrolítico, do metabolismo ácido-básico e da pressão arterial. Assim, não é surpresa constatar que, a diminuição progressiva da função renal, implique em comprometimento de essencialmente todos os outros órgãos (Bastos *et al.*, 2010).

Como consequência à algum tipo de injúria renal como diabetes, hipertensão arterial, glomerulonefrites, rins policísticos, ocorre a perda das unidades funcionais dos rins, denominadas néfrons. Os néfrons que continuam ativos são capazes de aumentar em muitas vezes sua capacidade funcional, garantindo a estabilidade do organismo (Hughson *et al.*, 2003). Entretanto, mesmo com este mecanismo de adaptação, pacientes com doença renal crônica tendem a evoluir para uma perda progressiva do funcionamento renal (Metcalf, 2007). A perda dos néfrons desencadeia uma hipertensão glomerular a qual provoca lesão de células endoteliais, estiramento e lesão de podócitos e das células mesangiais bem como proteinúria e extravasamento do filtrado glomerular para o interstício renal através de regiões de ruptura do glomérulo. Esses eventos ativam a liberação de citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, além de promoverem o recrutamento e proliferação de células inflamatórias culminando numa reação inflamatória que destrói o néfron, substituindo os tecidos originais por fibrose. Resumidamente, a lesão inicial leva à redução do número de néfrons e hipertensão intraglomerular, aumento da permeabilidade glomerular, liberação de uma série de mediadores químicos que perpetuam a lesão levando a fibrogenese e cicatrizes renais, ocorrendo progressão da doença renal crônica até perda total do funcionamento renal (Ruggenenti *et al.*, 2001; Venkatachalam *et al.*, 2010).

Existem diversas formas de aferir o funcionamento dos rins, mas a excreção é aquela que tem maior correlação com os desfechos clínicos. Essa função renal é avaliada pela filtração glomerular (FG) e a sua diminuição é observada na Doença Renal Crônica (DRC), associada à perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas do rim (Baillie e Johnson, 2002; Kirsztajn *et al.*, 2009). A DRC acomete a estrutura e função dos rins, tendo apresentação clínica variável a depender da causa,

severidade e velocidade de progressão da doença. A definição clássica de DRC tem como critérios: diminuição do ritmo de filtração glomerular  $\leq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  e/ou presença de marcadores de dano estrutural renal por um período superior a três meses. Para o diagnóstico da DRC são analisados um ou mais marcadores de lesão estrutural (albuminúria, anormalidades do sedimento urinário, anormalidades eletrolíticas, anormalidades detectadas por biópsia renal, anormalidades estruturais detectadas por exame de imagem e história de transplante renal) associados a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) (Foundation, 2002; 2012)

A lesão renal pode ser estabelecida no parênquima, nos vasos sanguíneos ou sistema coletor. A albuminúria é um marcador de lesão renal devido ao aumento de permeabilidade glomerular à albumina. Anormalidades no sedimento urinário são expressas por presença anormal de hemácias, leucócitos, cilindros e microrganismos no sedimento urinário. Anormalidades estruturais podem ainda ser detectadas por exames de imagem como ultrassonografia, tomografia computadorizada e arteriografia renal. Já a diminuição na TFG pode ser avaliada pelo *clearance* de creatinina dosado em urina de 24 horas ou estimado por fórmulas como as desenvolvidas nos estudos *Modification of Diet in Renal Disease Study* (MDRD) (Levey *et al.*, 1999; Levey *et al.*, 2006) e *Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (Levey *et al.*, 2009). Estas fórmulas baseiam-se em dados como a creatinina, idade, sexo e etnia. Assim, a DRC é definida pela lesão do parênquima renal (com função renal normal) e/ou pela diminuição funcional renal presentes por um período igual ou superior a três meses. Com base nesta definição, foi proposta a classificação para a DRC (Foundation, 2012). Primeiramente foi proposta a divisão dos estágios TFG de acordo com a sua diminuição conforme Tabela 1 (Inker *et al.*, 2014).

É muito importante entender que com a diminuição da TFG, aumenta a prevalência de complicações associadas, principalmente cardiovasculares (piora da hipertensão arterial, aterosclerose acelerada, insuficiência coronariana, etc.) endócrinas (anemia devido à deficiência de eritropoietina, distúrbio no metabolismo mineral e ósseo, etc.), desnutrição, neuropatia e piora da qualidade de vida (Foundation, 2002).

**Tabela 1** - Estadiamento da DRC de acordo com a TFG segundo *National Kidney Foundation*, 2012.

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Taxa de Filtração Glomerular (mL/min/1.73 m<sup>2</sup>)</b>
G1	Normal ou alto	≥90
G2	Levemente diminuída	60-89
G3a	Leve a moderadamente diminuída	45-59
G3b	Moderada a severamente diminuída	30-44
G4	Severamente diminuída	15-29
G5	Falência renal	<15

FONTE: Adaptado de National Kidney Foundation, 2012.

Outra importante categorização é da albuminúria, pois quanto maior a albuminúria pior a progressão da DRC, independente da TFG, Quadro 1 (Astor e Bhavsar, 2011; Gansevoort *et al.*, 2011).

**Quadro 1** - Categorias de albuminúria na DRC segundo *National Kidney Foundation*, 2012.

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>	<b>Taxa de excreção de albumina (mg/24h)</b>	<b>Razão albumina creatinina (mg/g)</b>
A1	Normal ou levemente aumentada	>30	>30
A2	Moderadamente aumentada	30-300	30-300
A3	Severamente aumentada	>300	>300

FONTE: Adaptado de National Kidney Foundation, 2012.

Para o estadiamento e melhor entendimento da progressão da DRC foi estabelecido um quadro correlacionando a TFG e Albuminúria, Quadro 2 (Inker *et al.*, 2014).

**Quadro 2** - Avaliação de risco da progressão da DRC baseada na TFG e Albuminúria. São 5 estágios de acordo com a taxa de filtração glomerular e 3 estágios de acordo com a albuminúria.

				Categorias de albuminúria		
				A1	A2	A3
				Normal Ligeiramente aumentada	Moderadamente aumentada	Gravemente aumentada
				>30mg/dia	30-300mg/dia	>300mg/dia
Taxa de Filtração Glomerular (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	G1	Normal ou alta	≥90	Baixo risco	Risco moderadamente aumentado	Risco alto
	G2	Levemente diminuída	60-89	Baixo risco	Risco moderadamente aumentado	Risco alto
	G3a	Levemente a moderadamente diminuída	45-59	Risco moderadamente aumentado	Risco alto	Risco muito alto
	G3b	Moderadamente a gravemente diminuída	30-44	Risco alto	Risco muito alto	Risco muito alto
	G4	Gravemente diminuída	15-29	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto
	G5	Insuficiência renal	<15	Risco muito alto	Risco muito alto	Risco muito alto

FONTE: Adaptado de National Kidney Foundation, 2012.

A albuminúria é muito importante no estadiamento da DRC pois, mesmo em pacientes com ritmo de filtração glomerular normal, o risco de progressão da doença renal é de moderado a alto quando a albuminúria está elevada. A nova definição da doença renal crônica (DRC), em uso desde 2002 e revista em 2012, propiciou um estadiamento da doença e avaliação da progressão muito mais precisos. A partir desta nova abordagem, ficou evidente que a DRC é muito mais frequente do que até então se considerava e sua evolução clínica está associada a altas taxas de morbimortalidade (Foundation, 2002; 2012).

A doença renal crônica é um problema de saúde pública em todo o mundo que afeta milhões de pessoas pertencentes a todos os grupos étnicos e raciais. Estima-se que um em cada cinco homens e uma em cada quatro mulheres com idade entre 65 e 74 anos, sendo que metade da população com 75 anos ou mais sofrem algum grau da doença. Segundo avaliado pelo *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) aproximadamente 13% da população adulta nos EUA apresenta algum grau de perda de função renal (Coresh *et al.*, 2003). Um dos principais desfechos relacionados a DRC é a perda da função renal levando muitos

pacientes à DRC terminal (DRCT) (National Kidney Foundation, 2002). Esses pacientes certamente necessitam de algum tipo de terapia renal substitutiva (TRS), sendo as modalidades disponíveis: a hemodiálise, a diálise peritoneal e o transplante renal. Diversos estudos estimavam que no início desta década existiriam cerca de 2 milhões de pessoas em TRS em todo o mundo (Xue *et al.*, 2001), entretanto esse número vem aumentando de maneira muito mais expressiva do que o esperado nos países em desenvolvimento (Hamer e El Nahas, 2006). A taxa de prevalência de pacientes em TRS é de 1.000 pacientes por milhão de pessoa (pmp) em países da Europa, no Chile e Uruguai, e de 1.750 pmp nos EUA. De acordo com o Censo Brasileiro de Diálise publicado em 2013 o número de pacientes com DRCT no Brasil praticamente duplicou na última década, passando de 42.695 em 2000 para 91.314 em 2011 (Oliveira *et al.*, 2005; Sesso *et al.*, 2011), com mais de 28.000 novos pacientes ao ano iniciando TRS.

## 2.2 Toxinas Urêmicas

Com a progressão da doença, além das alterações hidro-eletrolíticas, ácido-básicas e hormonais, ocorre também uma retenção progressiva de solutos. Muitos desses solutos exercem efeitos tóxicos em vários órgãos e sistemas. Tais solutos são então denominados toxinas urêmicas. O acúmulo destas “toxinas urêmicas” é responsável por muitas das consequências clínicas de uma condição conhecida como uremia (Glasscock, 2008; Himmelfarb, 2009). Entre os principais efeitos biológicos tóxicos da uremia na DRC estão: anemia, disfunção imune, osteodistrofia renal, hiperparatireoidismo, resistência insulínica, mal nutrição, inflamação, desordens de coagulação, atrofia dérmica, polineurite, falência cardíaca, anorexia, pericardite, hipertensão e doença cardiovascular (Vanholder *et al.*, 2008). A uremia ou síndrome urêmica é caracterizada pela retenção progressiva de um grande número de componentes que em condições saudáveis devem ser eliminadas pelos rins. A presença aumentada dessas moléculas e sua intervenção negativa em processos biológicos as caracterizam como toxinas urêmicas (Vanholder *et al.*, 2003).

É importante entender que para essas moléculas serem consideradas toxinas urêmicas elas precisam apresentar uma relação de toxicidade de maneira direta ou indireta com algum evento fisiopatológico ou clínico. Para estabelecer esta relação é necessário que a molécula apresente algumas características: devem ser quimicamente identificadas e caracterizadas; possível quantificação em fluidos corporais; exibir nível aumentado na uremia; apresentar relação entre o nível da

toxina nos fluidos corporais e um ou mais sintomas da uremia; redução dos níveis corporais da toxina quando houver melhora no quadro urêmico do paciente e a administração da toxina em modelo animal, em níveis semelhantes àqueles encontrados na uremia deve reproduzir a manifestação urêmica (Massry, 1977; Glasscock, 2008).

Atualmente já se têm descritos mais de 150 compostos urêmicos. Esses compostos são classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas e características de remoção por diálise, conforme a Tabela 2 (Vanholder *et al.*, 2003; Vanholder e Glorieux, 2014).

**Tabela 2 - Classificação dos solutos de retenção urêmica.**

<b>Classificação</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplo</b>
Moléculas pequenas solúveis em água	*MW <500 Da, facilmente removidas por diálise	Ureia, Creatinina
Moléculas Médias	*MW > 500 Da, removidas apenas por membranas com poros largos.	$\beta_2$ -Microglobulina, Leptina Produtos finais de glicação avançada (AGEs)
Moléculas ligadas a proteínas	Qualquer *MW, difícil remoção em qualquer membrana	Fenóis, indóis

FONTE: Adaptado Vanholder *et al.*, 2008. \*MW massa molecular.

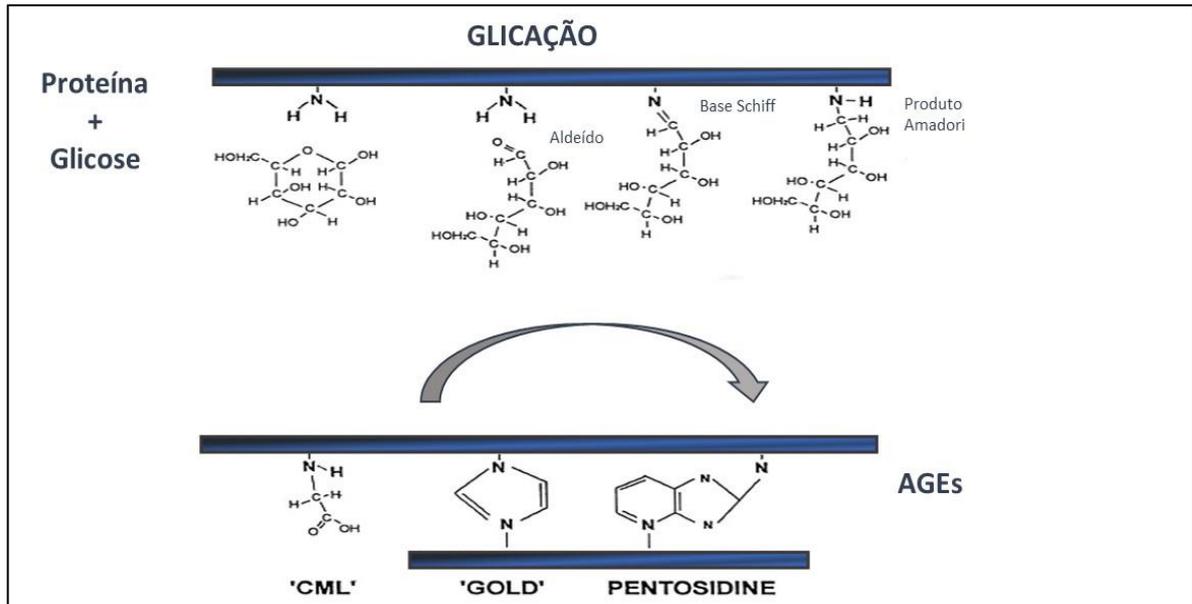
Entre essas toxinas os produtos finais de glicação avançada (AGEs do inglês, *Advanced Glycation End-products*) classificados como moléculas médias, apresentam características de difícil remoção por diálise e vêm ganhando atenção especial de muitos pesquisadores, pois são descritos como um dos principais compostos envolvidos com diversas atividades tóxicas no organismo (associadas a lesões vasculares, afetando leucócitos, plaquetas entre outros) (Vanholder *et al.*, 2003; Vanholder *et al.*, 2008).

### **2.3. AGEs**

Os AGEs constituem uma classe de toxinas urêmicas bastante heterogênea formada a partir de interações amino carbonilo, de natureza não-enzimática denominada glicação. A glicação envolve a adição de açúcares redutores e/ou seus produtos reativos de degradação a grupamentos amina das proteína. (Hegab *et al.*, 2012). Este processo é promovido pela presença de concentrações elevadas de

glicose e ocorre com várias proteínas que incluem principalmente albumina do soro humano (HSA). A albumina sérica é uma proteína altamente sensível a glicação devido ao seu tempo longo de meia-vida, em comparação com outras proteínas (cerca de 21 dias), e a sua elevada concentração. No entanto, outras proteínas circulantes, incluindo hemoglobina, insulina e imunoglobulinas também são afetados pela glicação. Além disso, a glicação é um processo que afeta proteínas de meia-vida longa da matriz extracelular tais como colágeno, laminina e fibronectina (Schwedler *et al.*, 2001; Semba *et al.*, 2012).

A via clássica da reação de glicação, inicia-se com a formação da base de Schiff instável, gerada pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor, como a glicose, com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina, composto especialmente suscetível à reação. Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de Amadori, conhecido como produtos iniciais da reação de Maillard (*early* MRPs). Os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primárias acessíveis, dando origem aos produtos avançados da reação de Maillard – AGEs (Bierhaus *et al.*, 1998; Ahmed, 2005). Durante a formação de AGEs, diferentes estruturas são formados, incluindo carboxietilisina (CEL), imidazolona, pentosidina, pirralina, carboximetilcelulose e carboximetillisina (CML) (Figura 1) (Ahmed, 2005).

