

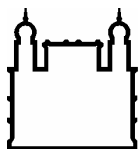
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

MESTRADO EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CD3, ANTI-
CD4 E ANTI-CD8 EM UM TESTE DE IMUNOFENOTIPAGEM PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T, UTILIZANDO A CITOMETRIA
DE FLUXO**

ROBERTO CALADO DA SILVA

**RIO DE JANEIRO
2009**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ROBERTO CALADO DA SILVA

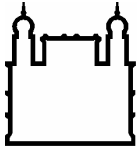
**AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CD3, ANTI-
CD4 E ANTI-CD8 EM UM TESTE DE IMUNOFENOTIPAGEM PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T, UTILIZANDO A CITOMETRIA
DE FLUXO**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

Rio de Janeiro

2009

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos – Biomanguinhos, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Diagnóstica e no Laboratório de Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/ IOC, sob a orientação do Prof. Dr. Hilton Jorge Nascimento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ROBERTO CALADO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-CD3, ANTI-
CD4 E ANTI-CD8 EM UM TESTE DE IMUNOFENOTIPAGEM PARA A
QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T, UTILIZANDO A CITOMETRIA
DE FLUXO**

Orientador: Prof. Dr. Hilton Jorge Nascimento

Dissertação aprovada em 29/06/2009

Examinadores:

Prof. Dr. José Godinho da Silva Júnior
Biomanguinhos/Fiocruz
Presidente da Banca Examinadora

Profª Drª Hilda Rachel Diamond
INCA/Ministério da Saúde

Profª Drª Elaine Cruz Rosas
Farmanguinhos/Fiocruz

Rio de Janeiro
2009

Dedico esta dissertação a minha mãe Cristina, minha avó Nelyta e ao Ruy pelo carinho e cuidado nos momentos mais complicados e a minha esposa Eliane, por fazer parte da minha vida e pelo apoio em cada linha desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Biomanguinhos, em nome do seu diretor Dr. Akira Homma, pela oportunidade e condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Ao meu orientador Dr. Hilton Jorge Nascimento, pelo apoio nos experimentos e na orientação deste trabalho.

A Marli Sidoni, por acreditar desde o início que eu seria capaz de realizar este trabalho, pelo apoio nos experimentos e também pelas orientações, mais do que pertinentes, ao longo desta dissertação.

A Marta Santiago, pelas aulas de citometria e pelo enriquecimento do trabalho com muitas orientações e sugestões.

A Keila Gisele, pela companhia em todos os experimentos de bancada, pela ajuda nas confecção das figuras com todas as reações químicas e pelos momentos engraçados ao longo desses dois anos.

Ao Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/IOC, por ter cedido as amostras de sangue para os experimentos de citometria de fluxo.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que me proporcionaram valiosa gama de novos conhecimentos e os meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

A todos os amigos do MPTI, e especialmente a minha amiga Marcelle Bral por ter dividido as apresentações e trabalhos ao longo desses dois anos de curso.

Aos meus amigos e companheiros do Departamento de Reativos para Diagnóstico e ao LATED pelo incentivo até o final desse trabalho.

“Se chamares experiências às tuas dificuldades e recordares que cada experiência te ajuda a amadurecer, vais crescer vigoroso e feliz, não importa quão adversas pareçam às circunstâncias”.

Henry Miller

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Breve histórico do HIV/AIDS	1
1.2- A Epidemia do HIV/AIDS.....	2
1.2.1- Epidemia Global.....	2
1.2.2- Epidemia no Brasil	3
1.3- Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN-DST/AIDS).....	4
1.3.1- Rede Nacional de Laboratórios para Contagem de Linfócitos T CD4+	5
1.4- O HIV e o sistema imunológico	6
1.5- Evolução da infecção pelo HIV	9
1.6- Diagnóstico	12
1.6.1- Testes sorológicos	12
1.7- Citometria de Fluxo	13
1.7.1- Teste de Imunofenotipagem para quantificação dos linfócitos T CD4+	15
1.8- Anticorpos monoclonais	16
1.8.1- Fluorocromos	19
2- OBJETIVOS	26
2.1- Objetivo geral	26
2.2- Objetivos específicos	26
3- MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1- Obtenção dos anticorpos monoclonais	27
3.2- Quantificação protéica dos anticorpos monoclonais	27
3.3- Concentração dos anticorpos monoclonais.....	27
3.4- Avaliação da homogeneidade protéica dos anticorpos monoclonais	28

3.5- Processos de conjugação dos anticorpos monoclonais a diferentes fluorocromos.....	28
3.5.1- Conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD4 com FITC	28
3.5.2- Conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD3 com R-PE.....	29
3.5.3.- Conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD3 com Cy5.....	31
3.5.4 - Conjugação anticorpo monoclonal anti-CD8 com o Cy5.....	31
3.5.5.- Conjugação anticorpo monoclonal anti-CD4 com o tandem R-PECy7	31
3.6- Determinação da razão molar dos conjugados produzidos em Biomanguinhos.....	33
3.7- Análise dos conjugados produzidos em Biomanguinhos por citometria de fluxo	34
3.8- Casuística	34
3.9- Coleta das amostras	34
3.9.1.- Preparo das amostras.....	34
3.9.2.- Análise estatística	36
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1- Avaliação dos anticorpos monoclonais	37
4.1.1- Quantificação protéica dos anticorpos monoclonais	37
4.1.2- Homogeneidade dos anticorpos monoclonais por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 8-25% (SDS-PAGE).....	38
4.1.3- Concentração dos anticorpos monoclonais.....	40
4.2- Conjugação dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 com fluorocromos.....	40
4.2.1- Conjugados Anti-CD4/FITC.....	41
4.2.2- Conjugado Anti-CD3/R-PE.....	41
4.2.3- Conjugado AntiCD3/Cy5 e Anti-CD8/Cy5	41
4.2.4- Conjugado Anti-CD4/R-PECy7	42
4.3- Análise dos conjugados por citometria de fluxo	43
4.3.1- Conjugado Tritest da BD	43
4.3.2 - Análise dos conjugados Produzidos no LATED - Biomanguinhos	46
4.3.3- Análise comparativa entre o Tritest da BD e os conjugados produzidos em Biomanguinhos.....	55
5- CONCLUSÃO.....	62
6- PERSPECTIVAS	64
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8- Anexo I	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha\beta$	alfa/beta
$\gamma\delta$	gama/delta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígeno
Abs	Absorbância
BD	<i>Becton e Dickinson</i>
CD	Grupo de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
C_L	Cadeia leve
C_H	Cadeia pesada
Cy5	Cianina-5
Cy7	Cianina-7
CIM	Centro de Imunologia Molecular
CF	Correção do fluorocromo
<i>Cut-off</i>	Valor de corte
Da	Daltons
DC	Células dendríticas
DTT	DL-Ditiotreitol
DMSO	Dimetil sulfóxido
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
PE	Ficoeritrina
g/mol	Grama/molaridade

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Ig	Imunoglobulina
IgG,M,A,E	Imunoglobulina G,M,A,E
IRMA	Radioimunométrico
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
KDa	Kilodalton
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mm ³	Milímetro cúbico
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NK	<i>Natural killer</i>
NEM	N-etilmaleimida
nm	Nanômetro
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial hidrogeniônico
PNDST	Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis
Phix	Pentaclorofenol
PD-10	Desalinização protéica
RNA	Ácido ribonucléico
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
SMCC	Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilado
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de Sódio - Eletroforese em gel de poliacrilamida
TA	Temperatura ambiente
TCR	Receptores de células T
UNAIDS	Programa Nacional de HIV/AIDS (<i>United Nations Programme</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Massa de Cy5 utilizada no processo de conjugação com o anticorpo monoclonal anti-CD3 e anti-CD8.....	31
Tabela 4.1- Determinação da concentração protéica dos anticorpos monoclonais enviados por Cuba pela leitura da absorbância a 280 nm.....	37
Tabela 4.2: Estimativa de peso molecular das cadeias polipeptídicas dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 cedidos por Cuba.....	38
Tabela 4.3- Resultado do processo de ultrafiltração dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8.....	40
Tabela 4.4- Cálculo da razão molar dos conjugados anti-CD3Cy5 e do anti-CD8/Cy5.....	42
Tabela 4.5: Dados obtidos através da correlação linear de Pearson, das avaliações dos conjugados de Biomanguinhos das amostras de pacientes HIV+ comparado ao Tritest da BD.....	59
Tabela 4.6: Dados obtidos através da correlação linear de Pearson, das avaliações dos conjugados de Biomanguinhos das amostras de indivíduos normais comparado ao Tritest da BD.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Número estimado de pessoas vivendo com HIV no mundo de 1990 a 2007.....	2
Figura 1.2: Cartograma da Rede Nacional de Laboratórios CD4 ⁺ /CD8 ⁺	5
Figura 1.3: Representação esquemática da ligação APC a um epitopo do HIV em associação com a molécula de MHC.....	9
Figura 1.4: Evolução dos parâmetros virológicos e imunológicos em pacientes HIV positivos.....	12
Figura 1.5: Representação esquemática da análise por citometria de fluxo.....	14
Figura 1.6: Estrutura da classe e subclasse da molécula de imunoglobulina G.....	18
Figura 1.7: Representação esquemática da ligação do FITC ao anticorpo monoclonal.....	21
Figura 1.8: Gráfico de excitação e emissão do fluorocromo FITC.....	21
Figura 1.9: Espectro de excitação e emissão da R-PE.....	22
Figura 1.10: Processo de conjugação da R-PE com o anticorpo monoclonal.....	23
Figura 1.11: Processo de conjugação do Cy5 com o anticorpo monoclonal.....	24
Figura 1.12: Gráfico de excitação e emissão do fluorocromo Cy5.....	24
Figura:1.13: Espectro de excitação e emissão do fluorocromo R-PECy7.....	25
Figura 4.1: Verificação da homogeneidade protéica dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em gradiente 8-25% (SDS-PAGE).....	39
Figura 4.2: Representação das análises citofluorimétricas utilizando o programa CellQuest.....	45
Figura 4.3: Citometria de fluxo proveniente das amostras de sangue indivíduos normais do conjugado anti-CD8/Cy5.....	47
Figura 4.4: Citometria de fluxo, do conjugado anti-CD3/R-PE (10 µL) de Biomanguinhos utilizando amostras de sangue indivíduos normais.....	48

Figura 4.5: Gráfico de densidade de fluorescência <i>versus</i> granulosidade dos conjugados produzidos no LATED-Biomanguinhos.....	49
Figura 4.6: Citometria de fluxo referente a 2,5 µL da concentração original do conjugado anti-CD4/FITC de Biomanguinhos.....	50
Figura 4.7: Citometria de fluxo referente a 2,5 µL da concentração original do conjugado anti-CD3/R-PE de Biomanguinhos.....	51
Figura 4.8: Citometria de fluxo referente a 2,5 µL da concentração original do conjugado de Biomanguinhos anti-CD3/Cy5 na razão de 3:1.....	52
Figura 4.9: Citometria de fluxo referente a 2,5 µL da concentração original do conjugado de Biomanguinhos anti-CD8/Cy5 na razão de 3:1.....	53
Figura 4.10: Citometria de fluxo referente a 2,5 µL da concentração original do conjugado de Biomanguinhos anti-CD4/R-PECy7 na razão de 3:1.....	54
Figura 4.11: Análise dos conjugados de Biomanguinhos comparados ao Tritest da BD de um paciente HIV+.....	56
Figura 4.12: Histograma da marcação tripla dos conjugados de Biomanguinhos comparados ao Tritest da BD, para amostras de pacientes HIV+.....	57
Figura 4.13: Histograma da marcação dupla dos conjugados de Biomanguinhos comparados ao Tritest da BD, para amostras de pacientes HIV+.....	58
Figura 4.14: Análise comparativa entre os conjugados de Biomanguinhos e o Tritest da BD, utilizando amostras de pacientes indivíduos normais.....	60

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é uma doença crônica sexualmente transmissível que se propaga na espécie humana. Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2008, cerca de 33,2 milhões de pessoas estavam infectadas pelo vírus HIV em todo o mundo e só no Brasil, atualmente, são cerca de 630 mil infectados pelo referido vírus. O principal impacto da infecção pelo HIV no sistema imune é a destruição dos linfócitos T CD4, alvo principal do vírus. Com a introdução da terapia antirretroviral, tornou-se necessário o monitoramento da resposta imunológica dos pacientes HIV+ em tratamento e assim, em 1997, foi criada a Rede Nacional de Laboratórios para a contagem das células CD4⁺/CD8⁺. Posteriormente, o Ministério da Saúde demandou para Biomanguinhos o desenvolvimento de um *kit* alternativo ao existente no mercado atual para a quantificação dos linfócitos T CD4⁺. Neste contexto, foi necessária a identificação de possíveis fornecedores para os anticorpos monoclonais a partir da produção do fluido ascítico. O objetivo do nosso trabalho foi, inicialmente, concentrar as preparações dos anticorpos monoclonais recebidos e, em seguida, analisar a homogeneidade das mesmas, conjugando-as aos fluorocromos FITC, PE, Cy5 e PECy7. A homogeneidade dos anticorpos monoclonais foi avaliada por eletroforese em gel de poli(acrilamida) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) na presença de agente redutor, e neste experimento, foram aplicadas quantidades diferentes dos anticorpos monoclonais no suporte eletroforético. Os resultados obtidos foram concordantes e só mostraram bandas relacionadas às proteínas investigadas. Após a etapa de conjugação foram calculadas as razões molares (fluorocromo / anticorpo monoclonal) que mostraram valores adequados dentro da faixa indicativa da eficiência reacional. Para a análise citofluorimétrica foi necessário, primeiramente, se ajustar alguns parâmetros tais como volume e diluição apropriados dos anticorpos monoclonais conjugados e para este fim, analisou-se os perfis obtidos em cada tempo para as células negativas e positivas relacionadas à janela (*gate*) dos linfócitos. Os resultados auferidos no estudo comparativo entre os imunoconjugados fluorescentes sintetizados no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) de Biomanguinhos e o conjugado Tritest da empresa *Becton e Dickinson* (BD) deram margem à conclusão que os conjugados produzidos na Instituição nacional eram similares àqueles da empresa BD, indiferente às marcações feitas (simples, dupla e tripla) servindo como base para a análise estatística à correlação linear de Pearson.