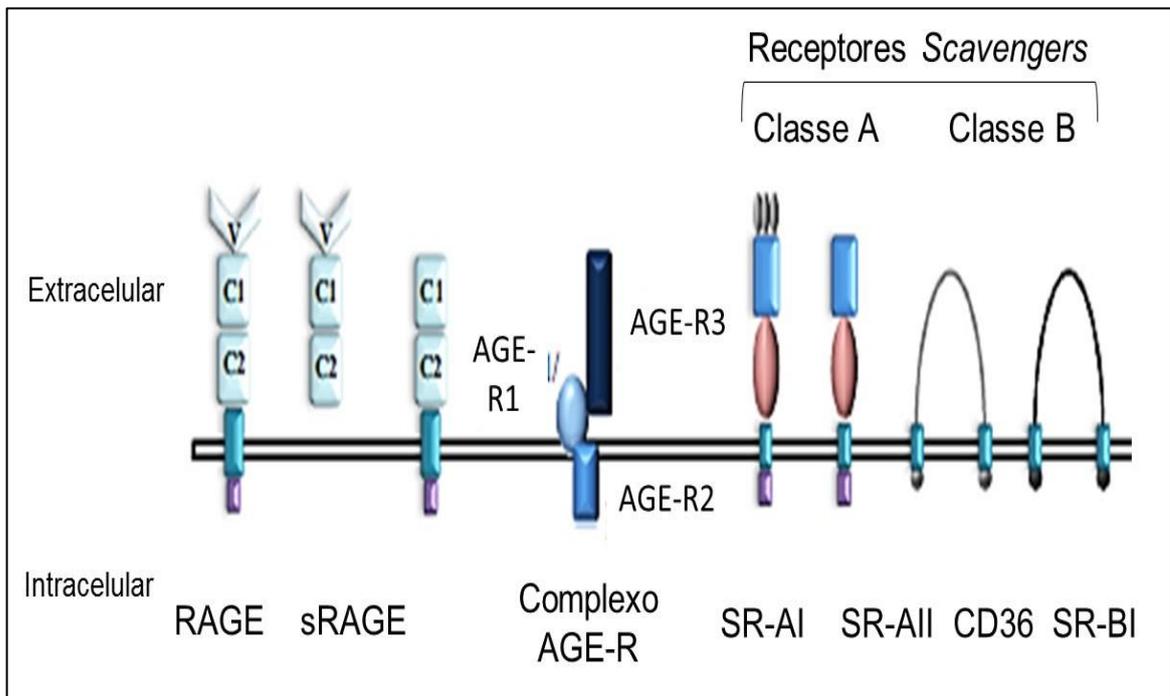


**Figura 1. Processo de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGE).** Glicação, adição de açúcares redutores e/ou seus produtos reativos de degradação a grupamentos amina das proteínas. Exemplos CML: carboximetil lisina; GOLD: dímero de glicoxal-lisina e pentosidina. FONTE: Adaptado de (Monnier, 2003).

Dentre os diferentes domínios formados através da glicação a CML é a mais abundante e mais estudada entre as diferentes estruturas de AGEs formadas a partir dos resíduos de lisina. O aumento do conhecimento em relação a bioquímica dessa molécula vem permitindo descrever o seu envolvimento em diferentes processos biológicos particularmente em distúrbios degenerativos despertando o interesse de muitos pesquisadores. Diversos estudos já evidenciaram o potencial patológico de CML, e múltiplas funções foram observados, sendo a toxina considerada um biomarcador do envelhecimento, e correlacionada com estresse oxidativo, estando envolvida na patogênese de doenças tais como a nefropatia diabética, aterosclerose, retinopatia diabética, amiloidose associada à hemodiálise, doença de Alzheimer, disfunções no remodelamento óssea, e enrijecimento arterial (Vanholder *et al.*, 2008; Won *et al.*, 2012; Vlassara e Striker, 2013). Alguns mecanismos que podem levar ao dano tecidual têm sido descritos para CML e também para os outros domínios de AGEs. Estes mecanismos incluem modificação da função de proteínas devido a alterações estruturais e conformacionais, interação com proteínas de matriz extracelular modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula, provocando disfunção tecidual, promovendo a formação de radicais livres, induzindo a ativação da resposta inflamatória após ligação ao receptor RAGE (receptor

multiligante de AGEs) ou outros receptores de membrana cuja atividade aumenta proporcionalmente em relação a concentração de CML e outros AGEs encontrados na circulação sanguínea (Kasper e Funk, 2001; Badenhorst *et al.*, 2003; Nass *et al.*, 2007).

A formação de AGEs e principalmente o domínio CML conduzem à ativação de diferentes vias de sinalização mediadas por uma série de receptores de superfície celular, sendo o RAGE o receptor mais estudado de AGEs. No entanto outros receptores para AGEs já foram descritos, tais como complexo AGE-receptor (AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galectin-3) (Vlassara *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996) e alguns membros da família dos receptores *scavengers* (SR-A (Araki *et al.*, 1995); SR-B:CD36 (Ohgami, Nagai, Ikemoto, *et al.*, 2001; Ohgami *et al.*, 2002), SR-BI(Ohgami, Nagai, Miyazaki, *et al.*, 2001); SR-E:LOX-1 (Jono *et al.*, 2002); FEEL-1;FEEL-2, (Tamura *et al.*, 2003) (Figura 2). A expressão destes receptores para AGEs depende da célula ou tecido que são encontrados e são regulados em resposta a alterações metabólicas que ocorrem durante o envelhecimento, diabetes e hiperlipidemia (Vlassara, 2001).



**Figura 2. Receptores multiligantes de AGE.** FONTE: Adaptado de (Ohgami, Nagai, Ikemoto, *et al.*, 2001)

Para que os AGEs possam ser removidos pelo sistema renal eles precisam ser processados. A degradação dos AGEs ocorre intracelularmente o que significa que primeiramente eles precisam ser captados pelas células. Como já foi mencionado alguns receptores são capazes de se ligarem aos AGEs para que o ocorra o processamento intracelular (Vlassara e Palace, 2002). A captação dos AGEs formados é realizada pelo complexo AGEs-receptor e pelos receptores *scavengers*. Esta interação ativa os receptores através da fosforilação ou ubiquitinação de regiões citoplasmáticas do receptor estimulando a endocitose, que promove a internalização do complexo ligante-receptor. Dentro do endossoma recém-formado a molécula de AGEs é dissociada do seu receptor desencadeada por uma diminuição de pH dentro do endossoma (Sorkin e Von Zastrow, 2009; Platta e Stenmark, 2011). Após a dissociação o receptor é reciclado e volta a superfície celular. Enquanto isso, o endossoma contendo AGEs funde-se com o lisossoma, seguindo o processamento via proteases lisossomais. Após a degradação intracelular, são liberados na circulação AGEs peptídeos solúveis de baixo peso molecular, e transportados até o sistema renal através de processos ainda não conhecidos e são então excretados na urina (Sano *et al.*, 1998)

O comprometimento da função renal pode resultar em acúmulo de AGEs. A disfunção renal que ocorre em pacientes portadores de nefropatia, por exemplo, resulta na falha da remoção dos AGEs circulantes e contribui consideravelmente para as altas concentrações de AGEs séricos e teciduais, encontradas nesses pacientes (Gugliucci e Bendayan, 1996). Pode se dizer que na DRC, os níveis de AGEs estão significativamente aumentados, não só devido ao aumento da produção de AGEs, mas também por causa da diminuição da excreção (Vanholder *et al.*, 2003).

## 2.4 Detecção de AGEs

A grande heterogeneidade estrutural dos AGEs é um fator que dificulta o desenvolvimento de um método único para este grupo de moléculas. Já estão disponíveis várias publicações relacionadas com a identificação e quantificação de AGEs. Os métodos mais utilizados são as técnicas cromatográficas incluindo cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa LC-MS / MS (Hegele *et al.*, 2008), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa GC-MS (Charissou *et al.*, 2007), cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Odetti *et al.*, 1992; Wilker *et al.*, 2001) e MALDI-TOF-MS (Yeboah e Yaylayan, 2001). Estas

técnicas podem ser usadas para separar e dosar os diferentes AGEs. Alguns AGEs emitem fluorescência em comprimentos de onda específicos e podem ser quantificados através desta propriedade. Entretanto esses métodos se tornam inconvenientes para grande número de amostras, especialmente na detecção dessas toxinas urêmicas em soros de pacientes.

Outra vertente é o desenvolvimento de testes imunorreativos que utilizam anticorpos monoclonais ou policlonais específicos. Os imunoenaios são amplamente empregados como metodologia para análise de amostras biológicas, sendo úteis para analisar uma única amostra ou centenas de amostras por dia. Atualmente anticorpos anti-AGEs são amplamente utilizados para promover a compreensão da biologia fundamental de AGEs e sua detecção em fluidos biológicos. Distintos grupos exploram essa tecnologia em que a produção de anticorpos anti-AGEs assume papel importante na detecção dessa toxina em soro e plasma de pacientes com DRC, indivíduos com diabetes e doença cardiovascular. Na verdade, os domínios de AGEs apresentam-se como bons marcadores para diagnósticos de várias doenças que envolvem o acúmulo desta toxina (Kilhovd *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 2005; Meerwaldt *et al.*, 2008).

Dentro desta abordagem os ensaios imunoenzimáticos (ELISA – “enzyme-linked immunosorbent assay”), são os mais empregados na detecção e quantificação de toxinas urêmicas. Já existem ensaios imunoenzimáticos comerciais capazes de detectar AGEs e suas diferentes estruturas, porém não há uma padronização e concordância nos valores detectáveis para cada ensaio. Além disso não é possível uma comparação e validação da sensibilidade entre os kits disponíveis pela falta de valores de referência.

Considerando a importância das complicações relacionadas ao aumento dos AGEs na circulação, a detecção, quantificação e a compreensão dos efeitos citotóxicos destas toxinas, são pontos importantes a serem investigado. No entanto, existe ainda considerável incerteza em relação à contribuição efetiva de cada AGE para as alterações celulares e teciduais observadas em diferentes patologias. Incerteza adicional reside nas limitações dos diferentes ensaios utilizados para quantificação dos AGEs, entre elas a falta de uma característica comum entre as diferentes formas desse conjunto de toxinas (Ahmed, 2005). Isto pode estar relacionado a falta de estabelecimento de uma unidade de medida padrão reconhecida internacionalmente para expressar os níveis de AGEs, ao contrário de

outras moléculas mensuráveis, o que torna a comparação de resultados entre diferentes laboratórios extremamente difícil, ou ainda pela falta de ferramentas precisas e específicas capazes de identificar e detectar essas toxinas (Nagai *et al.*, 2014).

Os métodos imunológicos podem proporcionar diversas vantagens na identificação desses compostos, tais como a verificação rápida de resultados, sensibilidade mais elevada, e uma aplicação mais fácil quando comparado a outras abordagens (Carter, 2006). Desta forma o diagnóstico, quantificação e avaliação das vias de sinalização relacionadas a esses compostos urêmicos representam um ponto importante para o entendimento da progressão da DRC, melhora no prognóstico bem como direcionamento do tratamento dos pacientes. As análises de propriedades bioquímicas, imunológicas e interações citológicas dessas toxinas podem fornecer informações importantes sobre possíveis marcadores do estadiamento da DRC. Assim, torna-se necessário o estudo e desenvolvimento de ferramentas específicas e sensíveis capazes de identificar e quantificar tais toxinas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-CML e seu uso na confecção de ensaios que possam detectar e quantificar essa toxina em fluidos biológicos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Síntese e caracterização de CML-proteína;
- Produção de anticorpos policlonais anti-CML;
- Obtenção e manutenção dos hibridomas secretores de anticorpos monoclonais específicos;
- Identificação da sequência de aminoácidos das regiões variáveis do anticorpo monoclonal selecionado e caracterização imunoquímica;
- Padronização de imunoensaio *in vitro* capaz de detectar CML, em amostras biológicas de pacientes com DRC;
- Emprego do anticorpo monoclonal em ensaios celulares para avaliação da interação CML com as células.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética e Pesquisa em Humanos da UFPR (Nº39393414.9.0000.0102, CEP/SD) e do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UFPR (Nº 23.075,087228/2013-74) de acordo com as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 4.1 Pacientes

Para o presente estudo, amostras de sangue periférico foram coletadas a partir de 24 pacientes DRC no Hospital Nossa Senhora da Luz (Curitiba / Brasil). Os critérios de inclusão foram indivíduos acima de 18 anos de idade, presença de DRC (proteinúria ou diminuição da TFG em 3 avaliações consecutiva), e disponibilidade para participar no estudo. Os critérios de exclusão foram sinais de inflamação ou doença infecciosa (determinada pela ausência de sinais clínicos de doença aguda e inflamação), neoplasia, terapia de substituição renal prévia ou atual, e o uso de imunossuppressores. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por revisão de prontuários. A TFG foi medida de acordo com o método de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD) (Levey *et al.*, 1999). Os pacientes foram classificados em estágios de 1 a 5 de acordo com os critérios da National Kidney Foundation.

Na manhã de inclusão no estudo, 20 mL de sangue total venoso sem anticoagulante foi coletado de cada paciente, levado até o laboratório de Nefrologia Experimental, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, UFPR, e imediatamente centrifugado a 800 X g, 7 minutos a 4°C. Os soros foram então separados e armazenados a -80 °C.

### 4.2 Animais

Quatro Camundongos adultos macho da raça Balb-c, com aproximadamente 40 dias de idade e peso de 20g, foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, todos receberam água e alimentação em condições controladas.

### 4.3 Síntese CML-proteína

Para a produção de CML-proteína, diferentes proteínas carreadoras foram utilizadas, desta forma, 50 mg de Soro Albumina Bovina (BSA) (Sigma-Aldrich) , 5 mg de Hemolinfa de Molusco (KLH) (Sigma-Aldrich) e 5mg de Soro Albumina Humana (HSA) (Sigma-Aldrich), reagiram individualmente com 50mM de ácido glicóxico na presença de 150mM de cianoborohidreto de sódio ( $\text{NaCNBH}_3$ ) dissolvidos em 200mM de tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e incubados a 37°C durante 24h, como previamente descrito (Njoroge *et al.*, 1988; Ikeda *et al.*, 1996), a fim de se obter CML-BSA, CML-KLH e CML-HSA, conforme esquematizado na Figura 3. Como controle, as proteínas não modificadas BSA, KLH e HSA foram submetidas ao mesmo tratamento, contudo sem ácido glicóxico. A concentração final de proteínas totais foi determinada através do ensaio de Bradford (Bio-Rad, Estados Unidos).

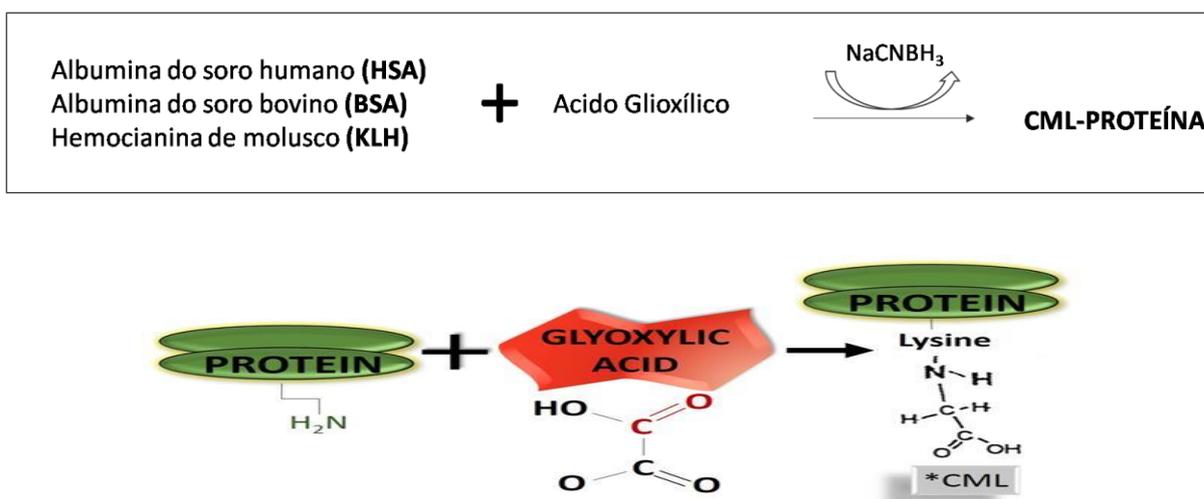


Figura 3. Esquema da síntese de CML-proteína.

### 4.4 Caracterização de CML-proteína

As moléculas CML-BSA, CML-KLH e CML-HSA foram caracterizadas por dodecil sulfato de sódio eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e espectrometria de massa.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizado sob condições redutoras, a fim de avaliar o perfil de proteínas de cada CML-proteína. Utilizou-se 10 $\mu\text{g}$  por canaleta das amostras, adicionadas ao tampão de amostra em condições redutoras [tris-HCl 0,5 mol/L, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 10% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) e agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (v/v)] e fervidas por 3 minutos. O gel SDS-PAGE de

concentração 10% de acrilamida foi utilizado para a separação das amostras. A migração aconteceu utilizando-se tampão de separação (Tris 25mM, glicina 200mM e SDS 0,5%, pH 8.3) sob voltagem de 100 V durante 90 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi corado com Azul de *Coomassie*.

Para espectrometria de massa (MS) as proteínas foram diretamente spotadas em placas do MALDI ligadas com alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como matriz (preparadas em 50% acetonitrila e 0.1% ácido trifluoroacético). As análises de MALDI-TOF foram realizadas usando espectrômetro de massa MALDI-Tof/Tof Autoflex II (Bruker Daltonics); o espectro de massa foi adquirido e analisado em Flex Analysis 2.0 (Bruker Daltonics) software.

#### **4.5 Produção de anticorpos murinos anti-CML**

As moléculas CML-BSA, CML-KLH e CML-HSA sintetizadas e caracterizadas foram usadas como imunógenos para a produção de anticorpos policlonais e monoclonais (Alvarenga *et al.*, 2003). Quatro camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados, inicialmente, por via subcutânea com uma emulsão preparada com 20 µg de CML-KLH ou CML-BSA diluídas em PBS e adjuvante completo de Freund em diluição 1:2.

Após três semanas, cada um dos camundongos recebeu outra injeção via subcutânea com uma emulsão em diluição 1:2 que continha 20 µg de veneno total diluídos em PBS e adjuvante de Freund, desta vez, incompleto. A terceira e a quarta imunização ocorreram após 15 e 7 dias respectivamente, nas quais os camundongos receberam nova injeção subcutânea contendo 20 µg CML-KLH ou CML-BSA. Após sete dias, testou-se a reatividade do soro destes animais em ensaio de ELISA (descrito a seguir).

#### **4.6 Obtenção dos hibridomas**

O camundongo cujo soro, em diluição 1:100, apresentou absorbâncias superiores a 1.0 (Abs 490nm) para CML-proteína e baixa reatividade cruzada com a proteína nativa (Abs 490nm<0,05) recebeu uma última dose via endovenosa com 5 µg de CML-proteína em 100 µL de PBS. Três dias mais tarde, o baço do camundongo hiperimunizado foi coletado. O tecido foi transferido para uma placa de Petri estéril

contendo 5 mL de meio DMEM e cortado em pequenos fragmentos, macerados sobre uma tela de malha fina esterilizada. O material foi passado por uma segunda tela e lavado três vezes com DMEM utilizando-se uma centrífuga refrigerada a 500 X g por 12 minutos, 4°C.

Células sp2/0 foram descongeladas e mantidas em incubadora de 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> de 5%, em meio DMEM (Dulbeco's Modified EAGLES Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µmol/L de L-glutamina, 100 UI penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) de forma a se obter um número de células ideal para a fusão ( $1 \times 10^7$  células/mL).

As células de mieloma, repicadas 24 horas antes, foram lavadas conforme descrito anteriormente, diluídas a  $1 \times 10^7$ /mL, misturadas a todas as células obtidas com a maceração do baço e centrifugadas a 500 X g por 12 minutos a 4°C. Ao sedimento foi adicionado, lentamente, 1 mL de uma solução de polietilenoglicol (PEG) 1500 a 50% (p/v) em DMEM pré-aquecido à 37°C, agitando-se lentamente o tubo por alguns minutos. Após 1 minuto de repouso foram adicionados 20 mL de DMEM divididos em quatro intervalos de 5 minutos agitando-se lentamente. As células foram centrifugadas a 21°C, 300 X g por 12 minutos e ao precipitado adicionou-se 100 mL de meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterin e timidina) e DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA).

A suspensão final foi distribuída em placas de 96 poços (200 µl/poço) e levadas à incubadora à 37°C e atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% (Alvarenga *et al.*, 2003; Becker-Finco *et al.*, 2013). Quinze dias após a obtenção dos hibridomas, os sobrenadantes dos poços foram testados por ELISA direto (descrito a seguir) utilizando CML-proteína e proteína nativa. Os hibridomas positivos para CML-proteína foram expandidos e clonados.

#### **4.7 Seleção e clonagem dos hibridomas**

As placas para a clonagem foram previamente preparadas com 100 µL de meio DMEM contendo macrófagos intraperitoneais de camundongos não imunizados. Após contagem das células, a solução de origem foi diluída em meio seletivo HT (hipoxantina e timidina) e DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino de forma a se ter uma única célula em cada um dos poços previamente preparados.

Após a clonagem, uma nova seleção por ELISA foi realizada para confirmação da reatividade. Uma linhagem celular, denominada mAb 2D6, que foi positiva para CML-BSA ou CML-KLH, mas negativa para BSA ou KLH foi selecionada, submetida a subclonagens adicionais levando ao clone 2D6G2. Os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CML foram testados usando ensaio ELISA direto (descrito a seguir).

Os mAbs foram purificados por cromatografia de imunoafinidade utilizando Proteína A/G Sepharose® 4B fast flow preparada de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

#### **4.8 Análise de cDNA de mAb 2D6G2 que codifica cadeia variável pesada (VH) e cadeia variável leve (VL), análise das sequências e pesquisa no banco de dados**

O RNA total do hibridoma secretor de anticorpos monoclonais 2D6G2 foi isolado utilizando-se o reagente Trizol® (GIBCO BRL, Life Technologies, USA). O RNA foi extraído da seguinte forma: foi acrescentado a garrafa de cultura previamente lavada com tampão PBS 1X, 1 ml de Trizol para cada 10 cm<sup>2</sup>, ou seja, para a garrafa de 75cm<sup>2</sup> foram utilizados 8mL. Em seguida homogeneizou-se e incubou-se a mistura à temperatura ambiente por 5 min. A seguir 1 ml do lisado foi distribuído em tubos tipo *Eppendorf* de 1,5 ml contendo 250 µl de clorofórmio (MERCK). A mistura foi deixada à temperatura ambiente por mais 5 minutos e centrifugada por 12.000 X g durante 20 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado para novo tubo contendo 500µl de isopropanol e incubado por 18 horas a -20°C. Os tubos foram centrifugados e o RNA foi lavado com etanol 75% em água DEPC. Finalmente, o etanol foi desprezado e o RNA foi seco à temperatura ambiente sobre papel toalha em fluxo laminar. Após a secagem, adicionou-se 15-60 µl de água DEPC ao RNA.

Dez microgramas de RNA total foram transcritos reversamente à fita de cDNA na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Gibco BRL), utilizando 25 pmoles do iniciador OLIGO dT em uma reação com volume final de 20 µl, contendo solução tampão 1x, 25 U de inibidor de Rnase (Rnasin, Promega) e 200 µM da mistura de dNTP.

Os cDNAs codificantes para os domínios variáveis do anticorpo (Imunoglobulina região variável da cadeia pesada, IGHV; Imunoglobulina região variável de cadeia leve, IGkV) foram clonados após RT-PCR usando iniciadores

degenerados IGH-For (GAC AGT GGA TAR ACM GAT GG) e IGH-Rev (GAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG) para amplificação da região variável de cadeia pesada (VH) mAb 2D6G2, e V-KAPPA For (GGA TAC AGT TGG TGC AGC ATC) e V-KAPPA Rev (GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT) para amplificação da região variável de cadeia leve (VL) mAb 2D6G2.

O produto de PCR foi inserido no vetor de clonagem pGEM-T (Promega A3610) e bactérias *Escherichia coli* TG1 (*E. coli* TG1) foram transformadas com este plasmídeo de clonagem. A seleção de clones ocorreu por alfa complementação, sendo que, a presença do inserto foi confirmada por amplificação de DNA das colônias positivas utilizando os iniciadores específicos. As colônias contendo o inserto do tamanho adequado foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) e para purificação do DNA plasmidial foi utilizado o Kit de purificação de plasmídeos (Qiagen).

Os clones obtidos foram confirmados através de sequenciamento de DNA. A reação de sequenciamento foi realizada empregando o *protocolo Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) disponível para o sequenciamento automático no sequenciador ABI 3110 (Applied Biosystems-Perkin Elmer) segundo as especificações dos fornecedores.

As análises do sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo já descrito (Fields *et al.*, 2013). Para comparar as sequências das regiões variáveis das imunoglobulinas (REGIÃO-V), foi usado ImMunoGenetTics (IMGT) único Subcomitê de Nomenclatura para Imunoglobulinas e Receptor de Células T, aprovado pelo *World Health Organization (WHO) / International Union of Immunological Societies (IUIS)*. As ferramentas da Web interface IMGT (IMGT/V-QUEST) e o banco de dados (IMGT/LIGM-DB and IMDT/3D structure-DB) também foram usados (Lefranc *et al.*, 2015).

## **4.9 Protocolos de ELISA**

### **4.9.1 ELISA Formato Direto**

As amostras sintetizadas CML-proteína (100 µL, 10 µg/ml ou uma concentração crescente 0,3 a 40µg/mL diluído em tampão carbonato NaHCO<sub>3</sub> 100 mmol/L, pH 9,6)

foram imobilizadas em placas de 96 poços (Immunonunc Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) e incubadas a 4°C durante 16h. Os sítios de ligação não específicos foram saturados com 120µL de uma solução tampão fosfato (PBS) contendo 2% de caseína durante 60 min. As placas foram então incubadas com 100µL de sobrenadante celular das culturas de hibridomas ou anticorpos monoclonais I (1 µg/mL) ou policlonais (1:400) anti-CML por 60 min a 37°C. Em seguida foi adicionado imunoglobulinas heterólogas anti IgG murino conjugadas com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) por mais 60 minutos. Entre cada etapa descrita três lavagens com PBS (pH 7,4) contendo 0,1% de tween 20 foram realizadas. Finalmente, para evidenciar a reação, 100µL de uma solução contendo dicloridrato 1,2-fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionada a cada poço durante 20 min. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico [1M], e a absorbância foi mensurada a 490 nm em leitor de microplacas Bio-Rad 550 (Japan).

#### **4.9.2 ELISA Formato competitivo**

Placas de 96 poços (Immunonunc, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) foram recobertas com uma solução de CML-HSA (100 µL, 10 µg/mL) em tampão carbonato pH 9,6 durante 16h a 4°C. No dia seguinte o bloqueio dos sítios de ligação não específicos foi feito com adição de 120µL de uma solução a 2% de caseína em PBS. Paralelamente 100 µl dos soros de pacientes com DRC (Tabela suplementar 1) diluídos 1:10 foram incubados com 0,1 µg/mL de mAb 2D6G2 por 120 min a 37°C. Passado o tempo de incubação 100 µL desta solução previamente preparada contendo o soro dos pacientes mais o anticorpo mAb 2D6G2 foi transferida para a placa de 96 poços e incubada por 60 min a 37°C. Em seguida foi adicionado imunoglobulinas heterólogas anti IgG murino conjugadas com a enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) por mais 60 minutos. Entre cada etapa descrita três lavagens com PBS (pH 7,4) contendo 0,1% de tween 20 foram realizadas. Finalmente, para evidenciar a reação, 100µL de uma solução contendo dicloridrato 1,2-fenilenodiamina e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionada a cada poço durante 20 min. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico [1M], e a absorbância foi mensurada a 490 nm em leitor de microplacas Bio-Rad 550 (Japan). Para a comparação dos valores de toxina encontrada no soro dos pacientes DRC, uma curva padrão com valores conhecidos de CML-HSA foi delineada, na qual 0,1 µg/mL do

anticorpo monoclonal mAb 2D6G2 foi incubado com CML-HSA em concentrações variando de 0,4 à 200 ng/mL.

#### **4.10 Avaliação da interação de CML-HSA em células THP-1**

##### **4.10.1 Células THP-1**

Como modelo de monócitos humanos, foi utilizada a linhagem celular THP-1 obtidas a partir da *American Tissue Culture Coleção* (ATCC-tib-202, Rockville, MD). As células foram cultivadas e mantidas em incubadora à 37°C/atmosfera de CO<sub>2</sub> de 5%, garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, Corning, EUA), em meio DMEM (Dulbecco's Modified EAGLES Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino-SFB (Gibco Life Technology / Invitrogen, Grand Island, EUA), 100 µmol/L de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 100 UI penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco).

##### **4.10.2 Ensaio de viabilidade pelo método de exclusão com azul de Trypan**

O número de células THP-1 foi determinado pela contagem direta em câmara de *Neubauer* pelo método de exclusão de azul de *Trypan* (Sigma-Aldrich, USA). Basicamente, após cultivo as células THP-1 foram tratadas com 80µg/mL de CML-HSA ou controle (proteína nativa HSA). Após 24 e 48 horas de incubação as células foram recuperadas por centrifugação e adicionou-se 1 mL/tubo de DMEM. Em seguida, 10 µL da suspensão foi acrescido de 10 µL de solução de azul de Trypan 0,4%, quando, então, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia de luz (Nikon, Tokyo, Japan).

##### **4.10.3 Tratamento de THP-1 com CML-HSA e Imunofluorescência**

Para este ensaio as células foram recuperadas em tubos de 15 mL por centrifugação (10min, 500 X g a 22°C). As células foram semeadas em microtubos de 1,5 mL contendo meio DMEM, a uma densidade celular de 5 X 10<sup>5</sup> células por tubo. As células foram então tratadas com 80 µg/mL de CML-HSA ou com a proteína nativa HSA (usada como controle do experimento) em cinética de tratamento de 0, 15, 30, 60min e 24 horas sem agitação em incubadora à 37°C/atmosfera de CO<sub>2</sub> de 5%. Para

o tempo de 24 horas realizou-se mais um tratamento: as células foram semeadas também em microtubo de 1,5 mL contendo meio DMEM, a uma densidade celular de  $5 \times 10^5$  células por tubo, tratadas com 80  $\mu\text{g/mL}$  de CML-HSA e passadas as 24h foi adicionado mais 80  $\mu\text{g/mL}$  de CML-HSA que permaneceu em contato com as células durante uma hora.

Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação e adicionou-se 1 mL/tubo de PBS pH 7,4 para lavagem do material, foram realizadas três lavagens. A solução de paraformaldeído 2% em PBS pH 7,4, foi adicionada as células, permanecendo durante 20 minutos em temperatura ambiente (22°C) para a fixação do material. As células foram novamente lavadas e para todos os tempos avaliados (0, 15, 30 e 60 min) um grupo de células foi permeabilizado com uma solução 0,1% de Triton X100 por 10 minutos e outro grupo não foi permeabilizado (para fins comparativos). Após lavagem foi adicionado o anticorpo mAb 2D6G2 (10 $\mu\text{g/mL}$ ) incubado 1 hora sem agitação em incubadora à 37°C/atmosfera de CO<sub>2</sub> de 5%. O material foi novamente lavado com PBS pH 7,4, e as células então incubadas a 37°C durante 1h com o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado à fluoresceína isothiocyanato (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na proporção de 1:300. Para promover a marcação nuclear foi adicionado 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) 10  $\mu\text{L}$  diluído em PBS pH 7,4 (concentração final 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ) por 5 minutos.

As lâminas foram montadas adicionando-se uma gota de *fluoromount-G* (Eletron microscopy science - USA) colocou-se então as células previamente preparadas e para recobrir uma lamínula, vedados com tinta esmalte. As lâminas foram visualizadas em microscópio confocal A1RMP (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan).

As imagens de fluorescência foram adquiridas excitando FITC usando laser 488 nm e a emissão foi capturada usando o filtro 515/30 (500-530 nm band pass). O DAPI foi excitado com laser a 405 nm e a emissão foi capturada utilizando o filtro 450/50 (425-475 nm band pass). As imagens resultantes foram analisadas usando software Fiji.

#### 4.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando os pacotes estatísticos JMP Windows versão 8.1 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA) e SigmaStat Windows version 3.5 (Califórnia, EUA). Para comparar o resultado entre os grupos foram realizados os testes t de Student ou Anova para dados pareados e Mann-Whitney e Anova on Rank's para dados não pareados. A análise de correlações foi realizada através do teste de *Spearman* ( $\rho$ ). Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Os resultados foram considerados significativos para um valor de  $P \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Produção e Caracterização de CML-proteína

Este trabalho foi conduzido inicialmente visando a produção de insumos (antígenos e anticorpos) que pudessem ser empregados na detecção e estudo do CML e posteriormente utilizadas como imunógenos em camundongos na obtenção de anticorpos.

Para a produção dos diferentes domínios de AGEs classicamente *in vivo* proteínas em contato com altas concentrações de glicose, como por exemplo em pacientes diabéticos ou DRC, sofrem rearranjos e condensações ao longo do tempo até a formação dessas moléculas. *In vitro* essa síntese pode ser reproduzida adicionando açúcar com proteína sob condições controladas como pH e temperatura por um período de 6 a 12 semanas e ao final desse processo ocorre a formação de diferentes domínios de AGEs. Entretanto esse processo de glicação pode ser favorecido pelo uso de intermediários ativos formados durante a degradação da glicose e que são muito mais reativos, como é o caso do ácido glioxílico, empregado neste trabalho com o intuito de direcionar a formação do domínio CML. Nesse sentido, para a produção do domínio CML três diferentes proteínas (KLH, HSA e BSA) foram empregadas como carreadoras para a síntese de CML com o objetivo de produzir este domínio a partir de diferentes proteínas que possam ser posteriormente usadas como imunógenos na indução da produção de anticorpos bem como utilizá-las na seleção de anticorpos específicos. As amostras aqui sintetizadas estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3:** Descrição das amostras.

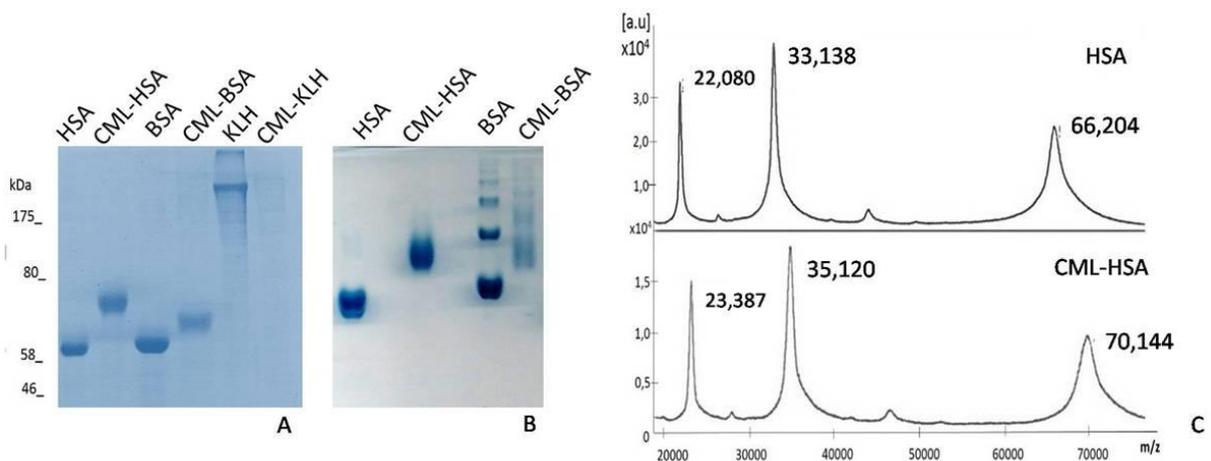
Proteína nativa	Proteína modificada CML
HSA	CML-HSA
BSA	CML-BSA
KLH	CML-KLH

Para confirmar a eficiência de glicação duas estratégias diferentes de eletroforese foram realizadas e em ambas ocorreu alteração no perfil eletroforético sugerindo modificações na estrutura das moléculas. Na primeira estratégia empregando-se o gel SDS-PAGE foi possível observar a diferença de massa entre as

amostras sintetizadas e suas respectivas proteínas nativas (Figura 4A). Já na segunda estratégia foi utilizado o gel de proteínas básicas que apresenta como princípio a separação das proteínas com base na carga das amostras e neste caso também foi visualizada diferença entre as moléculas (Figura 4B). A mudança na mobilidade eletroforética indica glicação das amostras sintetizadas.