ABSTRACT

The Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), caused by the human immune deficiency virus (HIV), is a chronic disease sexually transmitted among human specie. According to World Health Organization (WHO), in 2008, about 33.2 million people were infected by the HIV worldwide, and only in Brazil, actually there are about 630.000 infected by the virus. The major impact of HIV on immune system is the destruction of CD4 T lymphocytes, primary target of the virus. With the introduction of the antiretroviral therapy, it became necessary the monitoring immunological response in HIV+ patients under this treatment and so, in 1997, was created the National Net of Laboratories for the counting of CD4⁺/CD8⁺ cells. Posteriorly, The Brazilian Health Department demanded for Biomanguinhos the development of an alternative *kit* to the existing one in the current market for the quantification of CD4⁺ T lymphocytes. In this context, the identification of possible suppliers for the monoclonal antibodies became necessary, from the supply of the ascitic fluid. The aim of our work was, initially, concentrate the preparations of monoclonal antibodies received, and then analyzed the homogeneity of these, combining them with the fluorochromes FITC, PE, Cy5 and PECy7. The homogeneity of the monoclonal antibodies was assessed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) containing a reductor agent. And in this experiment, were applied different amounts of monoclonal antibodies in the electrophoretic support. The results were consistent and showed only bands related to proteins investigated. After the stage of conjugation were calculated reasons molars (fluorochromes / monoclonal antibody) that showed suitable values within the range indicative of the reaction efficiency. For the analysis cytofluorimetric was necessary, firstly, to adjust some parameters such as volume and dilution of the appropriate conjugated monoclonal antibodies and to this and, it examined the profiles obtained at each time for the negative and positive cells related to the gate of lymphocytes. The results obtained in the comparative study between fluorescent immunoconjugates synthesized in the Laboratory of Diagnostic Technology (LATED) of Biomanguinhos and the tritest conjugate of *Becton e Dickinson* (BD) company, gave room to conclusion that the conjugates produced in the national Institution were similar to those of the BD company, indifferent to the labels made (single, double and triple) serving as the statistical basis of Pearson linear correlation.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Breve histórico do HIV/AIDS

Os primeiros casos com sinais similares a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), ocorreram em 1977/1978 no Haiti e África Central (CDC – Basic Information HIV, 2007). No ano de 1981, surgiram os primeiros casos de uma nova imunodeficiência nos Estados Unidos, quando casais homossexuais começaram a adoecer e morrer devido a infecções oportunistas (Barnett et al., 2008, Greene, 2007). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e o Instituto Pasteur, no ano de 1982, diagnosticaram a doença e a classificaram como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Apenas no ano de 1984 o vírus HIV foi isolado por Montagnier (Greene, 2007).

O HIV causa uma doença crônica sexualmente transmissível, e que se propaga na espécie humana. Devido ao seu tropismo pelos linfócitos T CD4, o HIV provoca uma destruição progressiva do sistema imune, que é a característica mais importante da doença. A infecção pelo vírus HIV causa uma grande variedade de manifestações neurológicas e uma forma relativamente rara e agressiva de câncer chamado de sarcoma de Kaposi (Gottlieb et al., 1981, Alcamí, 2004, Greene, 2007).

Nos anos 80, indivíduos que realizaram transfusões de sangue, hemofílicos e usuários de drogas injetáveis, começaram a apresentar sintomas da doença, sugerindo então, que a transmissão da AIDS poderia ocorrer por via sanguínea (Jaffe et al., 1983, Greene, 2007). Posteriormente, os sintomas da doença foram observados também em prostitutas e crianças filhas de mães infectadas, confirmando a transmissão sexual e vertical da doença (Marmor et al., 1982).

1.2- A Epidemia do HIV/AIDS

1.2.1- Epidemia Global

Os avanços obtidos ao longo dos anos na metodologia aplicada à epidemiologia do HIV resultaram na obtenção de um grande número de dados, contribuindo assim, de forma substancial para as alterações nas estimativas do número de pessoas vivendo com HIV em todo mundo. Segundo o Programa Nacional de HIV/AIDS e a Organização Mundial da Saúde (UNAIDS / WHO) (2007), a estimativa do número de pessoas vivendo com HIV no mundo em 2007 foi de 33,2 milhões (30,6 – 36,1 milhões), representando 16% a menos da expectativa de 39,5 milhões (34,7 – 47,1 milhões) prevista em 2006 para 2007, mostrando assim uma tendência de estabilização deste quadro (figura 1.1).

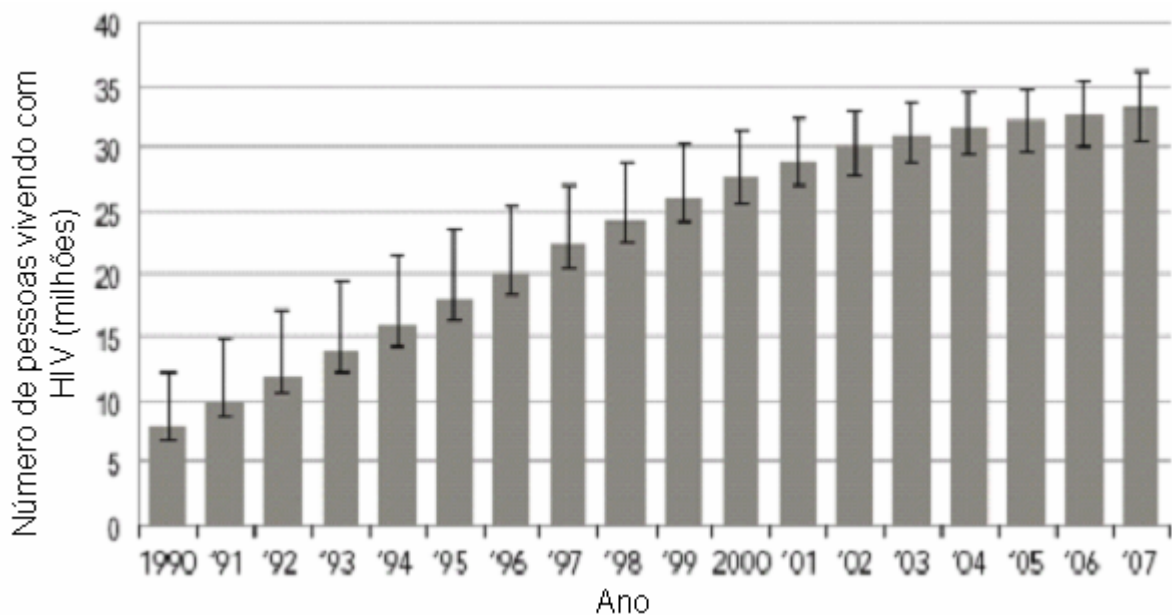


Figura 1.1: Número estimado de pessoas vivendo com HIV no mundo de 1990 a 2007. As barras indicam o intervalo em torno da estimativa. Fonte: <http://www.aids.gov.br/data/documents/>.

Na América do Norte, na Europa Ocidental e Central, em média 2,1 milhões (1,1 milhões – 3,0 milhões) de pessoas viviam com HIV em 2007 (UNAIDS / WHO - AIDS Epidemic, 2007). A epidemia na América Latina permanece estável, as transmissões do HIV continuam ocorrendo entre as populações de risco mais elevado de exposição, e o total de pessoas infectadas em 2007 foi de 1,6 milhões (1,4 milhões – 1,9 milhões) (UNAIDS / WHO - AIDS Epidemic, 2007). Em toda a Ásia, o número estimado de pessoas vivendo com o HIV em 2007 foi de 4,9 milhões

(3,7 milhões – 6,7 milhões), com prevalência maior no sudeste asiático (UNAIDS / WHO - AIDS Epidemic, 2007). A epidemia na maioria dos países asiáticos é atribuída principalmente aos diferentes comportamentos de alto risco como: sexo sem proteção e uso de drogas injetáveis (CDC - AIDS Pandemic, 2006). Aproximadamente 80% das infecções pelo HIV na Índia são adquiridos heterossexualmente (CDC - AIDS Pandemic, 2006).

1.2.2- Epidemia no Brasil

O primeiro caso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) no Brasil foi notificado na cidade de São Paulo, em 1980 (Ministério da Saúde – Boletim Epidemiológico, 1999). A maior parte das infecções pelo HIV ficou restrita às denominadas metrópoles nacionais - São Paulo e Rio de Janeiro - tendo como categorias de exposição preponderantes os homossexuais, bissexuais masculinos, os hemofílicos e pessoas que receberam sangue e hemoderivados por motivos diversos (Bastos et al., 1995). Estima-se que uma grande proporção de infecções entre mulheres pode ser atribuída ao comportamento de seus parceiros sexuais masculinos (Silva e Barone, 2006).

Segundo dados do Boletim Epidemiológico DST/AIDS 2008 mostram que, de 1980 a junho de 2008, foram registrados 506.499 casos de AIDS no Brasil. Durante esses anos, 205.409 mortes ocorreram em decorrência da doença, mesmo com esses dados a epidemia no país é considerada estável.

Em relação ao HIV, a estimativa é de que existam 630 mil pessoas infectadas no Brasil. A região Sudeste é a que tem o maior percentual de notificações – 60,4% – ou seja, 305.725 casos novos. O Sul concentra 18,9% (95.552), o Nordeste 11,5% (58.348), o Centro-Oeste 5,7% (28.719) e o Norte 3,6% (18.155). A região Sul segue a tendência de estabilização do país, porém em patamares elevados, a cada 100 mil habitantes em 2000, existiam 26,3 casos. Em 2006, a taxa passou para 28,3 casos. No Sudeste, há discreta queda: de 24,4 casos em 2000 para 22,5 em 2006. No Centro-Oeste, essa queda se apresenta a partir de 2003. Eram 21,3 casos a cada 100 mil habitantes em 2003 e 17,1 casos em 2006. Há um discreto aumento da taxa de incidência no Nordeste e um aumento mais acentuado no Norte. No primeiro, o índice subiu de 6,9 para 10,6 de 2000 para 2006. E de 6,8 para 14 no Norte. O ano de 2006 é usado nas análises epidemiológicas de indivíduos infectados por se tratar do ano mais recente com dados mais consistentes.

Tendo alcançado dimensões nacionais, a epidemia pelo HIV/AIDS não se restringe mais aos grandes centros urbanos. Atinge atualmente mais da metade dos quase cinco mil municípios brasileiros, com disseminação espacial maior, nos últimos anos, entre municípios pequenos, que são os mais pobres e tem a menor renda *per capita* (Szwarcwald et al., 2000).

Em razão das inúmeras e profundas mutações nos estádios evolutivos da infecção pelo HIV, o exame detalhado das tendências da epidemia deve combinar, obrigatoriamente, dados provenientes dos casos de AIDS já registrados, com aqueles derivados da investigação da ocorrência de novas infecções. A análise integrada das notificações da doença em diferentes períodos e das condições de sua manifestação serve tanto para as populações sob maior risco de exposição ao HIV quanto à população geral, indiscutivelmente, mais vulnerável hoje do que nos primórdios da epidemia (Castilho et al., 2000).

1.3- Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN-DST/AIDS)

No ano de 1986 foi criado o PN-DST/AIDS, tendo como objetivo a redução da incidência do HIV e melhora na qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/AIDS. Em 1994, o Brasil assinou o primeiro acordo com o Banco Mundial, e este se tornou o grande financiador de projetos para alavancar o desenvolvimento do PN-DST/AIDS com o fornecimento de medicamentos antirretrovirais. Entretanto, apenas a distribuição de antirretrovirais não garantiu a qualidade do tratamento, sendo necessário monitorar a resposta dos pacientes à medicação através da contagem de linfócitos T CD4⁺ e o teste de carga viral. Em 1997, foi criada a Rede Nacional de Laboratórios para realização de exames de carga viral e contagem de CD4⁺/CD8⁺, neste mesmo ano foi desenvolvido o Sistema de Controle de Exames Laboratoriais de CD4/CD8 e Carga Viral – SISCEL.

Em 1999, o surgimento de casos de pessoas que não respondiam ao tratamento com antirretrovirais mostrou a necessidade da utilização da genotipagem como ferramenta de monitoramento da resistência viral, o que culminou com a implantação, em 2001, de uma rede de laboratórios para o estudo do padrão genético do HIV, devido à descoberta de variantes do vírus resistentes à medicação (Ministério da Saúde – História do Programa Nacional, 2005).

1.3.1- Rede Nacional de Laboratórios para Contagem de Linfócitos T CD4⁺

A Rede Nacional de Laboratórios para Contagem de Linfócitos T CD4⁺ é formada por 92 laboratórios. Os testes para a contagem de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ visam o monitoramento da evolução clínica de indivíduos infectados pelo HIV, quando da introdução de terapias com antirretrovirais em novos pacientes. Esse monitoramento possibilitou a adoção de terapias preventivas às infecções oportunistas contribuindo para a efetividade do tratamento (Figura 1.2) (Ministério da Saúde – Diagnóstico e Acompanhamento, 2007).



Figura 1.2: Cartograma da Rede Nacional de Laboratórios CD4⁺/CD8⁺. Fonte: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISA5935B3CPTBRIE.htm>

Atualmente, a Rede Nacional de Laboratórios é mantida com *kits* para a quantificação de linfócitos T CD4⁺ por uma única empresa estrangeira denominada *Becton e Dickinson* (BD). Esta empresa fornece desde 1997 os quantitativos necessários para o acompanhamento dos pacientes infectados. Cabe ressaltar que além de fornecer os insumos para a contagem de linfócitos T CD4⁺, a BD fornece o equipamento denominado de citômetro de fluxo, e também a assistência técnica aos

laboratórios da Rede do país. Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2006 foram distribuídos 386.930 testes para a quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8. Em 2007 o número de testes aumentou para 458.220 e no ano de 2008 foram distribuídos 545.220 testes e para o ano de 2009 o Ministério da Saúde adquiriu 820.000 testes para a quantificação de linfócitos T CD4. Hoje existem 152.000 indivíduos em acompanhamento com a terapia antirretroviral na Rede nacional de laboratórios. Estes dados mostram que ao longo dos anos houve uma demanda maior do teste para a quantificação de linfócitos CD4⁺, devido ao aumento no número de novos casos de pacientes infectados com o vírus HIV.

Tendo em vista o aumento na necessidade do teste para a quantificação de linfócitos, o Ministério da Saúde demandou a Biomanguinhos o desenvolvimento de um *kit* alternativo de quantificação de linfócitos T CD4⁺. Assim, Biomanguinhos identificou o Centro de Imunologia Molecular (CIM) de Cuba como um potencial fornecedor de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, para a produção de um *kit* nacional para imunofenotipagem. A relevância da proposta do desenvolvimento de um *kit* alternativo para imunofenotipagem, está no que se refere ao potencial estratégico que se consolida com o desenvolvimento de novos produtos estratégicos em ações de saúde associado à competência tecnológica acumulada por Biomanguinhos/Fiocruz, sem mencionar o aprimoramento e a capacitação tecnológica dos profissionais envolvidos. Esta iniciativa possui aprovação e apoio por parte do PN-DST/AIDS.