Em relação a proteína KLH apenas na sua forma nativa e no gel SDS-PAGE foi possível observar, fato que pode ser explicado pelo seu tamanho e carga que após modificação induzida pela síntese adquire estrutura que não permite sua mobilidade nos géis aqui empregados.

Também foi possível visualizar alteração na massa molecular de HSA (proteína nativa) e CML-HSA (proteína glicada) por espectrometria de massa. O espectro da molécula de HSA exibiu um pico de 66 kDa e do CML-HSA um pico de 70 kDa. A diferença de 4 kDa observada por espectrometria, sugere a formação de uma média de 19 novos domínios de CML por moléculas levando-se em consideração a massa de 204Da de CML (Figura 4C). A espectrometria de massa foi aplicada apenas a CML-HSA pois esta molécula sintetizada a partir de uma albumina humana é a que melhor simula as características da toxina *in vivo* e será empregada na padronização dos ensaios para o desenvolvimento de um imunoenensaio.



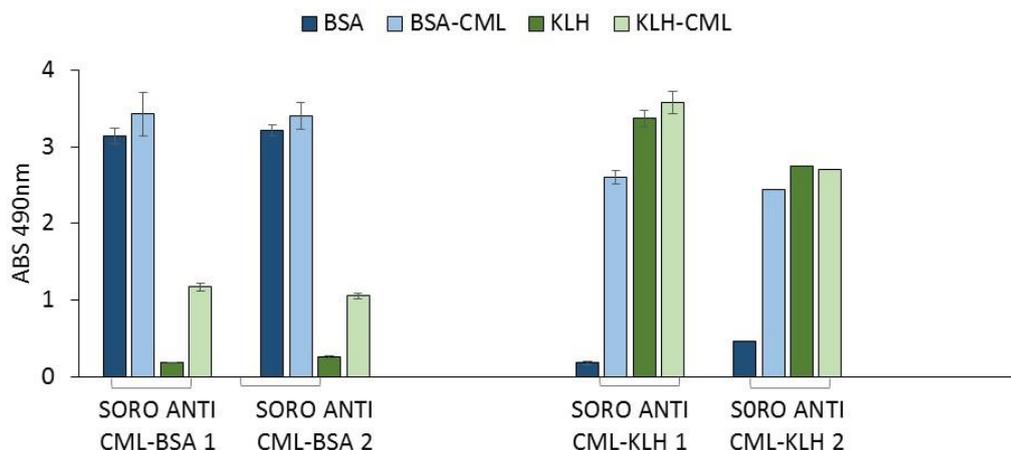
**Figura 4. Caracterização das proteínas modificadas.** As amostras sintetizadas foram separadas por (A) (B) SDS-PAGE ou (B) PAGE de proteínas básicas, seguidos de coloração por *Coomassie*. MW, marcador de peso molecular. (C) Espectrometria de massa de HSA e CML-HSA por MALDI TOF MS.

## 5.2 Produção e Caracterização de anticorpos policlonais

Confirmada a eficácia de síntese do domínio CML nas diferentes proteínas, o próximo passo foi a produção de anticorpos. Foram empregadas as toxinas CML-BSA e CML-KLH como antígenos no programa de imunização para a indução da produção dos anticorpos. Para cada toxina empregou-se dois camundongos que foram injetados subcutaneamente, segundo as condições descritas no item 4.5. O programa de imunização constou de quatro doses imunógenas, no qual entre a terceira e a quarta dose os soros dos camundongos imunizados foram coletados pelo plexo retro-orbital para verificação da eficácia de imunização e testados através do ensaio ELISA direto.

Para o ensaio de ELISA a placa foi imobilizada com CML-BSA, CML-KLH e utilizou-se as proteínas nativas não modificadas BSA e KLH como controles (conforme item 4.9.1). O soro obtido de cada um dos camundongos foi testado individualmente frente a cada uma dessas moléculas com o intuito de selecionar qual o imunógeno foi mais eficiente na indução de anticorpos específicos.

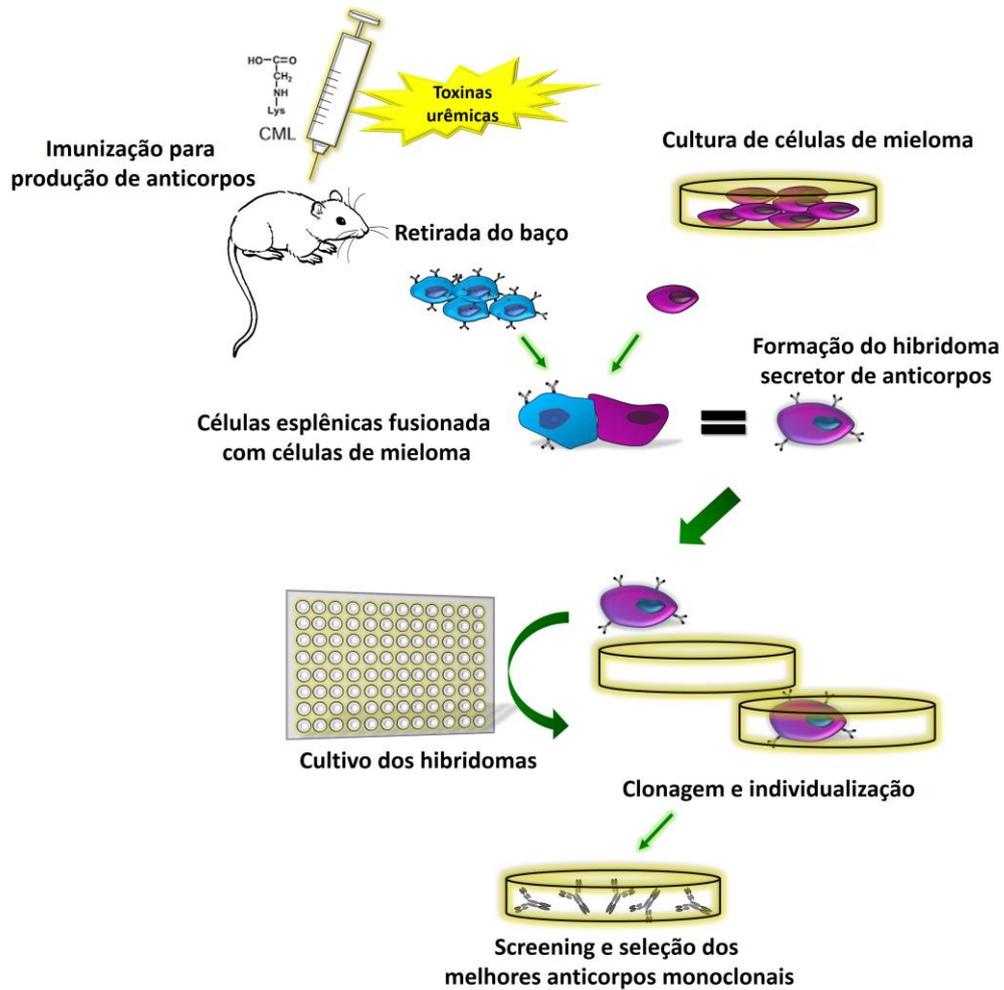
A imunização com a molécula de CML-BSA foi capaz de induzir a produção de anticorpos e é possível verificar que estes anticorpos foram direcionados para o domínio CML, quando se observa a reatividade do soro coletado dos dois camundongos imunizados com CML-BSA frente as proteínas nativas não modificadas BSA e KLH. Entretanto os melhores resultados foram observados com os dois soros dos camundongos imunizados com CML-KLH, pois apesar da reatividade cruzada frente a KLH, o que já se esperava, a reatividade para CML-BSA foi bem maior quase não se visualizando reatividade frente a proteína nativa BSA o que sugere que esses anticorpos foram realmente direcionados a CML. Estas observações direcionaram a escolha para o soro imune que apresentou a menor reatividade contra a forma nativa das moléculas carreadoras e alta reatividade contra a proteína glicada. Deste modo o camundongo imunizado com CML-KLH que apresentou a maior reatividade foi então escolhido e empregado no processo de produção dos anticorpos monoclonais (Figura 5).



**Figura 5. Reatividade dos anticorpos policlonais por ELISA.** Reatividade dos anticorpos policlonais frente as proteínas glicadas e reatividade cruzada contra as proteínas nativas por ELISA direto. A placa foi imobilizada com 10µg /mL de CML-proteína ou proteína nativa. O soro imune foi testado contra o seu antígeno específicos a uma diluição de 1:100 e contra o antígeno não específico na mesma diluição.

### 5.3 Produção e Caracterização de anticorpos monoclonais (mAb)

Para a produção dos anticorpos monoclonais, primeiramente foi retirado o baço do camundongo previamente selecionado por apresentar melhores resultados de especificidade. As células esplênicas foram fusionadas com células de mieloma distribuídas e cultivadas em cinco placas de cultivo celular de 96 poços. As células estabilizadas foram clonadas e individualizadas afim de se obter clones secretores de anticorpos monoclonais. Esse processo de fusão tem como objetivo imortalizar os esplenócitos secretores de anticorpos (Figura 6).

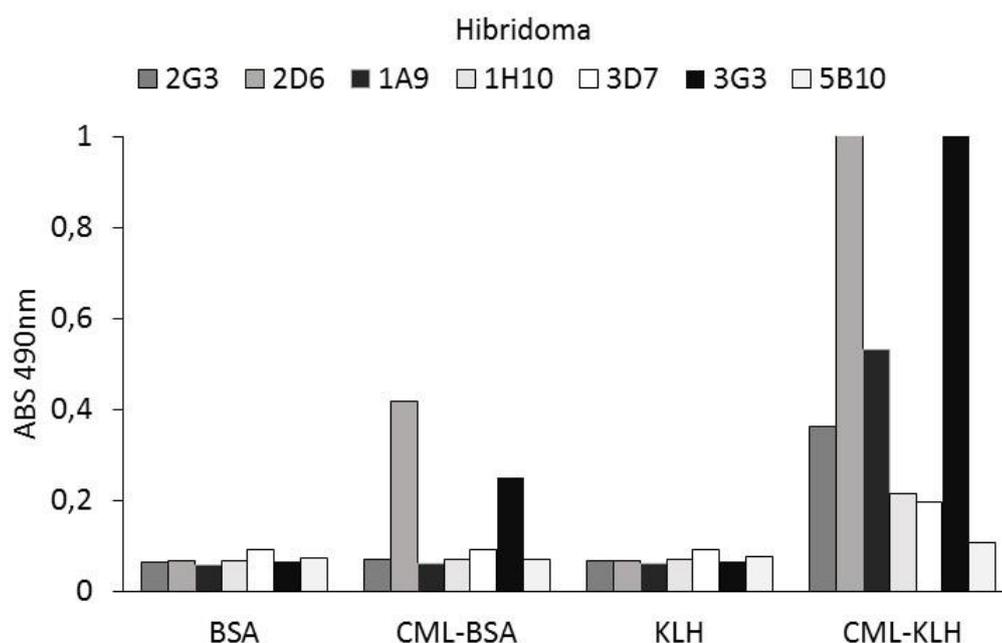


**Figura 6. Principais etapas da produção de anticorpos monoclonais.**

Após fusão e obtenção dos hibridomas os sobrenadantes celulares foram testados em ensaios de ELISA a fim de avaliar a especificidade dos anticorpos secretados. Para o ensaio de ELISA a placa foi imobilizada com CML-BSA, CML-KLH e foram utilizadas as proteínas nativas não modificadas BSA e KLH como controles (conforme item 4.10.1). Os sobrenadantes celulares dos hibridomas produzidos foram testados individualmente frente a cada uma dessas moléculas (CML-BSA, CML-KLH, BSA e KLH) com o intuito de selecionar qual desses clones secretam de anticorpos específicos.

Nesta primeira etapa de seleção 7 hibridomas foram selecionados por apresentarem reatividade frente as moléculas de CML-BSA e CML-KLH com baixa ou nenhuma reatividade para as proteínas nativas BSA e KLH. Contudo, os hibridomas 2D6 e 3G3 foram escolhidos para clonagem e individualização das células por

apresentarem as maiores reatividades frente as moléculas glicadas (CML-BSA e CML-KLH) quando comparadas as reatividades às proteínas nativas (BSA e KLH) e pela verificação de características com base em avaliações visuais tais como: pouco número de células e formação de colônias celulares bem como coloração do meio de cultura (que indica consumo de nutrientes e estabilidade dessas células) (Figura 7).



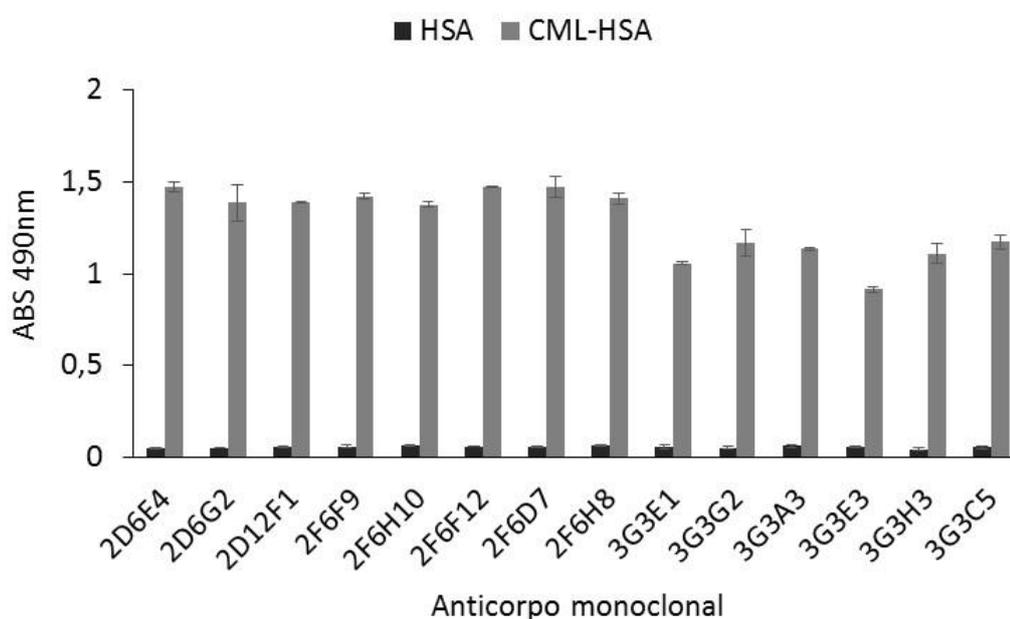
**Figura 7. Reatividade dos anticorpos produzidos pelos hibridomas verificada através ELISA.** Reatividade de sobrenadantes de células contra as proteínas glicadas (CML-BSA e CML-KLH) e não glicadas (BSA e KLH) por ELISA direto. A placa foi imobilizada com 10 µg/mL de CML-proteína ou proteína nativa. Para verificar a reatividade dos anticorpos 100µL de sobrenadante celular foi adicionado a placa.

Com base na alta reatividade observada no ensaio anterior de ELISA, os hibridomas 2D6 e 3G3 foram selecionados e submetidos a diluições sucessivas para clonagem, objetivando individualizar ou seja colocar uma célula em cada poço da placa de cultivo celular, originando uma única colônia celular a qual secreta um único tipo de anticorpo. Com essa clonagem obteve-se 14 clones.

Até esta etapa de caracterização dos anticorpos utilizou-se as proteínas glicadas CML-BSA e CML-KLH. A partir de agora será empregada a molécula de CML-HSA com o intuito de se identificar e direcionar um anticorpo monoclonal altamente específico para CML e que não apresente reatividade cruzada à albumina humana

(HSA) para que o mesmo possa ser utilizado em ensaios *in vitro* na detecção de CML em soro de pacientes com esta toxina aumenta.

Os quatorze clones obtidos foram avaliados quanto ao reconhecimento de CML-HSA e contra HSA em um outro teste de ELISA. Para o ensaio de ELISA a placa foi imobilizada com CML-HSA e proteína nativa não modificada HSA como controle (conforme item 4.10.1). Os sobrenadantes celulares dos clones produzidos foram testados individualmente frente a cada uma dessas moléculas. Todos os anticorpos secretados pelos clones testados foram capazes de reagir com CML-HSA, mas não reagiram com a proteína nativa HSA, confirmando assim o caráter de especificidade (Figura 8).