1.4- O HIV e o sistema imunológico

O sistema imunológico articula e desencadeia um mecanismo de defesa contra qualquer substância estranha que invada o organismo. A resposta imune pode ser caracterizada pela especificidade, memória, reconhecimento do próprio e do não-próprio ao organismo e pela sua diversidade de resposta (Goldsby et al., 2000).

A resposta imunológica pode ser de dois tipos: resposta imune inata e resposta imune adaptativa. As células da resposta imune inata podem reconhecer inespecificamente patógenos que penetram no organismo, se ligam as células, internalizam os mesmos e depois levam as células do organismo a destruição. A resposta imune adaptativa atua com uma alta especificidade e memória (Sudharshan e Biswas, 2008). Os linfócitos são as únicas células capazes de

reconhecer com especificidade e também de distinguir diferentes determinantes antigênicos (Abbas et al., 2007). As células envolvidas na resposta inata são: monócitos, macrófagos, neutrófilos polimorfonucleares e as células *natural killer* (NKs).

Já na resposta imune adaptativa as células possuem um papel importante no controle da viremia, usam múltiplos mecanismos efetores no controle da multiplicação viral.

Na resposta imune adaptativa temos as células efectoras que são os linfócitos B - células B, responsáveis pela imunidade humoral e os linfócitos T - células T, responsáveis pela imunidade mediada por células. Para que as células efectoras sejam ativadas é necessário que o antígeno seja apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), que são células especializadas em apresentar o antígeno exclusivamente ao linfócito T, sendo responsáveis por permitir a ligação com os receptores de células T (TCR) presentes nas células T via complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As principais APCs são: células dendríticas (DC), monócitos, macrófagos, as células de Langerhans e células B (Beignon et al., 2005).

Os linfócitos T exibem uma grande variedade de funções na resposta imune à infecção viral. Essas células podem ser identificadas pela presença de receptores de superfície celular, denominados TCR. Nos linfócitos T os receptores possuem duas formas, sendo a mais comum, um heterodímero, constituído por duas cadeias polipeptídicas denominadas alfa e beta - $\alpha\beta$ - (TCR-2) e estão presentes em cerca de 95% dos linfócitos circulantes. A outra forma possui duas cadeias polipeptídicas denominadas gama e delta - $\gamma\delta$ - (TCR-1), presentes de 1-5% linfócitos circulantes (Carding e Egan, 2002, Erman et al., 2002, Kuhns et al., 2006).

As células T apresentam diferentes populações celulares com diferentes marcadores de superfície, tornando-se necessário criar uma sigla para melhor organizá-los. Estes marcadores são denominados "CD", sigla que indica o grupo de diferenciação (do inglês *cluster of differentiation*) e refere-se a uma molécula reconhecida por um grupo ou coleção de anticorpos monoclonais. Atualmente, já foram identificados nos leucócitos cerca de 350 CDs (Davis et al., 2003). Essas proteínas são, frequentemente, associadas com a especificidade das células. Células com diferentes funções expressam diferentes CDs, como por exemplo: células T auxiliares (CD4), as células T citotóxicas (CD8), entre outras (Herzenberg

et al., 2000, Zola, 2001, WHO - Laboratory Guideline for enumerating CD4 T lymphocytes, 2007).

Outro exemplo é o receptor de superfície CD3 que é uma glicoproteína transmembrana que interage com o TCR formando o complexo TCR-CD3. Pode ser usado como marcador fenotípico para indicar a população de linfócitos T, pois estão presentes apenas nestas células. A função do CD3 é transmitir sinais para o interior da célula, quando o TCR se liga ao peptídeo antigênico, possibilitando a ativação dos linfócitos T (Parkin e Cohen, 2001, Abbas et al., 2007).

A diferenciação dos co-receptores de superfície, CD4 e CD8, ocorre no timo. Neste órgão, o pré-timócito diferencia-se em células imaturas denominadas timócitos. Ainda neste estágio, inicia-se a expressão intracelular do fenótipo CD3 caracterizando como CD3⁺ - positivo - no citoplasma da célula. Na superfície dos timócitos, a expressão do complexo TCR-CD3 ainda é nula, designando-o como TCR-CD3⁻ - negativo. Com o surgimento da cadeia β do TCR no citoplasma da célula, os timócitos são considerados duplo negativos CD4⁻ CD8⁻. O estágio duplo-positivo (CD4⁺ e CD8⁺) é caracterizado com a expressão da cadeia α do TCR na superfície dos timócitos. Com o surgimento das cadeias $\alpha\beta$ associado à glicoproteína CD3, os timócitos amadurecem e eles se tornam "timócitos unipositivos" que vão expressar CD4 ou CD8 (Erman et al., 2002, Kuhns et al., 2006).

Após o processo de diferenciação dos timócitos, as células T são divididas de acordo com suas propriedades funcionais em: linfócitos T auxiliares - T *Helper* - ou células T CD4 e linfócitos T citotóxicos ou células T CD8, ambas expressando receptor antigênico chamado de receptor $\alpha\beta$ (Jensen, 2007, Abbas et al., 2007).

O receptor de superfície CD4 é uma glicoproteína, apresenta-se como monômero transmembrana dos linfócitos T auxiliares na superfície dos linfócitos, presentes também em monócitos e em algumas células dendríticas. São capazes de interagir com moléculas do MHC de classe II (Figura 1.3), presentes nas APCs e possuem uma função auxiliar na montagem da resposta imune. Os linfócitos T CD4 estão presentes no sangue periférico em torno de 65% das células T positivas (Davis et al., 2003, Sudharshan e Biswas, 2008).

Os linfócitos T citotóxicos apresentam na sua superfície uma glicoproteína transmembrana chamada de CD8, que é capaz de interagir com a molécula de MHC de classe I (Figura 1.3), presente em todas as células nucleadas do corpo humano. As células citotóxicas atuam na vigilância contra os vírus, sua resposta é eficiente e

seletiva na maioria das infecções virais, focalizando o local de replicação viral e destruindo a célula infectada. Estão presentes no sangue periférico em torno de 35% das células T positivas (Parkin e Cohen, 2001, Davis et al., 2003, Sudharshan e Biswas, 2008).

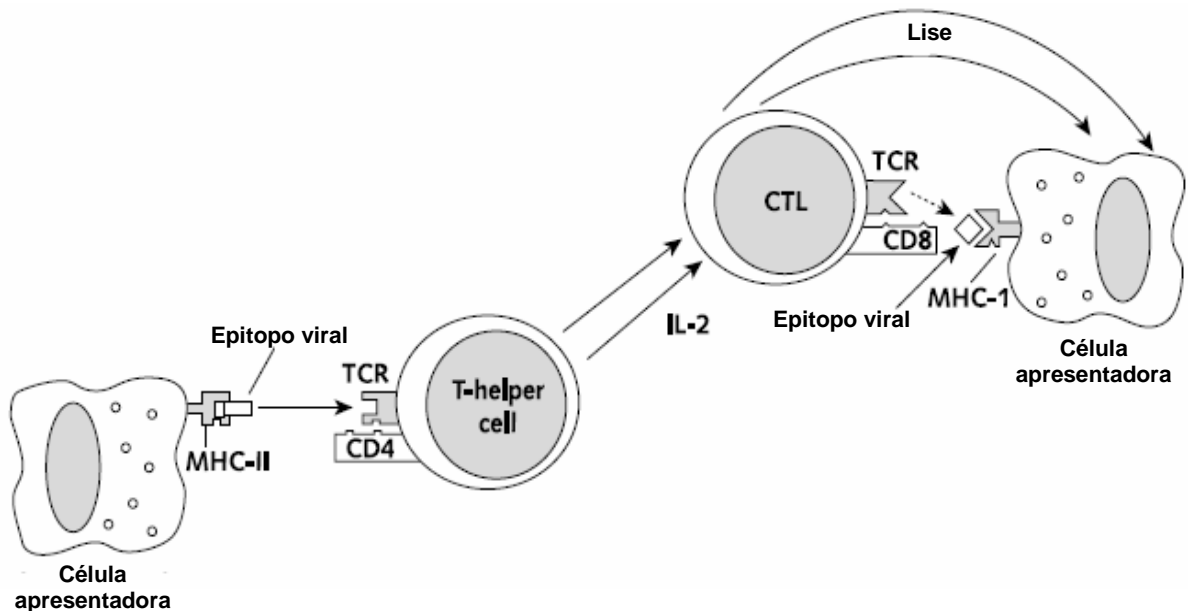


Figura 1.3: Representação esquemática da ligação APC a um epitopo do HIV em associação com a molécula de MHC de classe II, a qual interage com a célula T CD4⁺, onde o TCR reconhece um epitopo apresentado. A célula T auxiliar ativada irá estimular a célula T CD8⁺. A célula T citotóxica ativada ao encontrar o epitopo do HIV apresentado por uma célula apresentadora de antígeno, associa-se a molécula de MHC de classe I, onde vai interagir com a célula T CD8⁺. A ativação da célula citotóxica vai levar a lise do HIV. Fonte: Adaptado de Hogan et al. 2001

Outro marcador de superfície dos linfócitos é uma glicoproteína de membrana CD45 que é o marcador específico dos leucócitos, e é utilizado na citometria de fluxo para discriminar os linfócitos das populações de monócitos e granulócitos, pois o CD45 é expresso em diferentes intensidades nessas populações celulares (Trowbridge e Thomas, 1994, Bikoue et al., 2002,). Além disso, parece ter um papel importante na sinalização com o TCR (Adamczewski et al., 1995, Bikoue et al., 2002, WHO - Laboratory Guideline for enumerating CD4 T lymphocytes, 2007).

1.5- Evolução da infecção pelo HIV

O principal impacto da infecção pelo HIV no sistema imune é a destruição dos linfócitos T CD4 (Paranjape, 2005), os quais possuem um papel vital na regulação da resposta imune (Barnett et al., 2008), pois as células T CD4 são os primeiros

alvos do vírus HIV (Iweala, 2004, Alcamí, 2004, Barnett et al., 2008). A destruição em massa das células linfocitárias causa uma severa imunodepressão, tornando o paciente mais suscetível às infecções oportunistas, que por sua vez, se não combatidas, levam o paciente à morte (Pattanapanyasat e Thakar, 2005). Os órgãos linfóides funcionam como sítios anatômicos primários para a replicação e propagação do HIV-1. Graus variados de replicação do vírus foram observados durante todo o curso da infecção pelo HIV (Pantaleo et al., 1998).

A infecção pelo HIV pode ser dividida em quatro fases clínicas: infecção aguda; fase assintomática, também conhecida como latência clínica; fase sintomática inicial ou precoce e AIDS (Ministério da Saúde - Evolução clínica do HIV, 2007).

- Infecção aguda

Esta fase, também conhecida como síndrome da infecção retroviral aguda ou infecção primária, ocorre em cerca de 50% a 90% dos pacientes e é pouco diagnosticada, pois não é detectada a presença de anticorpos específicos, apesar do alto nível de viremia (Alcamí, 2004). A fase aguda pode durar de 4 a 12 semanas sem sintomas clínicos específicos, onde, frequentemente, ocorre: febre, dor de cabeça, entre outros sintomas comuns a outras doenças virais (Katzeinstein, 2003). O número de células T CD4⁺ no sangue periférico reduz, e ocorre a presença de níveis elevados de viremia, que podem ser preditivo do início do curso clínico da infecção pelo HIV-1 e disseminação viral (Figura 4) (Katzeinstein, 2003).

- Fase assintomática

Neste estágio o paciente infectado apresenta um quadro clínico mínimo ou inexistente. É um período de latência do vírus, marcado pela forte interação entre o sistema imune e as constantes e rápidas mutações do vírus em equilíbrio com o hospedeiro (Figura 1.4). Durante essa fase, os vírus se replicam e morrem de forma equilibrada (Ministério da Saúde - Evolução clínica do HIV, 2007). Esta fase pode durar até 10 anos ou até que se iniciem as infecções oportunistas ou quadros clínicos graves e persistentes, caracterizando o surgimento da AIDS (Pantaleo e Fauci, 1996).

- Fase sintomática inicial

O portador da infecção pelo HIV pode apresentar diversos sintomas inespecíficos de intensidade variável, além de infecções oportunistas de menor gravidade, principalmente em pele e mucosas. O final desta fase corresponde à redução crítica das células T CD4⁺, que atinge níveis abaixo de 200 células/mm³ de sangue (Barnett et al., 2008) - valores normais para adolescentes e adultos saudáveis: 800 a 1050 células/mm³ (Neves Jr e Morgado, 2000). Neste momento, surgem os sintomas típicos da AIDS, tais como: diarreia persistente, dores de cabeça, contrações abdominais, febre, falta de coordenação, náuseas, vômitos, fadiga extrema, perda de peso e câncer (Ministério da Saúde - Evolução clínica do HIV, 2007).

- AIDS

O estágio final da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida é caracterizado pelo surgimento de infecções oportunistas e pela decorrência da debilidade do sistema imunológico do hospedeiro (Alcamí, 2004) (Figura 1.4). Além das doenças de origem infecciosa, várias neoplasias, como o sarcoma de Kaposi, os linfomas não-Hodgkin, e as neoplasias intra-epiteliais anal e cervical, podem surgir neste estágio e também são enquadradas como oportunistas (Ministério da Saúde - Evolução clínica do HIV, 2007).

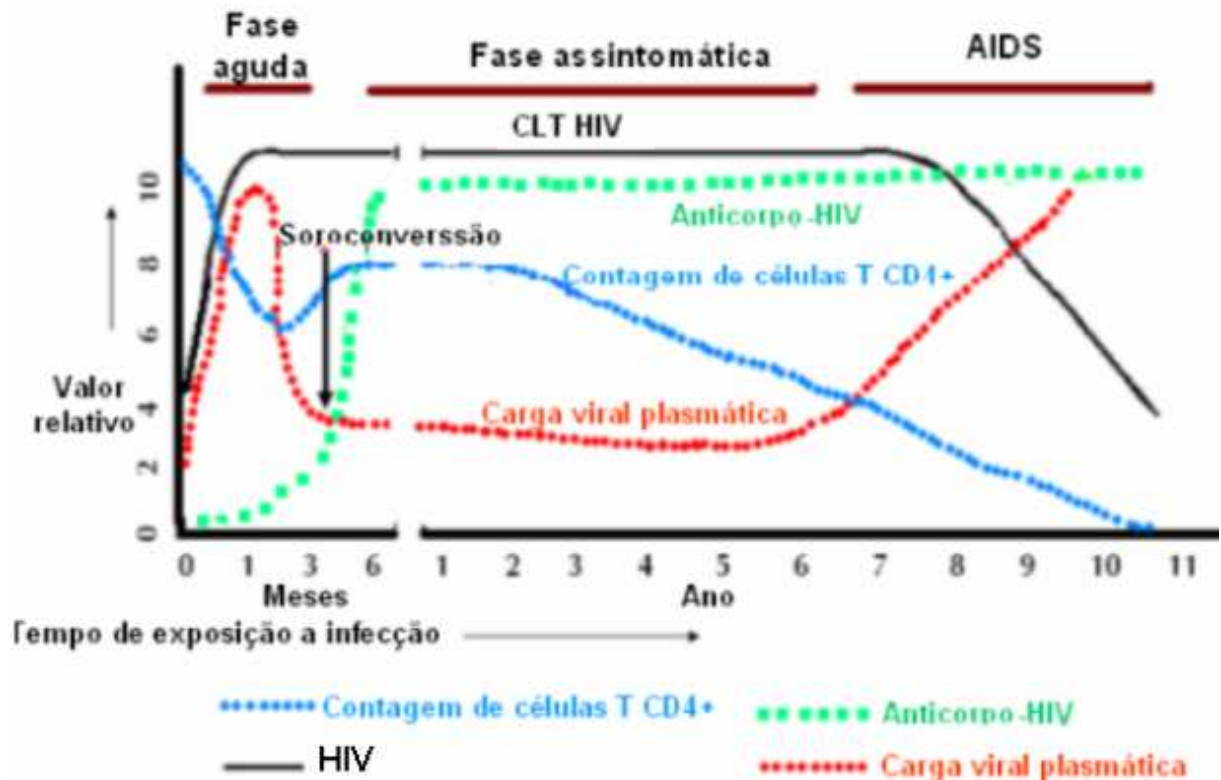


Figura 1.4: Evolução dos parâmetros virológicos e imunológicos em pacientes HIV positivos. Fonte: WHO – Laboratory Guidelines for Enumerating CD4 T Lymphocytes, 2007.

1.6- Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HIV é feito a partir da realização de testes sorológicos. Para o diagnóstico correto do HIV, deve-se considerar a fase da doença, dada sua grande capacidade de manifestar-se de diferentes formas em cada pessoa (Ministério da Saúde – Diagnóstico, 2007).

O tempo necessário para que o exame de AIDS detecte a presença do HIV no sangue é geralmente de 3 a 12 semanas depois de adquirido o vírus, com período médio de aproximadamente dois meses. Esse tempo decorrido entre a infecção pelo HIV e a detecção de anticorpos pelos testes sorológicos (positivação da sorologia para o HIV) é chamado de janela imunológica (Ministério da Saúde – Diagnóstico, 2007).

1.6.1- Testes sorológicos

O objetivo principal dos testes diagnósticos é a detecção precoce das infecções, tendo em vista a redução do período de janela imunológica para o pronto tratamento do indivíduo. Há também testes diagnósticos que visam estabelecer, por

exemplo, como no caso do HIV, o grau de infecção em seus diferentes estágios de evolução. Estes testes são de grande relevância para a vigilância epidemiológica no que se refere às estimativas de incidência da patologia em dado subgrupo populacional (Iweala, 2004).

Há diferentes tipos de testes diagnósticos específicos para HIV, os quais podem detectar tanto os anticorpos produzidos pelo organismo infectado em resposta à proliferação do vírus, quanto os antígenos (proteínas ou ácido nucléico) virais presentes na amostra coletada do paciente. A amostra preferencialmente utilizada nos testes diagnósticos para HIV provém de soro, plasma ou sangue total, sendo que estes permitem não apenas a detecção da infecção no indivíduo sendo testado, como também a diferenciação entre o tipo de vírus HIV (HIV-1 e/ou HIV-2), os subgrupos virais e a determinação da carga viral no paciente soropositivo bem como sua resposta à terapia antirretroviral. Também estão disponíveis no mercado testes diagnósticos que utilizam amostras derivadas de saliva ou urina para a triagem do HIV (Gürtler, 1996).

Os testes diagnósticos que detectam no indivíduo anticorpos específicos do vírus HIV incluem: o teste de Elisa (Ensaio imunoenzimático), a imunofluorescência indireta, o *imunoblot*, o *western blot* e os testes rápidos (Iweala, 2004).

Os ensaios moleculares envolvem diferentes técnicas utilizadas na amplificação do genoma viral para o diagnóstico da infecção do HIV no período pré-oroconversão (Iweala, 2004). A quantificação da carga viral pode ser útil na avaliação e na progressão da doença, na resposta terapêutica e no risco de transmissão. A quantificação do ácido ribonucleico (RNA) do vírus HIV-1 ou a determinação da carga viral no plasma é considerado um dos métodos de monitoramento da progressão da doença e da resposta à terapia antirretroviral (Luft et al., 2004), mas estes ensaios são de elevado custo e requerem equipamentos sofisticados, assim como, técnicos qualificados (Balakrishnan et al., 2005).

1.7- Citometria de Fluxo

Os avanços nas técnicas de contagem de subpopulações de linfócitos T e na produção de anticorpos monoclonais possibilitaram uma melhor avaliação da contagem de células T CD4⁺ (Helbert e Breuer, 1992, Barnett et al., 2008). Atualmente a Organização Mundial da Saúde preconiza a citometria de fluxo como o

método de quantificação das células T CD3/CD4/CD8 para pacientes HIV+, devido a sua precisão e reprodutibilidade (Neves Jr e Morgado, 2000).

A análise das amostras de pacientes por citometria de fluxo é feita através de uma suspensão celular, que é injetada e atravessa a câmara de fluxo, onde se dá a passagem de uma célula por vez através de um feixe de luz (laser), perpendicular ao fluxo (Barnett et al., 2008). No momento da passagem da célula pelo laser, os fotomultiplicadores (PMTs) captam os sinais ópticos emitidos transformando em sinais digitais (Figura 1.5) (Silva et al., 2004). O tamanho (*forward scatter*) e a granulosidade ou complexidade celular (*side scatter*) são parâmetros estruturais intrínsecos das células e desta forma não necessitam de marcação específica para serem avaliados. Os receptores de superfície são parâmetros extrínsecos e só podem ser avaliados através da utilização de anticorpos monoclonais marcados com diferentes fluorocromos (Shapiro, 2003).

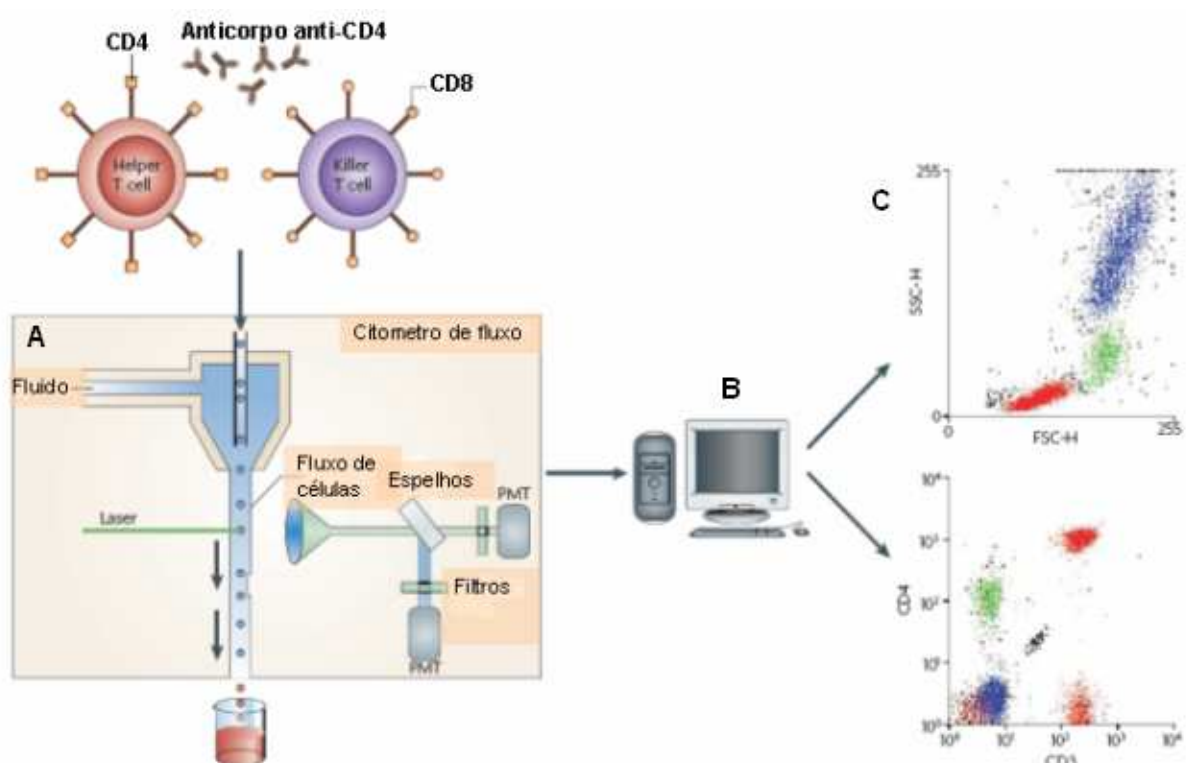


Figura 1.5: Representação esquemática da análise por citometria de fluxo. A: Fluxo da suspensão celular, onde o laser intercepta célula a célula e os PMTs modificam o sinal óptico em digital. B: Computador onde o sinal digital é processado e os dados são transformados em gráficos. C: Gráficos de dispersão celular (Tamanho versus granulosidade celular), onde se observam os linfócitos (vermelho), os monócitos (verde) e os granulócitos (azul) e no outro gráfico mostra a marcação das populações de células CD4 versus CD3. Adaptado de Barnett et al., 2008.

Esta metodologia tem uma ampla versatilidade nas suas aplicações (Pattanapanyasat e Thakar, 2005), e baseia-se na avaliação das características das

células como tamanho e granulosidade. As células, quando marcadas com fluorocromos, são monitoradas sem a necessidade de separar células marcadas de células não marcadas (Golim et al., 2007). Diversos parâmetros podem ser avaliados durante este processo, sendo de interesse na avaliação fenotípica de células de pacientes com HIV os seguintes: tamanho, granulosidade ou complexidade celular e expressão de receptores de superfície celular (CD3, CD4, CD8, e CD45). No caso do acompanhamento de pacientes HIV+, as diferentes subpopulações de linfócitos T são avaliados de acordo com a expressão das moléculas de superfície CD3 (linfócitos T total), CD4 (linfócitos T auxiliares), CD8 (linfócitos T citotóxicos), e CD45 (leucócitos totais).

1.7.1- Teste de Imunofenotipagem para quantificação dos linfócitos T CD4⁺

A metodologia utilizada para a contagem de linfócitos T, também denominada imunofenotipagem, tem por finalidade detectar e quantificar os antígenos específicos (CD3, CD4, CD8 e CD45) na superfície das células, utilizando anticorpos monoclonais específicos marcados com diferentes fluorocromos. A contagem de células T CD4⁺ tornou-se a mais importante ferramenta para se iniciar e monitorar a terapia antirretroviral (WHO – Laboratory Guidelines for Enumerating CD4 T Lymphocytes, 2007).

O CDC, em 1992, passou a utilizar a contagem de linfócitos T CD4⁺ como parâmetro para avaliar o perfil imunológico de pacientes portadores do vírus HIV, pois o tratamento com antirretrovirais destes pacientes depende da contagem das células T CD4⁺ para mudança no esquema terapêutico (Strauss et al., 1996). Os níveis dos linfócitos T CD4⁺ auxiliam na determinação do risco da progressão da AIDS (Phillips et al., 1991) e são também empregados na avaliação do estágio da doença (WHO – Guidelines for HIV, 2005), na recomendação de profilaxia contra infecções oportunistas e na classificação da infecção pelo HIV (Phillips et al., 1991). O risco de infecções oportunistas aumenta à medida que o nível de células T CD4⁺ diminui (Helbert e Breuer, 2000).

No Brasil, o tratamento ou não com antirretrovirais segue os seguintes critérios (Ministério da Saúde – Consenso para a HAART, 2007):

- Pacientes com doença sintomática avançada e naqueles que, apesar de assintomáticos, apresentam imunodeficiência acentuada expressa na contagem de linfócitos T CD4⁺ abaixo de 200/mm³. Nestes casos o tratamento é recomendado.
- Pacientes assintomáticos com contagem de linfócitos T CD4⁺ acima de 350/mm³ não se recomenda iniciar o tratamento, já que os benefícios não estão suficientemente claros para se iniciar a terapia antirretroviral.
- O tratamento deve ser recomendado em indivíduos assintomáticos, com contagem de linfócitos T CD4⁺ entre 200 e 350/mm³.

Caso o tratamento não seja iniciado nas condições descritas acima, as avaliações laboratoriais deverão ser realizadas em intervalos curtos, inferiores aos quatro meses indicados na rotina, com a finalidade de detectar uma baixa imunológica. Quando não for possível a realização freqüente da contagem de linfócitos T CD4⁺, nos indivíduos assintomáticos com contagens T CD4⁺ entre 200 e 350/mm³, o tratamento deve ser iniciado para evitar as complicações clínicas e imunológicas (Ministério da Saúde – Consenso para a HAART, 2007).

1.8- Anticorpos monoclonais

Imunoglobulinas (Ig) ou anticorpos são importantes componentes do sistema imune, estão presentes no soro e no fluido dos tecidos. Alguns anticorpos estão presentes na superfície das células B, onde eles atuam como receptores específicos para antígeno, enquanto outros estão circulando no sangue e na linfa servindo como efetores na resposta imune (Roque et al., 2007). Estes anticorpos são formados naturalmente por indução da reação com os antígenos. Cada molécula de anticorpo possui uma estrutura única que lhe permite ligar especificamente ao seu antígeno correspondente. São responsáveis pela notável capacidade de detectar, localizar, reconhecer, ligar-se para inativar ou dar início ao processo de eliminação de um antígeno (Nunes, 2005).

Na década de 60 a estrutura básica para a imunoglobulina foi proposta. Esta consistia de cadeias polipeptídicas com um número igual de cadeias pesadas (~50 KDa) e de cadeias leves (~25 KDa). As cadeias leves são comuns a todas as classes de imunoglobulinas, enquanto que as cadeias pesadas são estruturalmente diferentes, definindo a imunoglobulina em classe e subclasse (Gil e Kubota, 1999, Nunes, 2005, Roque et al., 2007). Na maioria dos animais superiores cinco classes distintas de moléculas de imunoglobulina são conhecidas. Os tipos foram

determinados de acordo com o tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo de glicídios. São elas: IgG, IgM, IgA, IgE, ou IgD. A IgG é a principal imunoglobulina do sangue. Existem quatro variantes isotípicas ou subclasses de IgG humana, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que correspondem, respectivamente, a 70, 16, 10 e 4% do teor total de IgG no sangue. As subclasses também podem ser diferenciadas pelo número de pontes de dissulfeto existentes na região da dobradiça, sendo duas pontes de dissulfeto para IgG1, quatro para IgG2 e cinco para IgG3. A classe de IgG corresponde a cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas. É uma imunoglobulina monomérica e é a classe de anticorpo que atua nas respostas imunes secundárias, quando são produzidas em grande quantidade. São encontradas também no líquido extracelular, onde atuam na neutralização das toxinas, vírus e bactérias (Nunes, 2005).