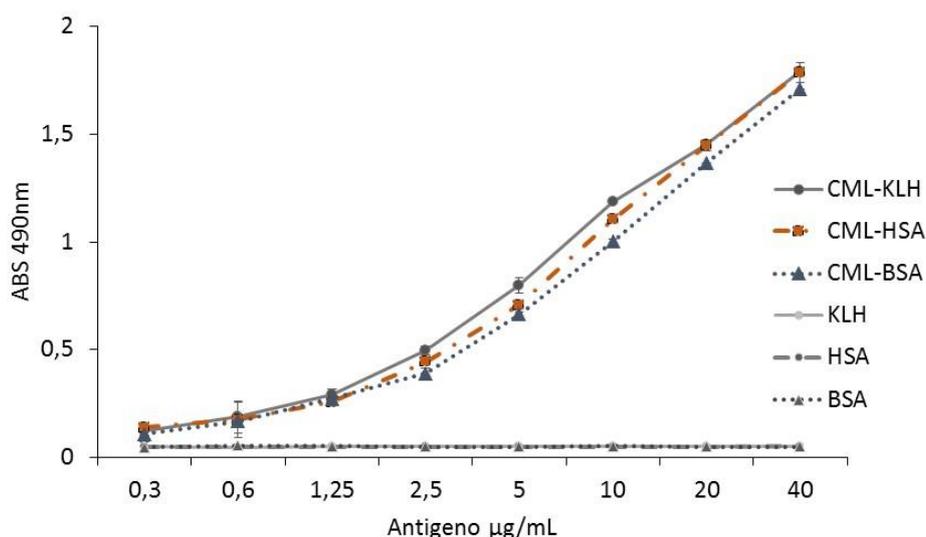


**Figura 8. Reatividade dos anticorpos monoclonais por ELISA.** Especificidade dos anticorpos monoclonais contra CML-HSA, e reatividade cruzada com HSA por ELISA direto. A placa foi imobilizada com 10 µg /mL de CML-HSA ou HSA. Para verificar a reatividade dos anticorpos 100µL de sobrenadante celular foi adicionado a placa.

Todos os clones apresentaram reatividade semelhante a CML-HSA e baixa ou nenhuma reatividade a HSA. Então critérios observacionais como pouco número de células e estabilidade foram essenciais na escolha e seleção do clone 2D6G2 para prosseguir com as caracterizações do anticorpo monoclonal secretado por estas células.

O sobrenadante celular do clone 2D6G2 foi purificado em coluna de afinidade para anticorpos (sepharose proteína A/proteína G) e denominado anticorpo monoclonal 2D6G2 (mAb 2D6G2). Antes da utilização deste anticorpo mAb 2D6G2 nas etapas de padronização de um imunoenensaio uma última caracterização foi realizada. A capacidade de reconhecimento exclusiva ao domínio CML foi avaliada por um ensaio de ELISA direto em que as três proteínas glicadas (CML-HSA, CML-BSA e CML-KLH) e as proteínas nativas (HSA, BSA e KLH) foram imobilizadas na placa. O mAb 2D6G2 purificado foi testado individualmente, em diferentes concentrações, frente a cada uma dessas proteínas.

Foi possível observar que além do mAb 2D6G2 reconhecer o domínio CML na proteína glicada CML-HSA ele também foi capaz de reconhecer esse mesmo domínio em CML-BSA e CML-KLH de forma dose dependente, confirmando a especificidade de ligação ao antígeno (Figura 9).



**Figura 9. Especificidade do mAb 2D6G2 contra CML-proteína.** Dose dependência do mAb 2D6G2 contra CML-proteínas. Concentrações crescentes (0,3-40 µg/mL) de CML-proteína e proteínas nativas foram utilizadas para verificar a especificidade do mAb 2D6G2. A concentração de anticorpo monoclonal avaliada foi de 1µg/mL.

#### 5.4 Padronização do ELISA de competição

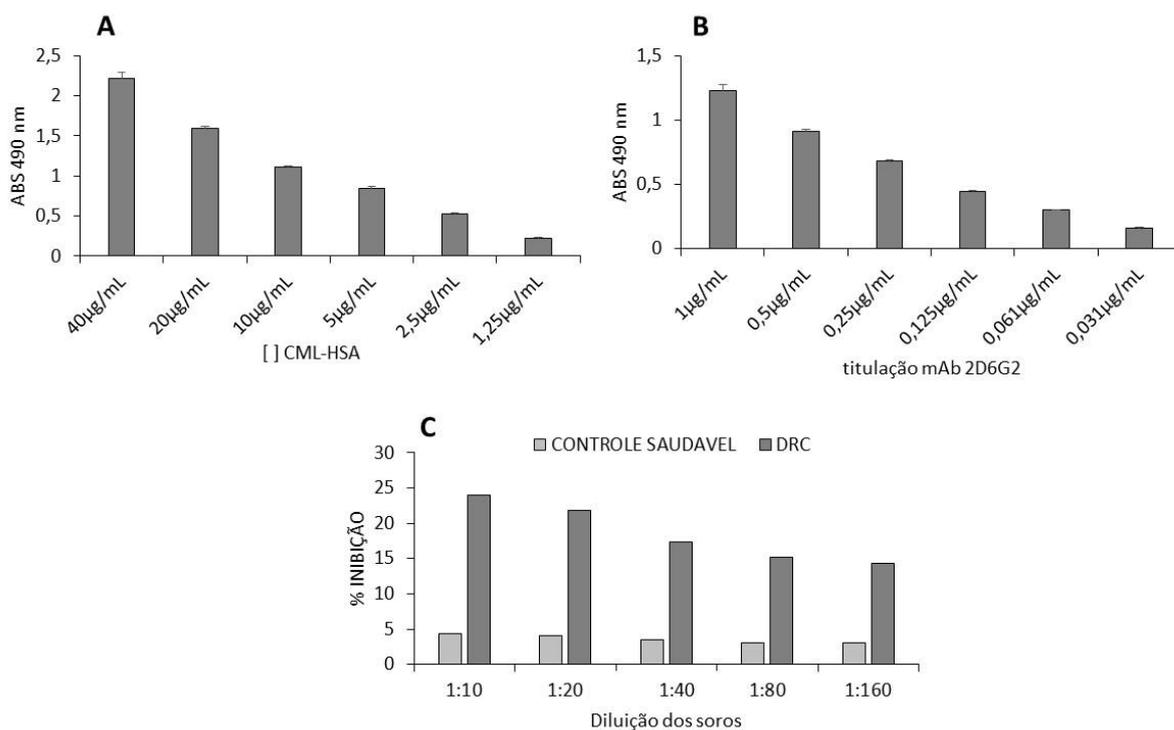
Após caracterização do mAb 2D6G2 e verificação da especificidade ao domínio CML, independente da proteína carreadora, diferentes critérios foram avaliados para a padronização de um ensaio ELISA de competição empregando este anticorpo monoclonal como ferramenta na detecção de CML em soro de paciente DRC.

O ELISA de competição consta das seguintes etapas: imobilização do CML-HSA na placa, diluição do soro do paciente DRC e pré incubação com mAb 2D6G2, adição de uma imunoglobulina heteróloga anti IgG murino conjugadas a uma enzima e por fim adição de um substrato da enzima para visualização da reação. Para a padronização deste ELISA, foram avaliados qual a concentração ideal de CML-HSA a ser imobilizado na placa, que diluição dos soros deve ser empregada para se conseguir a detecção da toxina de interesse e qual a concentração de mAb é capaz de detectar de forma satisfatória CML nesses soros. Esses parâmetros foram analisados a fim de obter as melhores condições e reprodutibilidade do ensaio.

Primeiramente, diferentes concentrações da proteína glicada CML-HSA foram imobilizadas na placa (1-40 $\mu$ g/mL). Como critério de escolha da melhor concentração foram adotados os valores de absorbâncias resultantes do ELISA. Absorbâncias acima 1 sugerem um excesso de proteína o que poderia induzir a ligações inespecíficas e absorbâncias abaixo de 1 podem não gerar resultados confiáveis. Sendo assim a concentração de 10 $\mu$ g/mL de CML-HSA foi estabelecida como sendo a melhor por apresentar absorbância em torno de 1 (Figura 10A).

O próximo parâmetro a ser avaliado foi a concentração ideal de anticorpo. A placa foi então imobilizada com CML-HSA na concentração já estabelecida de 10 $\mu$ g/mL e diferentes concentrações de mAb 2D6G2 (0,03-1 $\mu$ g/mL) foram testadas. Concentrações muito elevadas ou muito baixas para ensaios de competição não favorecem bons resultados ou por excesso ou por falta de anticorpos por isso o ideal é um equilíbrio. Com experiência do nosso grupo de pesquisa sabemos que absorbâncias próximas a 0,5 favorecem o equilíbrio na quantidade de anticorpos e por esta percepção a concentração de 0,1 $\mu$ g/mL foi selecionada (Figura 10B).

O último passo para a padronização do ensaio foi o estabelecimento de uma diluição ótima de soro. Realizou-se diluição seriada do soro começando com 1:10 até 1:160. Verificando a Figura 10C a diluição de 1:10 foi escolhida por apresentar o melhor resultado de inibição permitindo uma maior sensibilidade ao método.



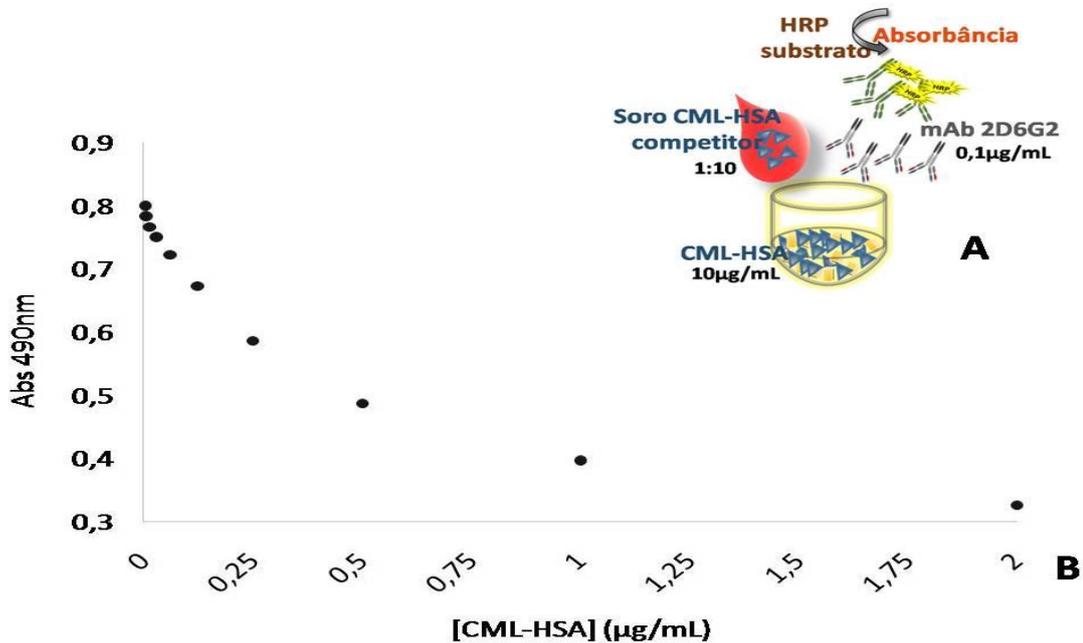
**Figura 10. Otimização dos parâmetros para o método de ELISA competitivo.** (A) Estabelecimento das concentrações de CML-HSA imobilizado na placa. (B) Titulação do anticorpo monoclonal 2D6G2 frente HSA-CML. A placa foi imobilizada com 10µg/mL de HSA-CML. O anticorpo monoclonal foi preparado a uma concentração de 1 µg/mL e titulado. (C) Diluição do soro de paciente com DRC. Diferentes diluições foram testadas variando de 1:10 a 1:160.

#### 5.4.1 Caracterização do mAb 2D6G2 frente aos soros de pacientes com DRC

Após a otimização desses vários parâmetros um ensaio de ELISA de competição foi estabelecido no qual a concentração de 10 µg/mL de CML-HSA é empregada para imobilização, concentração de 0,1 µg/mL de mAb 2D6G2 para a detecção e diluição do soro de 1:10 (Figura 11A).

A primeira etapa para avaliar os soros dos pacientes com DRC é o estabelecimento de uma curva padrão de CML, para tanto um soro de indivíduo saudável foi contaminado com concentrações conhecidas de CML-HSA (0,25 - 2,0 µg/mL). Este soro contaminado experimentalmente foi diluído 1:10 e pré incubado com o mAb 2D6G2 (0,1 µg/mL). Paralelamente a placa já havia sido imobilizada com CML-HSA (10 µg/mL). Após a pré incubação, esta solução de soro na presença do anticorpo monoclonal foi adicionada a placa de ELISA. O resultado observado na Figura 11B

mostra que o ensaio foi sensível na detecção das diferentes concentrações encontradas no soro contaminado experimentalmente.



**Figura 11. Detecção de CML-HSA sintetizado por ELISA competitivo utilizando mAb 2D6G2.** (A) Curva padrão de concentrações conhecidas de CML-HSA. Os resultados são expressos como diminuição da absorvância correlacionada com o aumento de competidor CML-HSA. (B) Princípio do ensaio. CML-HSA (10 µg/mL) foi imobilizada na placa. A amostra a ser testada (CML-HSA 0,4-200 ng) foi misturada com 0,1 µg/mL de anticorpo anti-CML mAb 2D6G2. Uma porção da mistura (100 µL) foi adicionada à placa preparada acima. As reações foram confirmadas através da adição de anti-imunoglobulina murina marcada.

O estabelecimento de uma curva de concentrações conhecidas de CML-HSA e a relação direta com as absorvâncias (Figura 11B) permitiu análises de correlações entre absorvâncias, concentrações conhecidas de CML e dosagem de CML em amostras biológicas.

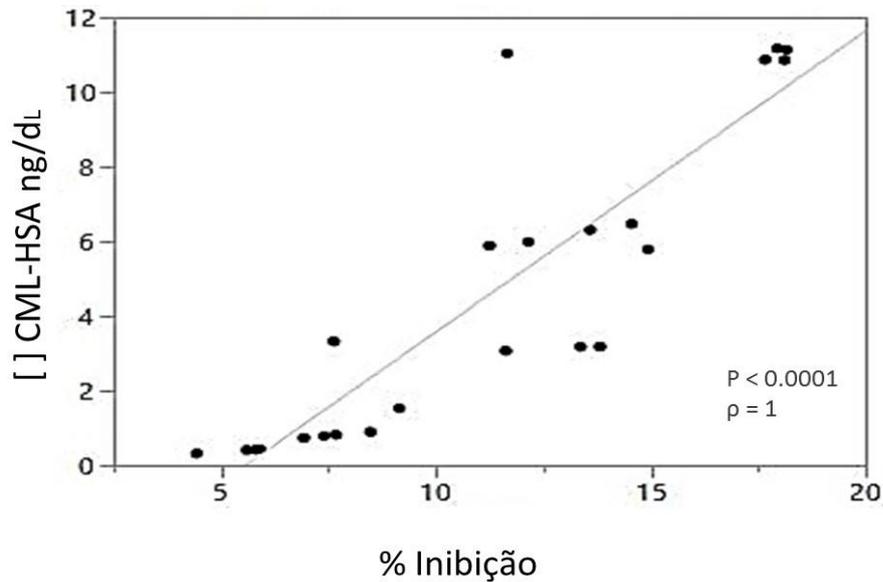
Estabelecida a curva para futuras correlações o próximo passo foi a validação do ensaio com uma *Coorte* de 25 pacientes em diferentes estágios de DRC. Os soros dos pacientes foram caracterizados e classificados de acordo com a TFG. Os pacientes foram distribuídos em DRC estágios 1-5. As características clínicas da população estudada podem ser observadas na tabela 4.