A classe das imunoglobulinas G, possuem unidades básicas de quatro cadeias polipeptídicas, sendo de duas cadeias polipeptídicas leves C_L (*light chain*) idênticas e outras duas cadeias pesadas C_H (*heavy chain*) também idênticas. As cadeias pesadas estão unidas entre si por pontes de dissulfeto (-S-S-) e cada uma delas está unida, por sua vez, a uma cadeia leve, por pontes de dissulfeto e interações não-covalentes. A unidade básica é simétrica, quer dizer, cada metade contém uma cadeia leve e outra pesada, resultando em uma estrutura em forma de Y. Em cada cadeia leve e pesada, os 110 aminoácidos da porção amino-terminal constituem um domínio variável (V_L e V_H) (figura 1.6). O remanescente de cada cadeia leve consiste de um domínio constante único (C_L) e o restante de cada cadeia pesada contém três ou quatro domínios constantes (C_H) (figura 1.6) (Nunes, 2005).

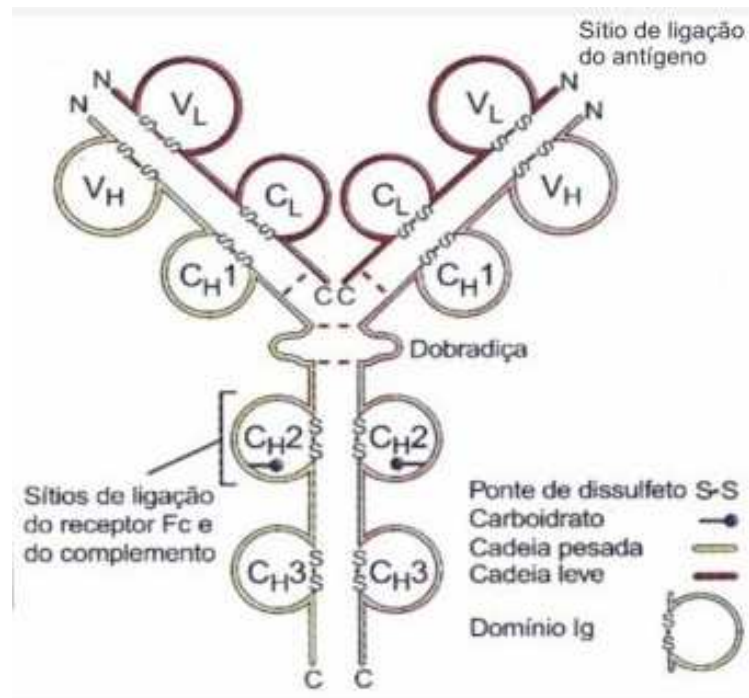


Figura 1.6: Estrutura da classe e subclasse da molécula de imunoglobulina G. Mostra as duas cadeias polipeptídicas leves C_L (*light chain*) idênticas e, as outras duas cadeias pesadas C_H (*heavy chain*) também idênticas. As cadeias pesadas estão unidas entre si por pontes de dissulfeto (-S-S-) e cada uma delas está unida, por sua vez, a uma cadeia leve, por pontes de dissulfeto e interações não-covalentes. Fonte: Abbas, 2003.

Um dos grandes avanços na área biomédica foi o desenvolvimento da tecnologia de produção de hibridomas, descrito por Georges Köhler e César Milstein, em 1975. Esta tecnologia possibilitou a produção de grande quantidade de anticorpos monoclonais específicos, capazes de reconhecer epítopos distintos de antígenos celulares, gerando uma enorme expansão na exploração de anticorpos na ciência e na medicina. A produção dos anticorpos monoclonais foi um dos principais impulsionadores da criação da indústria de biotecnologia, abrindo assim, o caminho para o desenvolvimento de testes imunológicos com reprodutibilidade, rapidez e um melhor diagnóstico de doenças infecciosas (Payne et al., 1988, Reilly, 1996, Guardian Unlimited, 2002, Alkan, 2004). É interessante notar que a necessidade de monitoramento da porcentagem e a contagem das células CD4 coincidiram com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais. No princípio dos anos 80, os anticorpos monoclonais foram introduzidos como ferramentas para o uso no diagnóstico de leucemias. Logo em seguida, os anticorpos monoclonais se tornaram cruciais para o monitoramento de pacientes com HIV (Barnett et al., 2008).

Os anticorpos monoclonais têm sido utilizados em substituição de soros policlonais, pois possuem vantagens como: maior reprodutibilidade lote a lote, não possui custo adicional para a purificação por afinidade e possuem uma alta especificidade. Os anticorpos monoclonais são muito usados nos procedimentos clássicos de imunoenaios, tais como: radioimunoensaio, procedimentos citotóxicos, ensaios imunoenzimáticos, imunofluorescência, entre outros (Sevier et al., 1981, Nelson et al., 2000).

Com o aumento do número de anticorpos monoclonais disponíveis, uma quantidade maior de marcadores de superfície se tornou detectável, e, conseqüentemente, o número de funções das subpopulações celulares definidas pelas diferenças qualitativas e quantitativas na expressão dos marcadores também aumentaram (Herzenberg et al., 2000). Assim, a grande maioria das medições citofluorimétricas com o objetivo de determinar parâmetros celulares estruturais ou funcionais implicam na utilização de fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais (Nelson et al., 2000).

1.8.1- Fluorocromos

Originalmente, a fluorescência foi observada em pequenas moléculas orgânicas ligadas por meios de anticorpos para a proteína de interesse (Giepmans et al., 2006). As moléculas fluorescentes, denominadas fluorocromos, podem ser conjugadas diretamente a anticorpos através de ligações covalentes. Os fluorocromos são moléculas propícias para marcar um alvo específico, produzindo uma resposta que pode ser observada após um estímulo por equipamentos que captam a emissão de luz (fotocolorímetro, espectrofotômetro ou fotômetro), e suas características espectroscópicas devem ser compatíveis com o equipamento que será usado para a detecção, no caso, o citômetro de fluxo (Golim et al., 2007).

Os fluorocromos são moléculas químicas, que absorvem luz em forma de energia em um determinado comprimento de onda e emitem novamente em um comprimento de onda maior. Estes dois processos são chamados de excitação e emissão. O processo de emissão segue muito rapidamente, geralmente na ordem de nanosegundos, e é conhecido como fluorescência (Rahman et al., 2006).

Para melhor analisar os fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais, foram desenvolvidas fontes variadas de laser com diferentes comprimentos de onda para uso na citometria de fluxo. As principais fontes de laser

utilizadas são: laser íon argônio, laser *Red diode*, laser íon *Kripton*, laser hélio-nônio, laser hélio-cádmio e lâmpada de mercúrio. O laser mais usado na citometria de fluxo é o laser de íon argônio (WHO – Laboratory Guidelines for Enumerating CD4 T Lymphocytes, 2007).

A capacidade de medir múltiplos parâmetros para cada célula é limitada pelo número de fluorocromos que podem ser utilizados simultaneamente de acordo com o citômetro de fluxo utilizado. A análise de células pela imunofluorescência, tornou-se cada vez mais poderosa com o uso simultâneo de múltiplos e distintos fluorocromos conjugados a anticorpos monoclonais. O uso de mais de um fluorocromo marcado na citometria de fluxo vai depender de alguns fatores como: intensidade de fluorescência, *background* na ligação do anticorpo monoclonal com marcação inespecífica, comparado com o anticorpo não conjugado e a sobreposição de espectros de excitação e emissão das fluorescências usadas com a influência de outros fluorocromos (Baumgarth e Roederer, 2000, Tjioe et al., 2001).

Uma grande quantidade de fluorocromos está disponível no mercado, todos oferecem certas características que são únicas. Para a seleção dos fluorocromos devem-se seguir critérios como: a necessidade de utilização de outros fluorocromos (conjugação, estabilidade etc), a célula de interesse, e a facilidade de utilização frente aos demais fluorocromos (Baumgarth e Roederer, 2000).

Os fluorocromos comerciais como a Fluoresceína 5 isomero I (FITC) / Molecular ProbesTM, Ficoeritrina (PE) / Molecular ProbesTM -, CyTM 5 Bis NHS Ester (Cy5) / GE Healthcare e, o CyTM 7 Bis NHS Ester (Cy7) / GE Healthcare foram selecionados em função da ausência de proteção patentária, pelos seus processos de conjugação serem de domínio público e por permitirem combinações de quatro cores para serem lidos no FACSCalibur (Becton e Dickinson, EUA) e em outros citômetro de fluxo.

- Isotiocianato de fluoresceína

Ringgs, em 1958, descreveu o uso do isotiocianato de fluoresceína como marcador celular. O fluorocromo FITC é uma pequena molécula de massa molecular de 390 daltons (Da). Atualmente, é o fluorocromo mais usado para a conjugação de anticorpos monoclonais (Brinkley, 1992, Rahman et al., 2006).

A reação em questão resulta na formação de uma ligação tioureia entre o fluorocromo e a proteína conforme pode ser observado na Figura 1.7.

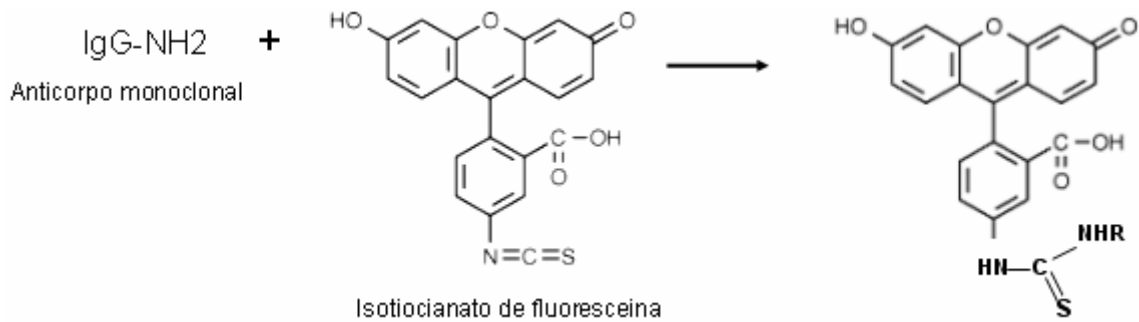


Figura 1.7: Representação esquemática da ligação do FITC ao anticorpo monoclonal. Fonte: Adaptado de Hermanson, 1996.

O fluorocromo FITC quando excitado com laser íon argônio (488nm), possui um pico de excitação a um comprimento de onda de 495nm e uma emissão de 518nm (Figura 1.8) (Roederer, 2004).

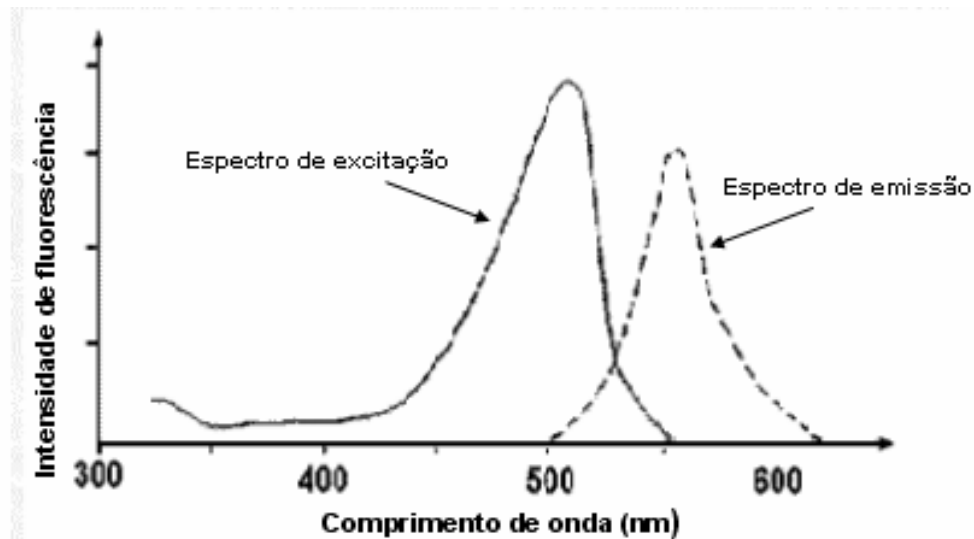


Figura 1.8: Gráfico de excitação e emissão do fluorocromo FITC. Fonte: Adaptado do site <http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence.html>.

- Ficoeritrina

As ficobiliproteínas são proteínas fluorescentes solúveis em água que funcionam com componentes no aparato fotossintético das algas blue-green, das cianobactérias e de dois grupos de algas eucarióticas (Glazer e Stryer, 1983, Perfetto e Roederer, 2007). Cada ficobiliproteína possui múltiplos grupos de cromóforos, que interferem no coeficiente de absorção de cada molécula protéica (Hermanson, 1996).

As ficobiliproteínas foram divididas em três classes, são elas: ficoeritrinas, ficocianinas e aloficocianinas. As diferenças entre as classes estão na estrutura protéica, no número de grupos de cromóforos e na propriedade da fluorescência (Liu et al., 2005). As ficoeritrinas podem ser classificadas em quatro classes, baseada na propriedade original de absorção: R-PE, B-PE, b-PE e C-PE (Marsac, 2003). A R-PE é uma proteína oligomérica de massa molecular de 240 kilodaltons (KDa), possui três subunidades: 6 α (20KDa), 6 β (20KDa) e 1 γ (30KDa) e apresenta 34 cromóforos na sua constituição. A R-PE é extraída de uma alga vermelha da espécie de *porphyra*, in vivo, funciona transferindo energia para a clorofila durante a fotossíntese (Perfetto e Roederer, 2007). Os três picos de absorbância máxima da R-PE são: 565, 539 e 498 nm (Figura 1.9).