**Tabela 4.** Características clínicas da população estudada.

Estágio DRC	TFG (MDRD) mL/min/1,73m <sup>2</sup>	CREATININA (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)	HB glicada	FÓSFORO (mg/dL)	CÁLCIO (mg/dL)
1	105,9	1	4,6	-	4,3	10,5
1	91,18	0,86	5	-	3,9	10,4
1	157,3	0,5	2,9	-	4,8	8,9
1	94,18	0,9	4,7	11,9	4	10,3
1	100,71	0,8	5,4	11,66	4,8	9,5
2	70,75	1,1	5,1	-	4	10,9
2	64,79	1,2	4,7	6,3	3,8	10,2
2	67,65	0,9	4	10,44	3,3	9,7
2	66,79	0,92	4,3	0	4,6	10,2
2	70,14	1,09	4,6	10,69	3,9	1
3	42,44	1,3	4,3	-	3,3	10,4
3	32,71	2,1	4,7	-	3,5	10,4
3	42,1	2	4,4	-	3,7	1,13
3	40,2	1,8	4,5	-	4,9	10,2
3	54,23	1,4	4,7	5,9	3,2	9,3
4	21,98	2,42	4,3	7,7	4,8	9,6
4	22,72	3	4,4	-	4,3	8,8
4	24,39	3,4	4,3	7,9	3,6	8,3
4	25,45	2,1	3,8	-	4,9	9,1
4	27,78	1,9	3,9	-	3,7	9,4
5	8,75	7,6	4	-	6,8	7,7
5	11,36	4,9	4,2	9,72	5,8	9
5	12,69	5	5	5,62	5,3	8,8
5	15,54	4,4	3,2	8,38	5,8	7,1
5	15,78	4,8	4,1	-	7,6	7,6

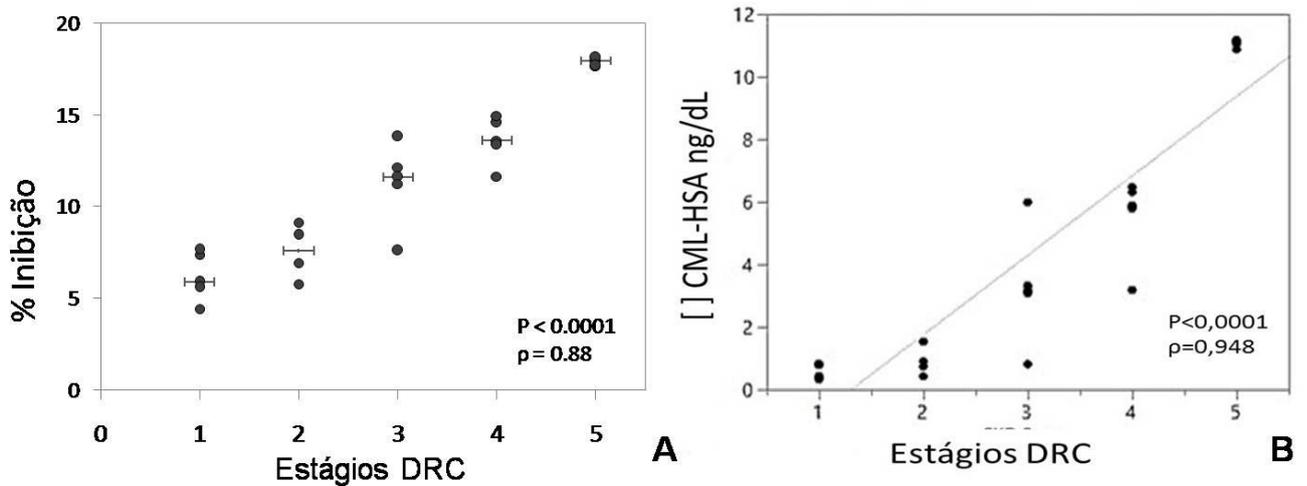
Os soros dos pacientes em diferentes estágios da DRC foram analisados pelo ensaio de ELISA de competição aqui padronizado. As análises tiveram como base o princípio deste ELISA, ou seja, qual a capacidade de cada soro em inibir a ligação do anticorpo monoclonal mAb 2D6G2 à molécula de CML-HSA imobilizada na placa. Quer dizer que quanto mais um soro é capaz de inibir essa ligação mais o anticorpo está se ligando a componentes neste soro (neste caso quanto maior a inibição sugere-se maior concentração de CML circulante). É possível observar na Figura 12 que o soro dos 25 pacientes DRC apresentaram diferentes porcentagens de inibição detectadas pelo ensaio de ELISA. Com o auxílio da curva padrão de CML estabelecida anteriormente foi possível correlacionar essas porcentagens de inibição com a concentração de CML circulante encontrada em cada um desses soros (Figura 12). Esses dados sugerem que cada soro independente do estágio que se encontra apresenta níveis de CML diferentes. O limite de detecção de CML neste ensaio foi de 0,4 ng/dL, o que equivale a 5% de inibição (Figura 12). Neste ELISA competitivo, 20%

de inibição corresponde a 12ng/dL de HSA-CML, esta concentração corresponde ao que se observa em pacientes com fases mais avançadas do DRC.



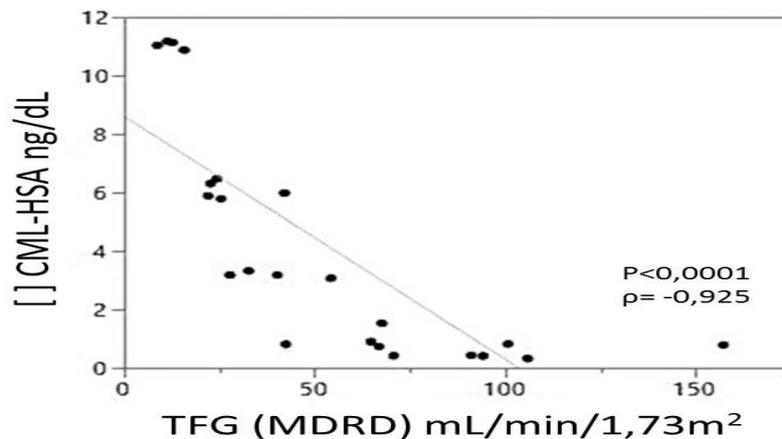
**Figura 12. Curva correlacionando inibição e concentração de HSA-CML.** Para o ELISA de competição a placa foi imobilizada com 10µg/mL de CML-HSA. O soro dos pacientes foi diluído 1:10 e incubado durante 120 min com o mAb 2D6G2. Após adição dessa solução na placa a reação foi evidenciada com anti-imunoglobulina murina marcada com peroxidase.

Quando estratificamos esses soros de acordo com o estágio da DRC que cada paciente se encontra e correlaciona-se com a porcentagem de inibição, verifica-se que quanto maior a capacidade de inibição do soro mais avançado é o estágio de DRC do paciente, esta correlação está evidenciada na Figura 13A. Foi possível também a quantificação de CML usando a curva padrão e com esta quantificação observou-se uma correlação direta na qual quanto maior a concentração de CML-HSA detectável nos soros mais avançado o estágio da DRC do paciente (Figura 13B).



**Figura 13. Detecção da CML em soro de paciente DRC.** (A) Correlação entre os estágios da DRC e a capacidade de inibição de cada soro em ensaios de ELISA de competição. Os resultados são expressos como inibição crescente correlacionada com o aumento de CML presente nos soros avaliados. (B). Correlação entre os estágios de DRC e concentração CML.

Além da detecção, quantificação de CML nos soros e correlação com os estágios da DRC, a correlação com a TFG também foi analisada. Como já citado anteriormente a TFG é utilizada para a estratificação dos pacientes nos diferentes estágios e quanto menor a taxa de filtração maior o acúmulo de substâncias que acabam tornando-se tóxicas, nesse sentido observou-se uma correlação inversa entre os níveis séricos CML e a taxa de filtração glomerular (Figura 14), sendo evidente que quanto menor a TFG maior a concentração de CML, mostrando uma correlação inversa.



**Figura 14. Detecção de CML-HSA em soros de pacientes e TFG.** Correlação entre os níveis séricos de CML-HSA e TFG.

A Tabela 5 resume as correlações entre as concentrações de CML-HSA e os parâmetros bioquímicos das amostras de soro analisadas. As concentrações de CML-HSA foram diretamente relacionadas com os estágios de DRC, sendo maiores nos estágios mais avançados de DRC. Houve uma correlação significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis séricos de CML com creatinina, fósforo, e glicose, assim como uma correlação negativa com a TFG e cálcio.

**Tabela 5** - Correlação de CML-HSA com características bioquímicas do soro de pacientes com DRC.

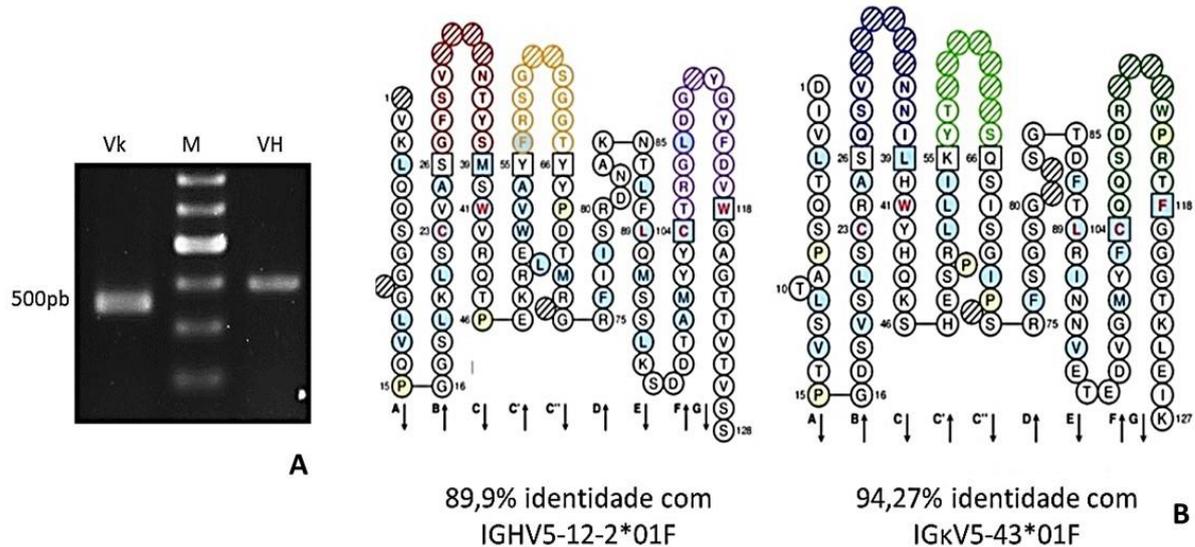
	CML-HSA		TFG (MDRD) mL/min/1.73m <sup>2</sup>	
	<b>Spearman <math>\rho</math></b>	<b>Valor P</b>	<b>Spearman <math>\rho</math></b>	<b>Valor P</b>
DRC	0,95	<0,0001	-0,98	<0,0001
TFG (MDRD) mL/min/1.73m <sup>2</sup>	-0,92	<0,0001	NS	NS
Creatinina (mg/dL)	0,91	<0,0001	-0,96	<0,0001
Albumina (g/dL)	-0,36	NS	0,37	NS
Fósforo (mg/dL)	0,45	<0,02	-0,46	<0,024
Cálcio (mg/dL)	-0,79	<0,0001	0,62	<0,0012
Glicose	0,44	<0,033	-0,33	NS

\*NS = não significativo

### 5.5 Análise de cDNA dos domínios VH e VL do mAb 2D6G2

Antes de realizar novos imunoenaios funcionais, o cDNA codificante do anticorpo 2D6G2 para os domínios IGH-V e IGKappa-V foi amplificado por PCR a partir de duas preparações distintas do RNA isolado do hibridoma 2D6G2 com intuito de assegurar correta subclonagem como também obter maiores informações da estrutura 2D dos domínios variáveis das cadeias leve e pesada do anticorpo. Os produtos de RT-PCR, VH e VL, apresentaram bandas de aproximadamente 350bp após análise eletroforética em gel de agarose (Figura 15A). O sequenciamento e análise *in silico* indicaram que as sequências encontradas para IGH-V e IGKappa-V do mAb 2D6G2 foram únicas. As regiões de framework (*complementary determining*

regions -CDR) foram facilmente identificadas. Nenhum dos resíduos conservados foram mutados nas regiões de *framework*, o que sugere que as sequências foram corretamente rearranjadas e funcionais. O gene VH pertence à família murino IGHV5 e mostrou 90% de identidade com a sequência da proteína de *Mus musculus* IGHV 5-12-2 \* 01, enquanto o gene VL pertencia à família IGKV5 com identidade de 94% com *Mus musculus* IGKappa V5-43 \* 01 (Figura 15B).



**Figura 15. Clonagem de cDNA que codifica os domínios variáveis do anticorpo mAb2D6G2.** (A) eletroforese em gel de agarose de cDNA que codifica região variável de cadeia leve IGKV (canaleta Vk) e região variável de cadeia pesada IGHV (canaleta VH). M: 100-bp DNA ladder. (B) Colar de pérolas (do francês "*Collier de perles*") dos domínios variáveis do anticorpo mAb 2D6G2.

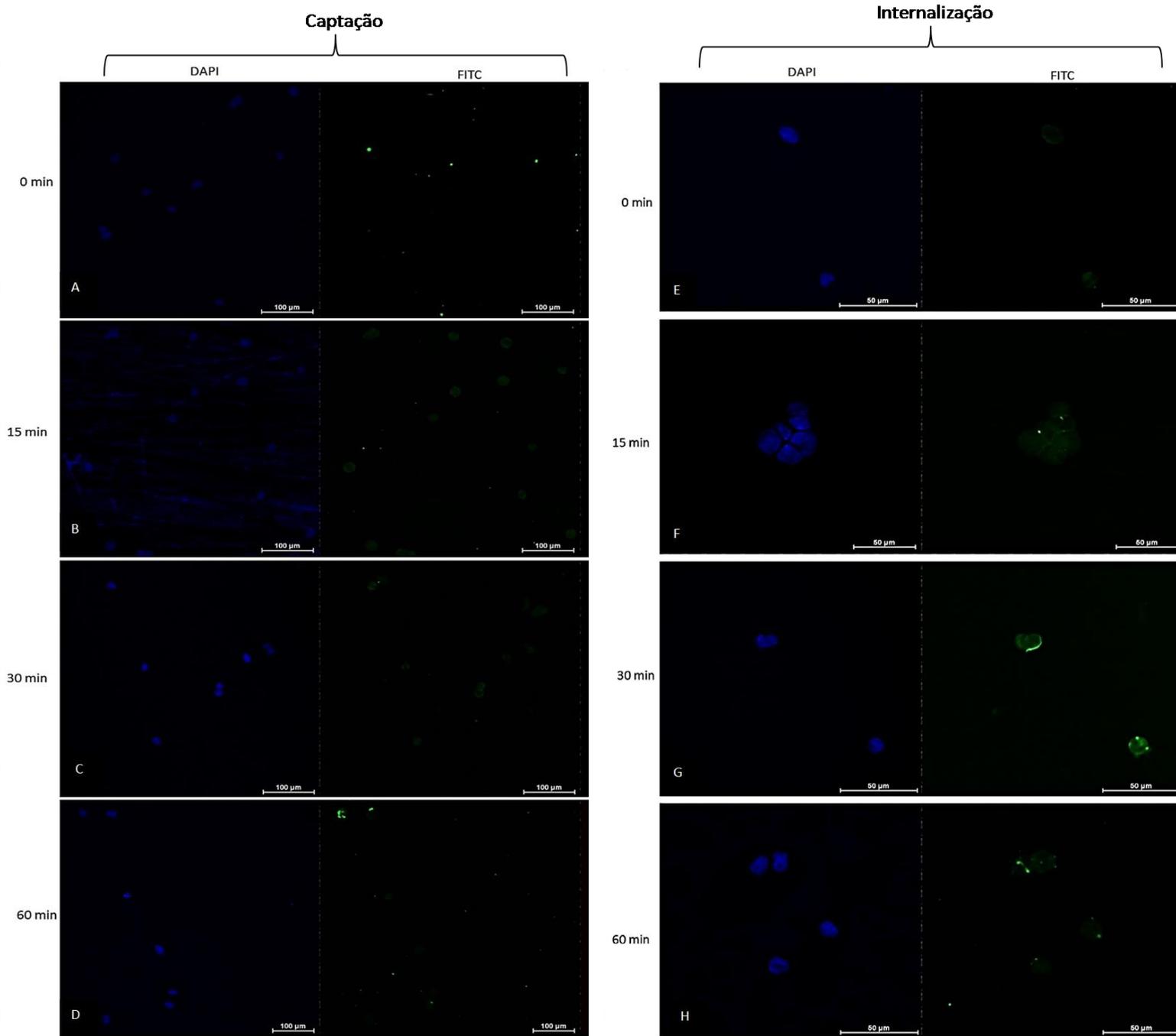
## 5.6 Avaliação da interação de CML-HSA com células THP-1

Além da padronização de um imunoenensaio competitivo o anticorpo mAb 2D6G2 foi utilizado como ferramenta para acompanhar a interação e o tráfego da toxina CML-HSA em células de linhagem monocítica THP-1. Essa linhagem celular foi empregada por representar um bom modelo de estudo em monócitos, os quais estão em contato constante com as toxinas urêmicas no sangue dos pacientes com DRG.

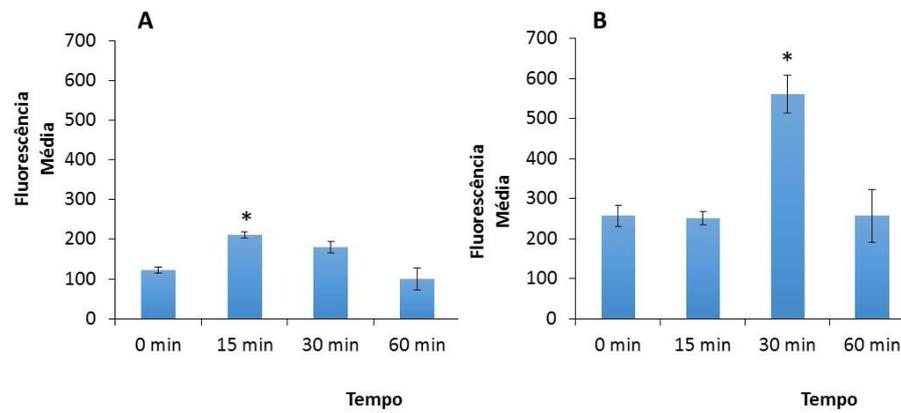
Verificou-se *in vitro* que as células tratadas com HSA-CML em cinética de tratamento foram capazes de captar e internalizar essa toxina. A captação de CML-HSA varia sutilmente ao longo do tempo de experimentação (Figura 16A, B, C e D). No entanto foi possível visualizar o aumento da internalização dessas moléculas de maneira tempo-dependente, atingindo o número máximo de moléculas internalizadas

em 30 minutos (Figura 16E, F, G e H). Após esse período ocorreu a diminuição da internalização como consequência a uma possível via de internalização e degradação.

As medidas de fluorescência foram avaliadas através do programa *NIS-Elements Viewer* 4.20 e o resultado encontra-se ilustrado na Figura 17 a qual confirma as informações citadas anteriormente. As células THP-1 em 15 minutos de tratamento com um excesso de HSA-CML apresentaram o máximo de captação desta toxina com decréscimo passados 30 minutos sugerindo que houve um reconhecimento pelos receptores destas células (FIGURA 16B). Já a internalização foi mais evidente em 30 minutos decaindo após 60 minutos (Figura 16G).



**Figura 16. Avaliação de CML-HSA em células THP-1.** As células THP-1 foram tratadas com 80 µg/mL de CML-HSA durante diferentes tempos (A e E) 0 minutos, (B e F) 15 minutos, (C e G) 30 minutos e (D e H) 60 minutos. Na preparação das lamina para verificar captação de CML as células não foram permeabilizadas (A, B, C e D) e para verificar internalização as células foram permeabilizadas (E, F, G e H). O CML-HSA foi identificado pelo anticorpo mAb 2D6G2 e visualizado por microscopia confocal de fluorescência com anticorpos anti-mouse IgG conjugado à fluoresceína isotiocianato (FITC).



**Figura 17. Quantificação da detecção CML-HSA em células THP-1 através da intensidade de fluorescência.** (A) Detecção de CML-HSA em superfície de células THP-1 (células sem permeabilização de membrana). (B) Detecção de CML-HSA internalizado em células THP-1 (com permeabilização de membrana celular). Onde (\*)  $P < 0,001$  para (A) 15 min vs 0, 15 min vs 60 e (B) 30 min vs 0, 30 min vs 15, 30 min vs 60.

## 6. DISCUSSÃO

A síntese de AGEs está relacionada com várias doenças e a sua dosagem em soro de pacientes desperta grande interesse para fins diagnósticos e terapêuticos. O desenvolvimento de imunoenaios poderia ser uma abordagem valiosa na tentativa de alcançar este objetivo, mas esta estratégia ainda sofre com a falta de anticorpos específicos, muitas vezes limitados a estudos de imunohistoquímica/imunocitoquímica (Makino *et al.*, 1995; Sakata *et al.*, 1998; Koito *et al.*, 2004). Isto pode estar relacionado com características funcionais dos anticorpos desenvolvidos até o momento, os quais não são suficientemente sensíveis impossibilitando o emprego dos mesmos para detecção de AGEs nos diferentes estágios da DRC (Schleicher *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2008).

A concentração de CML está aumentada no soro de pacientes com DRC e também em outras doenças como diabetes que levam a complicações, tais como nefropatia, retinopatia e aterosclerose. Os níveis circulantes dessas moléculas são importantes para elaboração de ensaios sensíveis de imunodeteção bem como para seleção de sondas imunológicas capazes de detectar toxinas urêmicas e correlacionar com os aspectos clínicos (Degenhardt *et al.*, 1998). Nesse sentido a utilização de anticorpos em estratégias imunológicas e bioquímicas para a detecção de CML, vem auxiliando no entendimento da participação destas moléculas na patogênese de diferentes complicações em várias doenças crônicas.

Para produção desses anticorpos específicos emprega-se a tecnologia de hibridomas que apesar de conceitualmente simples, dependendo da complexidade dos sistemas biológicos. A obtenção de mAbs específicos não é tão fácil, pois muitas vezes o alvo antigênico é um hapteno incapaz de iniciar uma resposta imune sozinho. Neste trabalho, o CML foi conjugado a diferentes moléculas carreadoras para induzir resposta imune. As moléculas carreadoras KLH, BSA e HSA foram usadas para síntese de AGEs na presença de ácido glicóxico e o reagente de oxidação NaCNBH<sub>3</sub>, que direcionaram a reação de glicação não enzimática, a fim de produzir o domínio CML. Existem outros reagentes convencionais de acoplamento como EDC, glutaraldeído e BS3, mas a eficiência de ligação desses reagentes permanece em discussão quando o assunto é a indução de anticorpos específicos contra CML (Mera

*et al.*, 2008). A eficiência de glicação foi demonstrada através da mobilidade eletroforética e confirmada por análise de espectrometria de massa (Figura 4), onde foram observadas diferenças na massa molecular entre as proteínas nativas e as proteínas conjugadas. Essas moléculas glicadas foram utilizadas como imunógenos para produção de anticorpos. Além disso, a triagem por ELISA para verificação de reatividade cruzada entre CML-proteína e seus controles (proteína nativa) permitiu a seleção de anticorpos altamente específicos para CML. O anticorpo mAb 2D6G2 foi identificado e selecionado por ser capaz de reconhecer o epítopo CML nas diferentes proteínas glicadas sintetizadas não apresentando reconhecimento frente as proteínas nativas (Figura 9). Esses resultados reforçam a idéia de especificidade deste anticorpo a CML permitindo seu emprego como uma sonda imunológica para analisar soros de pacientes com DRC. Após a validação de características como concentração de antígeno, concentração de anticorpos e diluição de soro de paciente foi possível a padronização de um teste (Figura 10). O ensaio de ELISA competitivo aqui desenvolvido apresentou sensibilidade de detecção de CML dentro de um intervalo linear de 0,4 a 200 ng/dL e limite de detecção de 0,4 ng/dL (Figura 11). Adicionalmente, os resultados obtidos se correlacionaram com o perfil de pacientes DRC em diferentes estágios que apresentam deficiência na remoção destas moléculas (Figura 13). Estas observações sugerem que o anticorpo monoclonal 2D6G2 é um candidato valioso para o desenvolvimento de kits de diagnóstico com capacidade de detecção e quantificação de CML em amostras biológicas.

Já se tem relatos do emprego de anticorpos como ferramenta para detecção de AGEs na pesquisa e na área clínica. Como descrito por Sakata *et al.* (1998), anticorpos policlonais anti-CML foram capazes de identificar essa molécula em cortes histológicos de placa aterosclerótica (Vytásek *et al.*, 2010) , com auxílio de anticorpos policlonais evidenciou que os níveis de CML no soro de ratos em idade avançada encontra-se mais elevado do que em ratos jovens. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Nagai e colaboradores (2008) nos quais foram utilizados anticorpos monoclonais, verificou-se que o conteúdo de CML em soro de pacientes em diálise peritoneal e pacientes em hemodiálise são maiores do que os valores encontrados para indivíduos saudáveis. Degenhardt *et al.* (1998), demonstraram que os níveis de CML são duas vezes maiores nos pacientes em hemodiálise quando comparados a controles saudáveis. Corroborando com esses achados (Schleicher *et*

*al.*, 1997) e (Choi e Lim, 2009), detectaram CML em soro de pacientes com artrite reumatóide através de imunoensaio de competição com um anticorpo anti-CML (Makita *et al.*, 1992). Neste mesmo estudo os níveis encontrados de CML em pacientes diabéticos e soro urêmico foram duas ou três vezes maiores do que em indivíduos saudáveis, no entanto neste estudo não foi possível correlação dos níveis de toxinas com os diferentes estágios das doenças.

Um número crescente de técnicas imunológicas e bioanalíticas vêm sendo desenvolvidas para medir de maneira eficiente os níveis de AGEs. Contudo a falta de padronização entre os métodos, os quais não permitem uma comparação consistente entre os resultados (Ashraf *et al.*, 2015). Um exemplo, é a inconsistência na detecção de AGEs por imunoensaios demonstrada pelo emprego do anticorpo monoclonal 6D12 (primeiro anticorpo monoclonal produzido para AGEs) (Horiuchi *et al.*, 1991) caracterizado e empregado para a detecção de resíduos de CML e que apresentou reatividade cruzada frente o domínio CEL (Izuhara *et al.*, 1999; Sanaka *et al.*, 2002; Koito *et al.*, 2004).

Diversas estratégias podem ser consideradas para melhorar ainda mais a sensibilidade do ensaio aqui desenvolvido. Como uma primeira possibilidade, o anticorpo mAb 2D6G2 pode ser biotinizado para amplificar o sinal no imunoensaio (Sarkar *et al.*, 2012). O mAb 2D6G2 poderia ainda ser produzido como uma molécula recombinante marcada com uma enzima. (Alvarenga *et al.*, 2014), propuseram a aplicação de tecnologias de anticorpos recombinante para produção de uma sonda imune bivalente que consiste dos domínios variáveis de um anticorpo fusionado a um marcador enzimático, tal como a fosfatase alcalina que possibilitaria o aumento de sensibilidade em imunoensaios. A mesma estratégia pode ser usada aqui, porque os cDNA que codificam os domínios variáveis do mAb 2D6G2 foram clonados e sequenciados, que vem de encontro com a recomendação recente de pesquisadores que apontaram a necessidade de padronizar os anticorpos utilizados na pesquisa, a fim de produzir moléculas de ligação mais específicas (Bradbury e Plückthun, 2015).

Os níveis de AGEs e outras toxinas circulantes encontram-se aumentados em diferentes condições patológicas tais como diabetes, doença cardiovascular e principalmente na DRC. Entretanto os mecanismos de interação, metabolização e degradação dessas moléculas não foram totalmente elucidados. Alguns mecanismos

de interação das toxinas uremicas em diferentes modelos celulares vem sendo estudados por vários grupos. No trabalho de Rempel e colaboradores (2015), foi demonstrado que os AGEs foram capazes de aumentar a expressão do receptor RAGE em células endoteliais e essa interação induziu também o aumento da produção de células pró inflamatórias. A interação AGE-RAGE modula as vias pró-inflamatórias, com a ativação da transcrição e alteração da expressão de vários mediadores inflamatórios tais como citocinas, que desencadeiam reações inflamatórias (Ramasamy *et al.*, 2011). Esta interação com o receptor RAGE é a principal hipótese atribuída aos efeitos adversos relacionados a CML os quais induzem o aumento dos marcadores inflamatórios levando a alterações patológicas como aterosclerose, inflamação crônica.

Diferentes toxinas urêmicas podem ativar diversas vias de sinalização nos mais variados modelos celulares. Para melhor entender os processos patológicos desencadeados pela presença de CML-HSA o mAb 2D6G2 foi utilizado como ferramenta em ensaios celulares. Foram realizados ensaios preliminares com linhagem de células monocíticas THP-1 expostas a CML e avaliação da interação e internalização das mesmas. As células exposta a toxina durante 15 minutos mostra a captação sugerindo ligação ao receptor. Após 30 minutos a CML é internalizada e passados 60 minutos ocorre a degradação (Figuras 16 e 17).

Esses dados apoiam a hipótese de que duas vias podem estar sendo ativadas (Araki *et al.*, 1995; Vlassara *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Chavakis *et al.*, 2003). A primeira hipótese é a interação de CML-HSA via receptor RAGE. Essa interação resulta em ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), induzindo expressão de mais receptores e produção de citocinas pró inflamatórias. Esse receptor é expresso em todas as células envolvidas com aterogênese, incluindo monócitos, macrófagos e células endoteliais (Ohashi *et al.*, 2010; Pollreisz *et al.*, 2010; Akirav *et al.*, 2012)

Em resposta a essa sinalização pode ocorrer disfunção endotelial, adesão plaquetária, proliferação celular tendo como consequência enrijecimento arterial, formação de placas ateroscleróticas que conduzem a desfechos como doenças cardiovasculares e inflamação crônica (Falcone *et al.*, 2013; Stinghen *et al.*, 2016).

Em contraste a interação AGE-RAGE uma segunda possibilidade é a interação dos AGEs via receptores AGE-R1 e AGE-R3. Esses receptores podem competir com

outros receptores como RAGE e ainda promover a inibição da sinalização da via de estresse oxidativo mediada por AGE. Essa interação mostra efeito oposto a sinalização ativada pelos receptores RAGE (Vlassara *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2012; Menini *et al.*, 2013).

A interação AGE-R1 e AGE-R3 reduz a resposta inflamatória por supressão da via induzida por AGE-RAGE. Esses receptores ligam-se aos AGEs circulantes e ativam a via endocítica. O receptor e a toxina são internalizados juntos, ocorre o processamento pelo endossomo, a mudança de pH faz com que receptor-toxina se desliguem e este é reciclado voltando para a membrana. O endossomo contendo a toxina é fusionado ao lisossomo onde ocorre a degradação do AGEs em peptídeos que são liberados para serem eliminados via renal. Além disso, essa competição de ligação entre receptores pode dificultar a ativação via AGE-RAGE que leva ao aumento de fatores de transcrição e ao invés disso direcionar ao aumento de interação entre outros receptores levando a uma maior internalização e degradação de AGEs (Sorkin e Von Zastrow, 2009; Platta e Stenmark, 2011; Grimm *et al.*, 2012)

Existem fortes evidências de que em condições basais AGE-R1 e AGE-R3 apresentam alta afinidade de ligação a AGEs (Vlassara e Palace, 2002), em contraste os receptores RAGE não são expressos em quantidade significativas nessas mesmas condições (Figarola *et al.*, 2007). Assim assume-se que a via AGE-R1 e AGE-R2 inibem a via de sinalização do estresse oxidativo ativada pela interação de RAGE-AGEs porque ocorre competição com o receptor. Ainda existe a hipótese de que formas solúveis de RAGE (sRAGE) também possam atuar como inibidores de AGEs. Além disso, essa competição de ligação entre receptores pode dificultar a ativação via RAGE-AGEs promovendo o aumento de interação entre outros receptores levando a uma maior internalização e degradação de AGEs (Horiuchi *et al.*, 2003)

Como já mencionado interação de AGEs com diferentes receptores em diferentes células e tecidos já foi identificada mas a internalização e os papéis fisiológicos dessas interações ainda não são totalmente compreendidos necessitando de mais estudos para uma melhor entendimento desses processos. Em relação ao entendimento da captação e internalização de AGEs o emprego do anti-CML-HSA mAb 2D6G2 para acompanhar o tráfego dessa toxina, pode ser uma abordagem promissora já que os trabalhos que descrevem os mecanismos de sinalização

baseiam-se em avaliações de bloqueio/detecção de receptor, modelos celulares com deleção ou silenciamento genético, toxina marcada entre outras metodologias.

Realizamos nesta última etapa ensaios preliminares em células THP-1 expostas a toxinas e avaliamos a internalização das mesmas. Os resultados obtidos permitiram desenhar hipóteses, as quais se provadas, poderão corroborar com achados da literatura, mas dessa vez empregando anticorpos contra as toxinas e não dirigidos para os receptores. Nesse sentido, novas perspectivas de abordagem poderão ser iniciadas com a utilização de tais bioferramentas para o estudo e vislumbrar até mesmo o bloqueio dos efeitos tóxicos provocados pela exposição ao excesso de CML, além da detecção e quantificação do mesmo.

## 7. CONCLUSÕES

- As moléculas de CML-proteínas foram sintetizadas com êxito, fato que pode ser confirmado através do perfil eletroforético e espectrometria de massa em comparação ao controle (proteína nativa);
- Todas as CML-proteínas sintetizadas foram capazes de induzir a produção de anticorpos policlonais, com maior eficiência de CML-KLH, que induziu produção de anticorpos policlonais altamente reativos, mais específicos, e com menor reatividade cruzada frente aos controles (proteína nativa);
- Quatorze hibridomas secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra o domínio CML foram obtidos, sendo o mAb 2D6G2 escolhido por apresentar alta reatividade; estruturas comuns entre as moléculas CML-proteína foram reconhecidas pelos anticorpos monoclonais sugerindo o caráter de especificidade contra o domínio CML;
- As sequências encontradas para IGH-V e IGKappa-V do mAb 2D6G2 foram únicas. Nenhum dos resíduos conservados foram mutados nas regiões de framework, o que sugere que as sequências foram corretamente rearranjadas e funcionais.
- O ensaio de ELISA competitivo apresentou alta sensibilidade na detecção de CML, sendo capaz de detectar e correlacionar níveis de CML nos pacientes em diferentes estágios da DRC.
- O mAb 2D6G2 pode ser empregado *in vitro* em ensaios celulares para acompanhar o tráfico da molécula CML.

## 8. PERSPECTIVAS

O estudo mais detalhado desses anticorpos permitirá a identificação e caracterização de CML, como também, seu uso em metodologias de depuração/bloqueio de tais toxinas, de modo a promover melhorias no tratamento relacionado à DRC.

Utilização dos insumos produzidos no desenvolvimento de imunoteste bem como o emprego das bioferramentas produzidas na adsorção e/ou neutralização das toxinas estudadas ou ainda a produção de um kit diagnóstico na tentativa de identificar e acompanhar o paciente renal crônico.

Além disso, esperamos poder caracterizar em ensaios *in vitro* o potencial de bloqueio e/ou neutralização dos anticorpos anti-CML produzidos frente a efeitos citotóxicos provocados por tais toxinas.