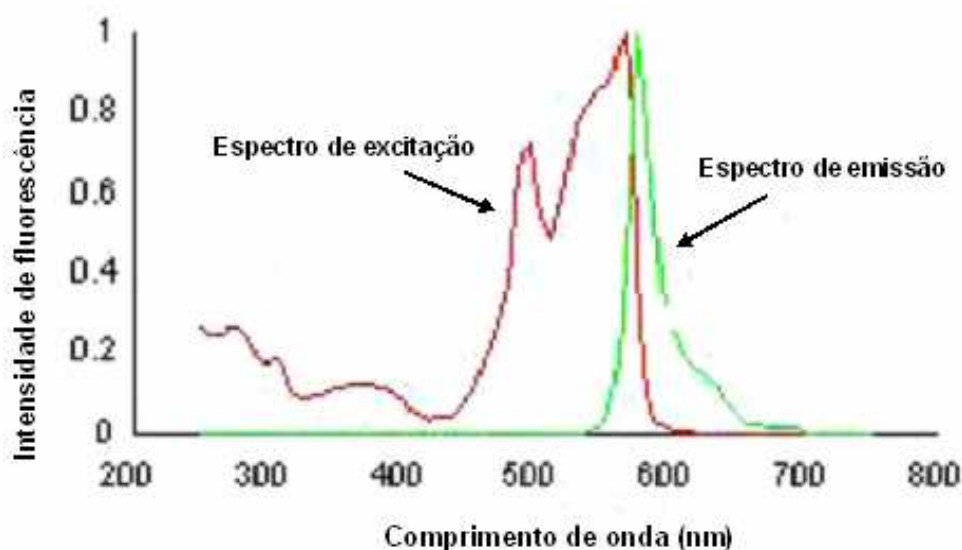


Figura 1.9: Espectro de excitação e emissão da R-PE. Fonte: Adaptado do site <http://www.prozyme.com/pdf/pb31.pdf>.

No processo de conjugação do fluorocromo R-PE com o anticorpo monoclonal anti-CD3, o processo de conjugação foi feito utilizando o Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilado (SMCC), que é um reagente intermediário bifuncional. O primeiro passo para ativar a R-PE, foi ligar o éster NHS, localizado no final da estrutura química do SMCC, aos grupamentos amino da R-PE, formando uma ligação estável. Com o fluorocromo ativado, o passo seguinte foi o acoplamento, na outra extremidade do SMCC, com o grupamento sulfidril livre dos anticorpos monoclonais provenientes da prévia redução pela ação do DTT, formando assim o conjugado anti-CD3/R-PE. A melhor condição de ligação entre a R-PE e o

anticorpo monoclonal ocorre na faixa de pH entre 6,5 - 7,5 (Figura 1.10) (Roederer et al., 1996, Hermanson, 1996) Roederer, 2004).

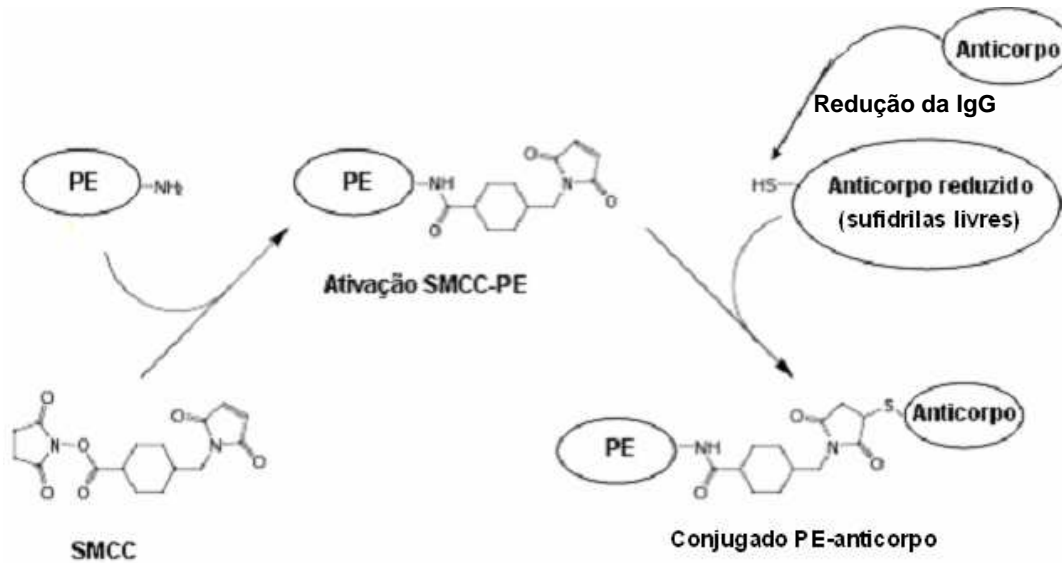


Figura 1.10: Processo de conjugação da R-PE com o anticorpo monoclonal. O SMCC atua como intermediário da ligação. Fonte: adaptado do Hermanson, 1996.

Nos processos de conjugação, a R-PE é uma proteína estável e que pode ser facilmente ligada a um anticorpo monoclonal sem alterar suas características de espectro de excitação e emissão (Liu et al., 2005). Possui uma alta fluorescência, ideal para a análise de receptores de superfície celular através da citometria de fluxo (Lansdorp et al., 1991). No que se refere a imunodiagnóstico, a R-PE é o fluorocromo mais usado entre as ficoeritrinas, pois a apresenta a absorvância 498 nm entre seus picos de absorção máxima, compatível com laser de íon argônio (488 nm), que é a fonte de energia mais utilizada (Liu et al., 2005).

- Cianinas

A autofluorescência celular é frequentemente um fator limitante na detecção da fluorescência. Portanto houve a necessidade de se desenvolver fluorocromos com fluorescência que fosse emitida além do comprimento de onda de 600 nm (Roederer et al., 1996). Assim, em 1990, Waggoner e colaboradores desenvolveram os fluorocromos cianina 5 (Cy5) e a cianina 7 (Cy7). As cianinas são pequenas moléculas orgânicas, com uma massa molecular de aproximadamente de 15 KDa e possuem intensa fluorescência e uma baixa hidrofobicidade (Hahn et al., 2001). Esses fluorocromos possuem muitas qualidades que os fazem ser extremamente

usuais na citometria de fluxo, são elas: alta eficiência quântica, um alto coeficiente de extinção e a fluorescência é emitida na região *red* (Cy5), acima de 600 nm, e *far-red* (Cy7), entre 700 e 800 nm (Roederer et al., 1996). A ligação química no processo de conjugação do fluorocromo Cy5 com os anticorpos monoclonais ocorre via aminas primárias (Figura 1.11) (Roederer, 2004).

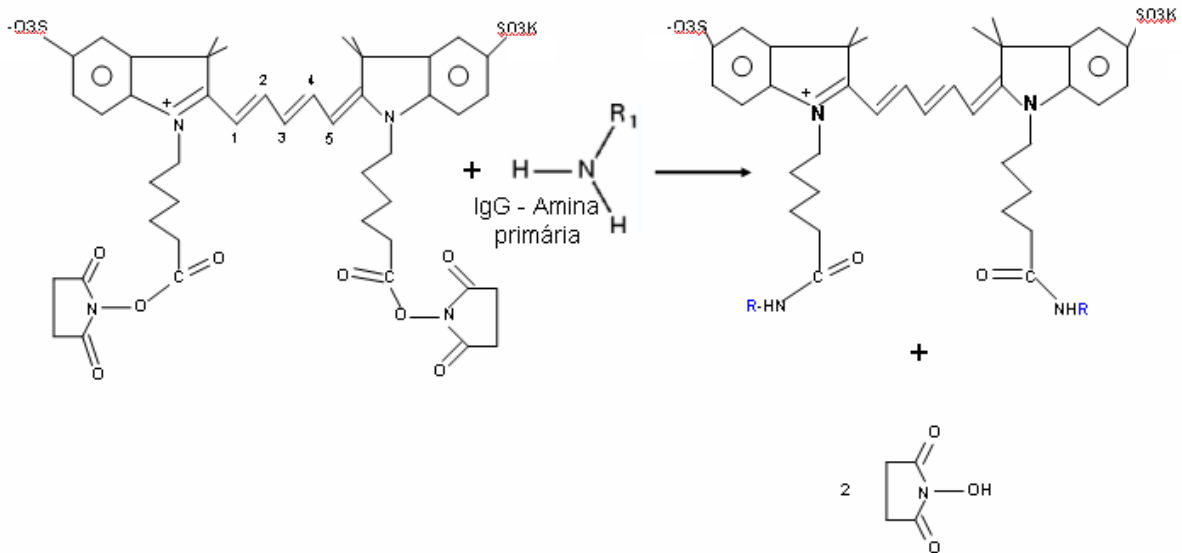


Figura 1.11: Processo de conjugação do Cy5 com o anticorpo monoclonal. Fonte: adaptado do Hermanson, 1996.

O Cy5 possui um pico de excitação a um comprimento de onda de 633 nm e a sua emissão está a 680 nm (Figura 1.12), quando excitado no laser *Red Diode* (635 nm) (Roederer, 2004). O espectro de excitação e emissão das cianinas é estreito, esta característica minimiza a sobreposição do espectro com outros fluorocromos (Roederer et al., 1996).

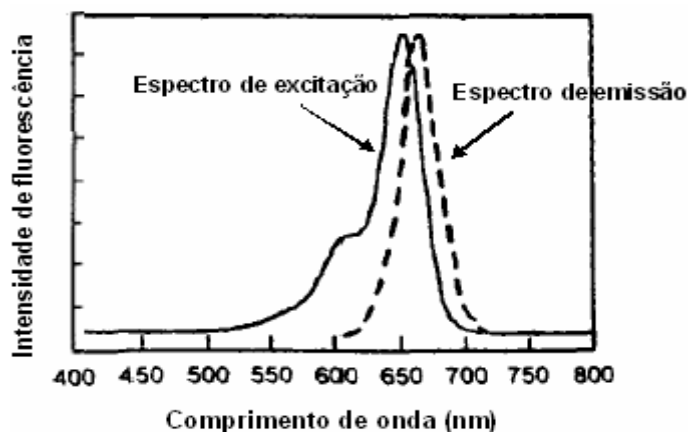


Figura 1.12: Gráfico de excitação e emissão do fluorocromo Cy5. Fonte: Adaptado de Lansdorp et al., 1991.

- Ficoeritrina /cianina 7

Glazer e Stryer (1983) propuseram a conjugação, através de ligações covalentes, de dois fluorocromos, a R-PE ligada a alofocianina, surgindo assim os fluorocromos *tandem*. Os fluorocromos *tandem* são reagentes complexos de serem desenvolvidos. Existem muitas variáveis entre o fluorocromo doador e o fluorocromo receptor (Roederer et al., 1996). Os fluorocromos *tandem* são muito utilizados, pois apresentam um alto coeficiente de extinção, uma alta eficiência quântica e um espectro de emissão que se estende para a região *far-red* (Tjioe et al., 2001).

Para a conjugação de dois fluorocromos é necessário que ocorra à transferência de energia entre moléculas dos fluorocromos envolvidos no processo, através da excitação e emissão da fluorescência. Este processo chama-se transferência de energia de ressonância. Para o fluorocromo *tandem* R-PECy7 o doador de energia é o fluorocromo R-PE e o receptor é o Cy7 (Tjioe et al., 2001). Quando excitado pelo laser de 488 nm, o R-PECy7 possui o pico de excitação a um comprimento de onda de 565 nm, e o pico de emissão é de 780 nm (Figura 1.13) (Roederer et al., 1996, Roederer, 2004).



Figura 1.13: Espectro de excitação e emissão do fluorocromo R-PECy7. Fonte: Adaptado do site <http://www.drmr.com/abcon/C7Paspec.html>.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

O objetivo desta dissertação foi avaliar se os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, produzidos pelo CIM, podem ser utilizados, quando conjugados a quatro fluorocromos diferentes, em um teste de imunofenotipagem para a quantificação de linfócitos T CD4⁺.

2.2 - Objetivos específicos

- Determinar a concentração e verificar a homogeneidade das preparações dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 cedidos pelo CIM.
- Conjugar os anticorpos monoclonais aos fluorocromos FITC, R-PE, Cy5 e R-PECy7, utilizando os protocolos de conjugação preconizados na literatura atualizada.
- Estabelecer os parâmetros para a análise por citometria de fluxo dos conjugados produzidos em Biomanguinhos.
- Comparar por citometria de fluxo os processos de conjugação dos anticorpos monoclonais conjugados (anti-CD3/ R-PE, anti-CD3/Cy5, anti-CD4/FITC, anti-CD4/ R-PECy7 e o anti-CD8/Cy5), nas marcações simples, dupla e tripla, ao padrão comercial Tritest da BD.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Obtenção dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais anti-CD3 (IgG2a), anti-CD4 (IgG2b) e anti-CD8 (IgG2a) foram cedidos pelo Centro de Imunologia Molecular de Cuba (CIM) e a temperatura de transporte das amostras manteve-se entre 4 a 8°C após o embarque.

3.2- Quantificação protéica dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais foram quantificados espectrofotometricamente a 280 nm tanto no CIM quanto no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) - Biomanguinhos. Neste último caso usou-se um espectrofotômetro Beckman DU530 – DNA/Protein Analyzer para a determinação das absorbâncias a 280 nm. O cálculo da concentração foi feito através da lei de Lambert-Beer $C = \frac{A}{kl}$, onde C - concentração, A - absorbância, k - coeficiente de extinção molar e l - distância que a luz atravessa a cubeta de quartzo . As diluições dos anticorpos monoclonais foram ajustadas a fim de fornecer leituras de absorbância a 280 nm entre 0,2 e 0,4 (Pace et al., 1995).

3.3- Concentração dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 foram concentrados por ultrafiltração em um sistema Amicon com membranas de 100 KDa de *cut off* (Millipore) e pressão de nitrogênio de 80 psi.

3.4- Verificação da homogeneidade protéica dos anticorpos monoclonais

A homogeneidade das preparações dos anticorpos monoclonais cedidos pelo CIM foi verificada por eletroforese desnaturante em gradiente de gel de poliacrilamida (8-25%), utilizando-se o sistema PhastSystem (GE Healthcare). Para esta análise foram aplicados nos géis 2, 4 e 10 µg de cada um dos anticorpos monoclonais. Para a estimativa do peso molecular (PM) das cadeias polipeptídicas observadas, foi utilizado um padrão de peso molecular conhecido. Padrão pré-corado da Bio-Rad: (miosina 193000; β-galactose 118000; albumina de soro bovino 99000; ovalbumina 54000; anidrase carbônica 37000; inibidor de tripsina 29000; lisozima 20000 e aprotinina 7000), tendo como referência de migração eletroforética a imunoglobulina G humana da Bio Chemika – Sigma, de peso molecular de 150000.

A revelação dos géis foi feita de acordo com protocolo do PhastSystem, utilizando-se a solução com Coomassie Brilliant blue R350 0,2% na mistura de metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v) como corante. O descoramento foi feito com a mesma mistura metanólica-acética (Neuhoff et al., 1985).

A estimativa do peso molecular dos anticorpos monoclonais decorrentes de suas mobilidades eletroforéticas foi avaliada após a densitometria e para tanto, utilizou-se o programa *Image Master* (GE Healthcare).