Avaliar especificidade do mAb frente a outros domínios de AGEs.

Avaliar aumento da sensibilidade do método por meio de modificações na molécula do anticorpo (biotinilação, fragmento de anticorpo recombinante marcado)

Confirmar a via de degradação ou mecanismos celulares envolvidos na captação e internalização dessas toxinas, ativação da célula e manutenção/inibição do processo inflamatório.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, Jan 2005. ISSN 0168-8227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620429> >.

AKIRAV, E. M. et al. RAGE expression in human T cells: a link between environmental factors and adaptive immune responses. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34698, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22509345> >.

ALVARENGA, L. M. et al. Production of monoclonal antibodies capable of neutralizing dermonecrotic activity of *Loxosceles intermedia* spider venom and their use in a specific immunometric assay. **Toxicon**, v. 42, n. 7, p. 725-31, Dec 2003. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757202> >.

\_\_\_\_\_. Colorimetric engineered immunoprobe for the detection and quantification of microcystins. **J Immunol Methods**, v. 406, p. 124-30, Apr 2014. ISSN 1872-7905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607607> >.

ARAKI, N. et al. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. **Eur J Biochem**, v. 230, n. 2, p. 408-15, Jun 1995. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7607209> >.

ASHRAF, J. M. et al. Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. **IUBMB Life**, v. 67, n. 12, p. 897-913, Dec 2015. ISSN 1521-6551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597014> >.

ASTOR, B. C.; BHAVSAR, N. A. Is there something better than the best marker of kidney function? **J Am Soc Nephrol**, v. 22, n. 10, p. 1779-81, Oct 2011. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903998> >.

BADENHORST, D. et al. Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodelling in hypertension in rats. **Cardiovasc Res**, v. 57, n. 3, p. 632-41, Mar 2003. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618225> >.

BAILIE, G. R.; JOHNSON, C. A. Comparative review of the pharmacokinetics of vitamin D analogues. **Semin Dial**, v. 15, n. 5, p. 352-7, 2002 Sep-Oct 2002. ISSN 0894-0959. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358640> >.

BASTOS, M. G.; BREGMAN, R.; KIRSZTAJN, G. M. [Chronic kidney diseases: common and harmful, but also preventable and treatable]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 2, p. 248-53, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 0104-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20499004> >.

BECKER-FINCO, A. et al. Physiological, morphological, and immunochemical parameters used for the characterization of clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*.

**Parasitology**, v. 140, n. 3, p. 396-405, Mar 2013. ISSN 1469-8161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23137846> >.

BIERHAUS, A. et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res**, v. 37, n. 3, p. 586-600, Mar 1998. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9659442> >.

BOWLING, C. B.; MUNTNER, P. Epidemiology of chronic kidney disease among older adults: a focus on the oldest old. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 67, n. 12, p. 1379-86, Dec 2012. ISSN 1758-535X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960475> >.

BRADBURY, A.; PLÜCKTHUN, A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. **Nature**, v. 518, n. 7537, p. 27-9, Feb 2015. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25652980> >.

CAI, W. et al. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 39, p. 15888-93, Sep 2012. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22908267> >.

CARTER, P. J. Potent antibody therapeutics by design. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 5, p. 343-57, May 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16622479> >.

CHARISSOU, A.; AIT-AMEUR, L.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. **J Chromatogr A**, v. 1140, n. 1-2, p. 189-94, Jan 2007. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174315> >.

CHAVAKIS, T. et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. **J Exp Med**, v. 198, n. 10, p. 1507-15, Nov 2003. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623906> >.

CHOI, Y. G.; LIM, S. Characterization of anti-advanced glycation end product antibodies to nonenzymatically lysine-derived and arginine-derived glycated products. **J Immunoassay Immunochem**, v. 30, n. 4, p. 386-99, 2009. ISSN 1532-4230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19739013> >.

CORESH, J. et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Am J Kidney Dis**, v. 41, n. 1, p. 1-12, Jan 2003. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12500213> >.

DE LIMA, A. O. et al. Population screening for chronic kidney disease: a survey involving 38,721 Brazilians. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27 Suppl 3, p. iii135-8, Oct 2012. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22498917> >.

DEGENHARDT, T. P.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 44, n. 7, p. 1139-45, Nov 1998. ISSN 0145-5680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9846896> >.

EL NAHAS, M. Cardio-Kidney-Damage: a unifying concept. **Kidney Int**, v. 78, n. 1, p. 14-8, Jul 2010. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445499> >.

FALCONE, C. et al. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary atherosclerosis: possible correlation with clinical presentation. **Dis Markers**, v. 35, n. 3, p. 135-40, 2013. ISSN 1875-8630. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167358> >.

FIELDS, C. et al. Creation of recombinant antigen-binding molecules derived from hybridomas secreting specific antibodies. **Nat Protoc**, v. 8, n. 6, p. 1125-48, Jun 2013. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680984> >.

FIGAROLA, J. L. et al. Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 647-55, Mar 2007. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17327432> >.

FOUNDATION, N. K. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Am J Kidney Dis**, v. 39, n. 2 Suppl 1, p. S1-266, Feb 2002. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904577> >.

\_\_\_\_\_. KDOQI Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012 Update. **Am J Kidney Dis**, v. 60, n. 5, p. 850-86, Nov 2012. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23067652> >.

GANSEVOORT, R. T. et al. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. **Kidney Int**, v. 80, n. 1, p. 93-104, Jul 2011. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21289597> >.

GLASSOCK, R. J. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. **J Ren Nutr**, v. 18, n. 1, p. 2-6, Jan 2008. ISSN 1532-8503. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18089436> >.

GRIMM, S. et al. Cathepsins D and L reduce the toxicity of advanced glycation end products. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 6, p. 1011-23, Mar 2012. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22245096> >.

GUGLIUCCI, A.; BENDAYAN, M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. **Diabetologia**, v. 39, n. 2, p. 149-60, Feb 1996. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635666> >.

HAMER, R. A.; EL NAHAS, A. M. The burden of chronic kidney disease. **BMJ**, v. 332, n. 7541, p. 563-4, Mar 2006. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16528062> >.

HEGAB, Z. et al. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. **World J Cardiol**, v. 4, n. 4, p. 90-102, Apr 2012. ISSN 1949-8462. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558488> >.

HEGELE, J.; BUETLER, T.; DELATOUR, T. Comparative LC-MS/MS profiling of free and protein-bound early and advanced glycation-induced lysine modifications in dairy products. **Anal Chim Acta**, v. 617, n. 1-2, p. 85-96, Jun 2008. ISSN 1873-4324. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486644> >.

HIMMELFARB, J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Semin Dial**, v. 22, n. 6, p. 636-43, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1525-139X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20017834> >.

HORIUCHI, S.; ARAKI, N.; MORINO, Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. Evidence for the presence of a common structure. **J Biol Chem**, v. 266, n. 12, p. 7329-32, Apr 1991. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2019568> >.

HORIUCHI, S.; SAKAMOTO, Y.; SAKAI, M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 283-92, Dec 2003. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661091> >.

HUGHSON, M. et al. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. **Kidney Int**, v. 63, n. 6, p. 2113-22, Jun 2003. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753298> >.

IKEDA, K. et al. N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. **Biochemistry**, v. 35, n. 24, p. 8075-83, Jun 1996. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8672512> >.

INKER, L. A. et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **Am J Kidney Dis**, v. 63, n. 5, p. 713-35, May 2014. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24647050> >.

IZUHARA, Y. et al. A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, n. 3, p. 576-80, Mar 1999. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10193802> >.

JAISSON, S.; GILLERY, P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. **Clin Chem**, v. 56, n. 9, p. 1401-12, Sep 2010. ISSN 1530-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20562349> >.

JONO, T. et al. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). **FEBS Lett**, v. 511, n. 1-3, p.

170-4, Jan 2002. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11821070> >.

KASPER, M.; FUNK, R. H. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). **Arch Gerontol Geriatr**, v. 32, n. 3, p. 233-43, Jun 2001. ISSN 0167-4943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395169> >.

KILHOVD, B. K. et al. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. **Diabetes Care**, v. 22, n. 9, p. 1543-8, Sep 1999. ISSN 0149-5992. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10480523> >.

KIRSZTAJN, G. M.; SUASSUNA, J. H.; BASTOS, M. G. Dividing stage 3 of chronic kidney disease (CKD): 3A and 3B. **Kidney Int**, v. 76, n. 4, p. 462-3; author reply 463-4, Aug 2009. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644486> >.

KOITO, W. et al. Conventional antibody against Nepsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) shows cross-reaction to Nepsilon-(carboxyethyl)lysine (CEL): immunochemical quantification of CML with a specific antibody. **J Biochem**, v. 136, n. 6, p. 831-7, Dec 2004. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15671494> >.

LEFRANC, M. P. et al. IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D413-22, Jan 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378316> >.

LEVEY, A. S. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med**, v. 130, n. 6, p. 461-70, Mar 1999. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075613> >.

\_\_\_\_\_. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. **Ann Intern Med**, v. 145, n. 4, p. 247-54, Aug 2006. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16908915> >.

\_\_\_\_\_. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med**, v. 150, n. 9, p. 604-12, May 2009. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19414839> >.

LI, Y. M. et al. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 20, p. 11047-52, Oct 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8855306> >.

MAKINO, H. et al. Ultrastructure of nonenzymatically glycosylated mesangial matrix in diabetic nephropathy. **Kidney Int**, v. 48, n. 2, p. 517-26, Aug 1995. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7564121> >.

MAKITA, Z. et al. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. **J Biol Chem**, v. 267, n. 8, p. 5133-8, Mar 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1371995> >.

MASSRY, S. G. Is parathyroid hormone a uremic toxin? **Nephron**, v. 19, n. 3, p. 125-30, 1977. ISSN 1660-8151. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/895963> >.

MEERWALDT, R. et al. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, v. 7, p. 29, Oct 2008. ISSN 1475-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840258> >.

MENINI, S. et al. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 100, n. 3, p. 472-80, Dec 2013. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975852> >.

MERA, K. et al. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. **J Immunol Methods**, v. 334, n. 1-2, p. 82-90, May 2008. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353354> >.

METCALFE, W. How does early chronic kidney disease progress? A background paper prepared for the UK Consensus Conference on early chronic kidney disease. **Nephrol Dial Transplant**, v. 22 Suppl 9, p. ix26-30, Sep 2007. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998229> >.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch Biochem Biophys**, v. 419, n. 1, p. 1-15, Nov 2003. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568003> >.

NAGAI, R. et al. Immunochemical detection of Nepsilon-(carboxyethyl)lysine using a specific antibody. **J Immunol Methods**, v. 332, n. 1-2, p. 112-20, Mar 2008. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242632> >.

\_\_\_\_\_. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation. **J Clin Biochem Nutr**, v. 55, n. 1, p. 1-6, Jul 2014. ISSN 0912-0009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120273> >.

NASS, N. et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. **Z Gerontol Geriatr**, v. 40, n. 5, p. 349-56, Oct 2007. ISSN 0948-6704. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17943238> >.

NJOROGE, F. G.; FERNANDES, A. A.; MONNIER, V. M. Mechanism of formation of the putative advanced glycosylation end product and protein cross-link 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole. **J Biol Chem**, v. 263, n. 22, p. 10646-52, Aug 1988. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3392032> >.

ODETTI, P. et al. Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. **Diabetes**, v. 41, n. 2, p. 153-9, Feb 1992. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1733803> >.

OHASHI, K. et al. Advanced glycation end products enhance monocyte activation during human mixed lymphocyte reaction. **Clin Immunol**, v. 134, n. 3, p. 345-53, Mar 2010. ISSN 1521-7035. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914138> >.

OHGAMI, N. et al. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. **Ann N Y Acad Sci**, v. 947, p. 350-5, Dec 2001. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795289> >.

\_\_\_\_\_. CD36, serves as a receptor for advanced glycation endproducts (AGE). **J Diabetes Complications**, v. 16, n. 1, p. 56-9, 2002 Jan-Feb 2002. ISSN 1056-8727. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11872368> >.

\_\_\_\_\_. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. **J Biol Chem**, v. 276, n. 16, p. 13348-55, Apr 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278947> >.

OLIVEIRA, M. B.; ROMÃO, J. E.; ZATZ, R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. **Kidney Int Suppl**, n. 97, p. S82-6, Aug 2005. ISSN 0098-6577. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014106> >.

PLATTA, H. W.; STENMARK, H. Endocytosis and signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 4, p. 393-403, Aug 2011. ISSN 1879-0410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474295> >.

POLLREISZ, A. et al. Receptor for advanced glycation endproducts mediates pro-atherogenic responses to periodontal infection in vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 2, p. 451-6, Oct 2010. ISSN 1879-1484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20701913> >.

RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1243, p. 88-102, Dec 2011. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22211895> >.

RUGGENENTI, P.; SCHIEPPATI, A.; REMUZZI, G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. **Lancet**, v. 357, n. 9268, p. 1601-8, May 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377666> >.

SAKATA, N. et al. Immunohistochemical localization of different epitopes of advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. **Atherosclerosis**, v. 141, n. 1, p. 61-75, Nov 1998. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9863539> >.

SANAKA, T. et al. Plasma pentosidine levels measured by a newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure. **Nephron**, v. 91, n. 1, p. 64-73, May 2002. ISSN 1660-8151. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021521> >.

SANO, H. et al. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. **J Biol Chem**, v. 273, n. 15, p. 8630-7, Apr 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535837> >.

SARKAR, S. et al. A bispecific antibody based assay shows potential for detecting tuberculosis in resource constrained laboratory settings. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e32340, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22363820> >.

SCHLEICHER, E. D.; WAGNER, E.; NERLICH, A. G. Increased accumulation of the glycooxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. **J Clin Invest**, v. 99, n. 3, p. 457-68, Feb 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9022079> >.

SCHWEDLER, S. et al. Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or causal relationship? **Kidney Int Suppl**, v. 78, p. S32-6, Feb 2001. ISSN 0098-6577. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168979> >.

SEMBA, R. D. et al. Dietary intake associated with serum versus urinary carboxymethyl-lysine, a major advanced glycation end product, in adults: the Energetics Study. **Eur J Clin Nutr**, v. 66, n. 1, p. 3-9, Jan 2012. ISSN 1476-5640. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792213> >.

SESSO, R. C. et al. 2010 report of the Brazilian dialysis census. **J Bras Nefrol**, v. 33, n. 4, p. 442-7, Dec 2011. ISSN 2175-8239. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189808> >.

SORKIN, A.; VON ZASTROW, M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 9, p. 609-22, Sep 2009. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19696798> >.

STINGHEN, A. E. et al. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. **J Am Soc Nephrol**, v. 27, n. 2, p. 354-70, Feb 2016. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26311460> >.

TAMURA, Y. et al. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. **J Biol Chem**, v. 278, n. 15, p. 12613-7, Apr 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473645> >.

VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney Int**, v. 63, n. 5, p. 1934-43, May 2003. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675874> >.

VANHOLDER, R.; GLORIEUX, G. Introduction: Uremic Toxicity - State of the Art 2014. **Semin Nephrol**, v. 34, n. 2, p. 85-6, Mar 2014. ISSN 1558-4488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26248716> >.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatr Nephrol**, v. 23, n. 8, p. 1211-21, Aug 2008. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18324423> >.

VENKATACHALAM, M. A. et al. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 298, n. 5, p. F1078-94, May 2010. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200097> >.

VLISSARA, H. The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, n. 6, p. 436-43, 2001 Nov-Dec 2001. ISSN 1520-7552. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11757079> >.

VLISSARA, H. et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 11, p. 4483-91, Nov 2009. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19820033> >.

\_\_\_\_\_. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. **Mol Med**, v. 1, n. 6, p. 634-46, Sep 1995. ISSN 1076-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529130> >.

VLISSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J Intern Med**, v. 251, n. 2, p. 87-101, Feb 2002. ISSN 0954-6820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905595> >.

VLISSARA, H.; STRIKER, G. E. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 42, n. 4, p. 697-719, Dec 2013. ISSN 1558-4410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286947> >.

VYTÁSEK, R.; SEDOVÁ, L.; VILÍM, V. Increased concentration of two different advanced glycation end-products detected by enzyme immunoassays with new monoclonal antibodies in sera of patients with rheumatoid arthritis. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 11, p. 83, 2010. ISSN 1471-2474. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433772> >.

WILKER, S. C. et al. Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine. **Anal Biochem**, v. 290, n. 2, p. 353-8, Mar 2001. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237339> >.

WON, K. B. et al. High serum advanced glycation end-products predict coronary artery disease irrespective of arterial stiffness in diabetic patients. **Korean Circ J**, v. 42, n. 5, p. 335-40, May 2012. ISSN 1738-5555. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701499> >.

XUE, J. L. et al. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 12, p. 2753-8, Dec 2001. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11729245> >.

YAMAGISHI, S. et al. Serum or cerebrospinal fluid levels of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products (AGEs) may be a promising biomarker for early detection of Alzheimer's disease. **Med Hypotheses**, v. 64, n. 6, p. 1205-7, 2005. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823718> >.

YEBOAH, F. K.; YAYLAYAN, V. A. Analysis of glycosylated proteins by mass spectrometric techniques: qualitative and quantitative aspects. **Nahrung**, v. 45, n. 3, p. 164-71, Jun 2001. ISSN 0027-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11455782> >.