3.5.- Processos de conjugação dos anticorpos monoclonais a diferentes fluorocromos

3.5.1 - Conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD4 com FITC

A preparação do anticorpo monoclonal anti-CD4 foi cromatografado em uma, coluna de PD-10 (GE Healthcare) equilibrada com solução tampão carbonato 500 mM, pH 9,5. Os efluentes referentes aos anticorpos monoclonais foram reunidos em um único tubo e sua concentração foi determinada quantitativamente conforme descrito no item 3.2.

Reação de conjugação entre o anticorpo monoclonal anti-CD4 e o FITC

Para a reação de conjugação da preparação do anti-CD4 com o FITC, utilizou-se uma solução de 10 mg do fluorocromo FITC dissolvidas em 1 mL de Dimetil sulfóxido (DMSO) anidro (Sigma). Na mistura reacional foram utilizadas 2 mg do anticorpo monoclonal anti-CD4 e 160 µg de FITC da solução mãe. A reação ocorreu na ausência de luz, à temperatura ambiente e sob agitação. Após 60 minutos de reação o produto foi aplicado em uma coluna PD-10 equilibrada com solução tampão Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0.1%, pH 8,2, para a remoção do FITC em excesso. O conjugado produzido foi estocado a uma temperatura de 2 a 8°C.

A determinação da concentração do anticorpo monoclonal no conjugado e a razão molar (FITC / anti-CD4) foram determinadas pela leitura das absorvâncias a 280 nm e a 495 nm e calculados conforme as equações 1 e 2 descritas abaixo (Roederer, 2004 e Golim et al., 2007).

$$1) [\text{IgG (mg/mL)}] = (\text{Abs}_{280\text{nm}} - 0,31 \times \text{Abs}_{495\text{nm}}) \times 0,694$$

$$2) \text{Razão molar} = 3,1 \times \text{Abs}_{495\text{nm}} / (\text{Abs}_{280\text{nm}} - 0,31 \times \text{Abs}_{495\text{nm}})$$

3.5.2 Conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD3 com R-PE

Ativação do R-PE com Succinimidil 4 (N-metil Maleido) Ciclohexano 1-Carboxilato (SMCC)

A *red* ficoeritrina (R-PE) comercial foi adquirida em uma suspensão de sulfato de amônio a 60% e sendo assim, o procedimento inicial foi a retirada deste através da centrifugação a 10.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante contendo o sal foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 2,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0. A solução final contendo o fluorocromo foi aplicada em uma coluna PD-10 previamente equilibrada com a solução tampão fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0.

A homogeneidade e concentração da preparação do fluorocromo R-PE foram estimadas pela leitura das absorvâncias a 565 nm e 620 nm. A razão entre as

absorbâncias medidas a 565 nm / 620 nm foi utilizada para constatar a ausência de contaminantes conforme recomendado no protocolo de conjugação (Roederer, 2004). Para a ativação de 1,6 mg R-PE foram adicionados 17,5 µL de uma solução de SMCC a 10 mg/mL. A análise foi realizada na ausência de luz, sob agitação constante e à temperatura ambiente por 60 minutos. O fluorocromo ativado foi dessalinizado em colunas PD-10, previamente equilibrada com a solução tampão MES 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,0. A concentração do produto formado foi estimada pela razão molar.

Redução das pontes dissulfeto do anticorpo monoclonal

Para este processo foi utilizado 0,5 mg de anti-CD3, ao qual foi adicionado 8 µL da solução de DL-Ditiotreitol DTT (Sigma) a 15,4 mg/mL. Após 30 minutos de reação, o anticorpo monoclonal anti-CD3 reduzido foi submetido à cromatografia em coluna PD-10, equilibrada com a solução tampão MES 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,0 para a retirada do excesso de DTT. A concentração do anticorpo monoclonal reduzido e dessalinizado foi estimada pela leitura de absorbância a 280 nm. Esta preparação contendo o anticorpo reduzido foi imediatamente submetida à reação de conjugação com a ficoeritrina ativada (SMCC/R-PE).

Conjugação entre o SMCC/R-PE e o anticorpo monoclonal anti-CD3

A massa de 1,6 mg do fluorocromo ativado foi adicionada a um volume de 400 µL contendo uma massa de 0,5 mg do anticorpo monoclonal anti-CD3. A reação foi realizada na ausência de luz, sob agitação constante e à temperatura ambiente por 60 minutos. Após esse tempo, os grupamentos sulfidril livres citadas no item acima, foram bloqueados usando 1,7 µL da solução de N-ethylmaleimide (NEM), a 10 mg/mL em DMSO. Após 20 minutos de reação o conjugado foi dessalinizado em colunas de PD-10, equilibradas em solução tampão Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0.1%, pH 8,2.

A concentração de R-PE foi estimada de acordo com equação $\frac{Abs_{565}}{8,2}$ e a homogeneidade do R-PE foi estimada através da relação $\frac{Abs_{565}}{Abs_{620}}$ que deve ser maior do que 50 (Roederer, 2004).

3.5.3. - Conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD3 com Cy5

O anticorpo monoclonal anti-CD3 foi cromatografado em uma coluna de PD-10 previamente equilibrada, em tampão carbonato 500 mM, pH 9,5. A concentração do anticorpo foi determinada conforme descrito no item 3.2.

Reação de conjugação entre o anticorpo monoclonal anti-CD3 e o Cy5

Para a reação de conjugação entre o anticorpo monoclonal anti-CD3 e o fluorocromo Cy5 foram utilizadas três condições reacionais diferentes com excesso molar do fluorocromo de 3, 5 e 7 vezes. Foi preparada uma solução de Cy5 de 1 mg/mL, desta solução foram transferidas alíquotas de Cy5, conforme observado na Tabela 3.1, para tubos contendo 2 mg de anticorpo monoclonal anti-CD3. A reação ocorreu na ausência de luz, por 60 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação constante. As misturas reacionais foram aplicadas em colunas PD-10 equilibradas com solução tampão Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0.1%, pH 8,2, para a remoção do Cy5 em excesso.

3.5.4 - Conjugação anticorpo monoclonal anti-CD8 com o Cy5

O processo de conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD8 com o fluorocromo Cy5 foi realizado conforme descrito no item anterior.

Tabela 3.1- Massa de Cy5 utilizada no processo de conjugação com o anticorpo monoclonal anti-CD3 e anti-CD8.

Razão molar	Massa Cy5/2mg de antiCD3 e anti-CD8
3:1	48µg
5:1	80µg
7:1	112µg

3.5.5. - Conjugação anticorpo monoclonal anti-CD4 com o *tandem* R-PECy7

Ligação do R-PE com Cy7

A suspensão do fluorocromo R-PE em sulfato de amônio a 60% foi centrifugada a 10.000 rpm por 8 minutos, o sobrenadante foi descartado e o

precipitado contendo o fluorocromo foi ressuspensão em 2,5 mL de solução tampão carbonato 500 mM, pH 9,0. A solução contendo a R-PE foi então aplicada em uma coluna PD-10 previamente equilibrada com a solução tampão carbonato 500 mM, pH 9,0

A homogeneidade e concentração da preparação do fluorocromo R-PE acima obtido, foram estimadas pela leitura das absorbâncias a 565 nm e 620 nm. A razão entre as absorbâncias medidas a 565 nm / 620 nm foi utilizada para constatar a ausência de contaminantes conforme recomendado no protocolo de conjugação (Roederer, 2004).

O fluorocromo R-PE disperso em solução tampão de reação carbonato 500 mM, pH 9,0, foi adicionada a 41,8 μ L de Cy7 (10 mg/mL em DMSO), o que corresponde a uma razão de 83,3 moles de Cy7/mg de R-PE, onde a razão molar Cy7/R-PE é igual a 20. Após 60 minutos de reação, na ausência de luz, à temperatura ambiente e sob agitação constante, a mistura reacional foi aplicada em uma coluna PD-10 equilibrada com solução tampão fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0, para a remoção do Cy7 não reagente.

Ativação do R-PECy7 com o SMCC

O fluorocromo *tandem* R-PECy7 (6,3 mg) foi ativado pela adição de 69,3 μ L de SMCC a 10 mg/mL em DMSO. O tubo reacional foi mantido sob a ausência de luz, agitação constante e à temperatura ambiente por 60 minutos. O conjugado R-PECy7 ativado foi então dessalinizado em colunas PD-10, previamente equilibradas com a solução tampão MES 50 mM, EDTA 2 mM, pH 6,0. Após ativação do R-PECy7 ao SMCC, a concentração do R-PECy7 foi estimada a através da razão da leitura da absorbância a $\frac{565 \text{ nm}}{8,2}$.

Redução de pontes dissulfeto do anticorpo monoclonal

Foi preparada uma solução com 20 μ L de DTT a 15,4 mg/100 μ l de água destilada para cada miligrama de anticorpo monoclonal presente em solução. Foram submetidos à redução das pontes dissulfeto reduzido 6 mg de anti-CD4, para tanto, foi adicionado 9,8 μ L da solução de DTT. Após 30 minutos de reação, o anticorpo monoclonal anti-CD4 reduzido foi submetido à cromatografia em coluna PD-10, equilibrada com a solução tampão MES 50 mM, EDTA 2 mM pH 6,0, para retirada

do excesso de DTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 280 nm, para estimativa de concentração do anticorpo reduzido e dessalinizado. Este foi imediatamente submetido à reação com o R-PECy7.

Conjugação entre o anticorpo monoclonal anti-CD4 e o R-PECy7

A preparação com 4,62 mg de R-PECy7/SMCC foi adicionado um volume 260 µL de uma preparação contendo 1,5 mg do anticorpo monoclonal anti-CD4. A reação ocorreu sob a ausência de luz, agitação constante e à temperatura ambiente por 60 minutos. Após este período as sulfidrilas não ligadas ao anticorpo monoclonal foram bloqueadas pela adição de 5,1 µL de NEM a 10 mg/mL em DMSO. Após 20 minutos de reação em agitação constante, o conjugado foi dessalinizado em colunas de PD-10, equilibradas em solução tampão Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ 0.1%, pH 8,2.

Os protocolos utilizados para as reações de conjugação neste trabalho experimental foram descritos por Roederer (2004).

Os fluxogramas dos processos de conjugação podem ser encontrados no capítulo anexo mais a frente.

3.6- Determinação da razão molar dos conjugados produzidos em Biomanguinhos

A eficiência de cada um dos processos de conjugação foi estimada a partir da razão molar entre as absorbâncias a 280 nm dos anticorpos monoclonais e as absorbâncias máximas dos fluorocromos utilizados nas conjugações. A equação abaixo foi utilizada para determinar a razão molar dos conjugados produzidos em Biomanguinhos (Molecular Probes 2003). Para tanto foi utilizado o espectrofotômetro da Beckman DU530 – DNA / Protein Analyzer para a determinação das absorbâncias.

$$\text{Razão molar} = \frac{\text{AbsMax Fluorocromo. no conjugado} \times \text{Peso molecular IgG}}{[\text{Abs}_{280} \text{ IgG conjugado.}] \times \text{Coeficiente de extinção Fluorocromo}}$$

3.7- Análise dos conjugados produzidos em Biomanguinhos por citometria de fluxo

Os conjugados CD3/R-PE, CD4-FITC, CD3-Cy5, CD8-Cy5 e CD4/R-PECy7, foram analisados por citometria de fluxo através da marcação de células de sangue periférico de amostras de sangue de indivíduos normais e de pacientes HIV+. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados das marcações utilizando o anticorpo monoclonal comercial Tritest (*Becton e Dickinson* – BD, EUA).

3.8- Casuística

Foram utilizadas amostras de sangue indivíduos normais e de pacientes HIV+ do Hospital Evandro Chagas obtidos no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/IOC. Para a análise dos conjugados anti-CD3/R-PE, anti-CD4/FITC e anti-CD8/Cy5 (marcação tripla) analisou-se 62 amostras pacientes HIV+, sendo 15 deste total analisados também com o anti-CD3/Cy5 e o anti-CD4/ R-PECy7 (dupla marcação).

3.9- Coleta das amostras

As amostras de sangue periférico obtidas de indivíduos normais e de pacientes HIV+, foram coletadas por venopunção em tubos de 5 mL (BD) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

3.9.1. - Preparo das amostras

Após coleta e identificação das amostras nos tubos de poliestireno com capacidade de 5 mL, foram adicionados 50 µL de sangue total nos tubos e posteriormente adicionados os volumes dos anticorpos monoclonais conjugados a serem testados. Após agitação em vórtex, as amostras foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, foi realizada a lise das hemácias através da adição de 450 µL de solução de lise da marca Cytognos. As amostras permaneceram a temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 15 minutos e foram, então, avaliadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD, EUA).

Para a análise por citometria de fluxo dos conjugados, foram utilizadas as seguintes combinações de anticorpos monoclonais:

- Tritest BD - CD3-PerCP, CD4-FITC, CD8-PE;
- Simples Biomanguinhos - CD3/R-PE, CD4-FITC, CD8-Cy5, CD3-Cy5, CD4/R-PECy7;
- Tripla Biomanguinhos - CD3/R-PE, CD4-FITC, CD8-Cy5 e
- Dupla Biomanguinhos - CD3-Cy5, CD4/R-PECy7

Para o Tritest da BD foram usados 10 µL de anticorpo monoclonal por amostra. Nas marcações dos anticorpos monoclonais conjugados no LATED - Biomanguinhos, foram inicialmente analisados diferentes volumes (2,5 µL, 5 µL, 10 µL e 20 µL) dos referidos anticorpos monoclonais. Após esta análise inicial foi selecionado o volume de 2,5 µL usando-se a concentração inicial e as diluições de 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. Os anticorpos monoclonais da dupla e tripla marcação de Biomanguinhos foram previamente diluídos em um tubo separado (2,5µL de cada anticorpo monoclonal) sendo utilizado o volume final de 5 µL por amostra para a dupla marcação e 7,5 µL por amostra para a tripla marcação.

A análise dos conjugados foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, EUA) equipado com um laser de íon argônio de 488 nm e um laser diodo vermelho de 635 nm e filtros de 530/30 nm para FL1, 585/42 nm para FL2, 670 nm para FL3 e 661/16 nm para FL4, sendo capaz de ler quatro cores simultaneamente. Os dados referentes à distribuição celular, para a obtenção de população de interesse, foram realizados em gráficos *dot plot* dos parâmetros de tamanho celular (*Forward scatter*) versus granulidade (*side scatter*). Para cada amostra foram analisados 5000 eventos na janela (*gate*) de linfócitos para excluir da avaliação as células mortas, as hemácias e outras populações celulares (monócitos e granulócitos).

As fluorescências emitidas pelos fluorocromos do anticorpo monoclonal Tritest da BD foram lidas nos seguintes filtros (FL): Em FL1 - CD4-FITC, FL2 - CD8-PE e FL3 - CD3-PerCP. Na amostra referente à Tripla marcação de Biomanguinhos foi lida em FL1 - CD4-FITC, FL2 - CD3-PE e FL4 - CD8-Cy5, enquanto as duplas foram lidas em FL3 - CD4-PECy7 e em FL4 - CD3-Cy5. Os resultados das fluorescências foram analisados em histogramas, avaliando-se o percentual de marcação das

células para cada anticorpo. O programa computacional utilizado para fazer a análise dos resultados obtidos na citometria de fluxo foi o *CellQuest* (BD).

3.9.2. – Análise estatística

Para a estatística dos resultados da citometria de fluxo entre os conjugados produzidos em Biomanguinhos e o Tritest da BD utilizou-se a correlação linear de Pearson, o programa para a análise dos dados obtidos foi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 16.0. A correlação de Pearson é uma medida de associação linear entre variáveis quantitativas e varia entre -1 e +1. O coeficiente igual a +1 significa que as duas variáveis tem uma correlação perfeita positiva, assim quando uma aumenta a outra também aumenta em média, em um valor proporcional. Quando o coeficiente é -1 significa que existe uma relação linear negativa perfeita entre ambas. Por convenção em ciências exatas sugere-se que valores menores que 0,2 indica uma associação linear muito baixa, entre 0,2 e 0,39 baixa, entre 0,4 e 0,69 moderada, entre 0,7 e 0,89 alta e por fim, entre 0,9 e 1 uma associação muito alta. O mesmo se aplica para as correlações negativas (Pestana e Gageiro, 2005).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Avaliação dos anticorpos monoclonais

Os critérios de avaliação dos anticorpos monoclonais cedidos por Cuba foram os mesmos fornecidos pelo CIM. Portanto, foi utilizada a quantificação de proteína pela leitura a absorvância a 280 nm, e para a avaliação da homogeneidade foi selecionada a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante por ser uma metodologia simples, resolutiva e de fácil implantação no controle de qualidade.

4.1.1- Quantificação protéica dos anticorpos monoclonais

Os valores de concentração dos anticorpos monoclonais enviados pelo CIM, foram similares aos valores estimados em Biomanguinhos, com exceção do monoclonal anti-CD3, que apresentou uma concentração 2,8 vezes menor do que aquela determinada no CIM (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Determinação da concentração protéica dos anticorpos monoclonais enviados por Cuba pela leitura da absorvância a 280 nm.

Anticorpo monoclonal	Lote	Conc. de proteína fornecida por Cuba (DO ₂₈₀) mg/mL	Conc. de proteína estimada em Biomanguinhos (DO ₂₈₀) mg/mL
Anti-CD3	01P0701	3,47	1,21
Anti-CD4	02P0701	1,52	1,35
Anti-CD8	03P0601	0,15	0,16

A diminuta concentração dos anticorpos monoclonais não foi um fator impeditivo para a aquisição deste insumo, entretanto, houve a necessidade de se incluir uma etapa de redução de volume da amostra a fim de aumentar a concentração dos anticorpos monoclonais, desejável para as reações de conjugações com fluorocromos.

4.1.2- Homogeneidade dos anticorpos monoclonais por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 8-25% (SDS-PAGE)

Na análise eletroforética dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 foram utilizadas massas de 2, 4 e 10 μg (Figura 4.1, painéis A, B, e C) respectivamente. No painel B, relacionado à massa de 10 μg , foram observadas outras bandas, além daquelas relativas a cadeia leve (peso molecular de aproximadamente 25000) e cadeia pesada (peso molecular de aproximadamente 50000) da IgG, tanto na IgG comercial (raia 2) quanto nos anticorpos monoclonais anti-CD3 (raias 3), anti-CD4 (raia 4) e anti-CD8 (raia 5). Nos painéis A e C relacionados às massas de 2 e 4 μg , não foram observadas bandas diferentes daquelas esperadas para a IgG mediante tal metodologia. A migração eletroforética relativa a massa de 4 μg dos anticorpos monoclonais (painel C) foi selecionado para as análises densitométricas e estimativa de pesos moleculares das proteínas sob investigação. Tal escolha foi baseada no fato de que o perfil eletroforético obtido apresenta somente duas bandas relacionadas a IgG com intensidades significativas para tal análise. Os painéis D, E e F relacionados aos painéis G, H e I, respectivamente, são provenientes das análises densitométricas relativas as migrações eletroforéticas de 4 μg dos anticorpos monoclonais adquiridos de Cuba. As migrações eletroforéticas relacionadas aos meios de picos (painéis D, E e F) foram usados para as estimativas de pesos moleculares das cadeias polipeptídicas dos referidos anticorpos monoclonais (Tabela 4.2). Para tanto, uma idêntica análise densitométrica foi feita a partir das migrações eletroforéticas de proteínas padrões de pesos moleculares conhecidos submetidos à mesma eletroforese. Os valores de pesos moleculares estimados a partir das migrações eletroforéticas referentes às duas bandas reveladas (cadeia pesada e cadeia leve) e inerentes aos anticorpos monoclonais.

Tabela 4.2: Estimativa de peso molecular das cadeias polipeptídicas dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 cedidos por Cuba.

Anticorpos monoclonais	Cadeia Pesada	Cadeia Leve
Anti-CD3	48452	20136
Anti-CD4	55004	21984
Anti-CD8	52386	21771

Tais valores são aproximadamente iguais aqueles conhecidos para os pesos moleculares das cadeias pesadas (50000) e cadeias leves de (25000) da IgG.

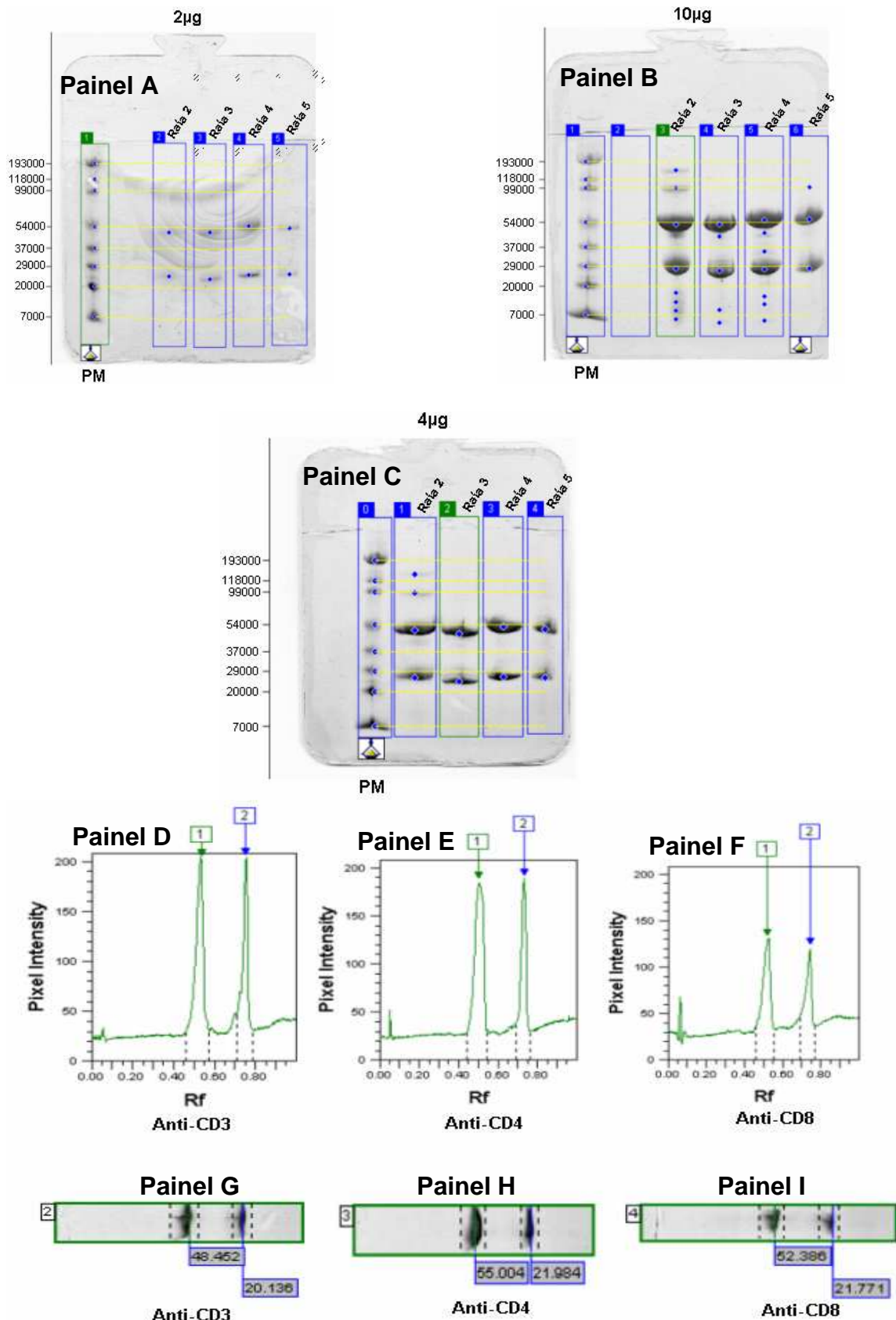


Figura 4.1: Verificação da homogeneidade protéica dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, através da eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida em gradiente 8-25% (SDS-PAGE). Os Painéis A, B e C apresentam as eletroforeses verificadas das massas de 2, 4 e 10 µg de cada um dos anticorpos monoclonais. Os painéis D, E e F, co-relacionados aos painéis G, H e I respectivamente, mostram as análises densitométricas relativas e a estimativa de peso molecular indicada nos painéis G, H e I, relacionadas ao gel de 4µg de cada um dos anticorpos monoclonais.. Imagens obtidas do programa *Image Master*.

4.1.3- Concentração dos anticorpos monoclonais

Uma vez que os valores de concentração protéica estimados pela determinação da absorbância a 280 nm foram abaixo dos valores recomendados para as reações de conjugação, a saber, 5 mg/mL - 10 mg/mL, os anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8, foram concentrados de 8 a 20 vezes por ultrafiltração em um sistema da Amicon. Esta é uma técnica rápida, eficiente e na maioria das vezes apresenta pouca perda de proteína. Alguns parâmetros para a otimização do processo devem ser observados, tais como concentração salina e pH (Ghosh e Cui, 2000, Ghosh et al., 2003 e Pinheiro et al., 2005). A recuperação protéica dos anticorpos monoclonais foi de 76,7% para o anti-CD3, 88,6% para o anti-CD4 e de 90,0% para o anti-CD8, conforme observado na Tabela 4.3. As perdas protéicas durante o processo de ultrafiltração podem ter ocorrido por alguma adsorção da proteína a membrana de filtração e/ou também pelo pequeno número de lavagens do material presente no recipiente do sistema Amicon.

Tabela 4.3- Resultado do processo de ultrafiltração dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8.

Anticorpo monoclonal	Vol. inicial (mL)	Conc. Inicial (mg/mL)	Proteína total (mg)	Vol. Final (mL)	Conc. Final (mg/mL)	Proteína total (mg)	Recuperação Protéica %
Anti-CD3	33,0	1,21	39,9	3,0	10,2	30,6	76,7
Anti-CD4	23,0	1,35	35,0	2,5	12,4	31,0	88,6
Anti-CD8	181,0	0,16	29,0	8,0	3,3	26,1	90,0

4.2- Conjugação dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 com fluorocromos

De uma forma geral, o processo de conjugação depende de alguns fatores ligados a proteína a ser conjugada, tais como: reatividade do fluorocromo com a proteína, peso molecular, número de aminas reativas ou outros grupos ligantes em potencial e da concentração de proteínas (Golim et al., 2007). Como parâmetro inicial de avaliação da conjugação, levou-se em consideração o nível de marcação do conjugado através da razão molar entre o fluorocromo e o anticorpo monoclonal.

4.2.1- Conjugado Anti-CD4/FITC

A conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD4 ao fluorocromo FITC foi baseada na reação do isotiocianato de fluoresceína com grupamentos amina ou amino terminal presentes na imunoglobulina (Hermanson, 1996).

A razão molar do conjugado anti-CD4/FITC foi estimada de acordo com as equações descritas na seção 3.5.1, levando-se em consideração os coeficientes de extinção do FITC e do anticorpo monoclonal anti-CD4. O resultado da razão molar do conjugado anti-CD4/FITC foi de 3,91, ou seja, aproximadamente 4 moléculas de FITC por anticorpo monoclonal marcado, o que está de acordo com a razão molar sugerida por Roederer (2004) e Golim (2007), que é de 3 a 6 moléculas de fluorocromo FITC por anticorpo monoclonal. As razões molares com altos valores podem resultar em uma baixa solubilidade, assim como, uma redução da intensidade de fluorescência, decorrente das colisões entre as moléculas (Roederer, 2004).

4.2.2- Conjugado Anti-CD3/R-PE

Antes do início do processo de conjugação verificou-se a homogeneidade da preparação da ficoeritrina pela determinação da relação Abs565nm / Abs620nm, desde que os valores maiores que 50 poderiam expressar contaminação por cianinas (Roederer et al., 1996 e Roederer, 2004). O resultado da relação 565nm/620nm obtido foi de 62,86, este resultado mostra que o fluorocromo R-PE não apresenta contaminação por cianinas.

Após o processo de conjugação, foi feito o cálculo da razão molar do produto formado (anti-CD3/R-PE), conforme descrito pela Molecular Probes (2003), onde o resultado da razão molar obtido foi de 2,35. Este valor está de acordo com o descrito na literatura, que preconiza 2 moléculas do fluorocromo R-PE por molécula de anticorpo monoclonal (Roederer, 2004).

4.2.3- Conjugado AntiCD3/Cy5 e Anti-CD8/Cy5

Conforme proposto por Roederer (2004), foram testadas três condições de reação entre o Cy5 e os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD8. Não há consenso na literatura para valor ou faixa de valores ideal para razão molar do

fluorocromo Cy5, porém Roederer (2004) e Roederer et al (1996) defendem razões molares entre 3 e 7 para os conjugados com Cy5, enquanto Hahn (2001) estipula valores de razão molar entre 2 e 3. Os conjugados anti-CD3/Cy5 e anti-CD8/Cy5 produzidos em Biomanguinhos foram analisados por citometria de fluxo usando diferentes razões molares (3:1, 5:1 e 7:1). Frente ao padrão comercial Tritest da BD os conjugados não apresentaram marcações celulares inespecíficas (monócitos e granulócitos) e nenhum *background* foi observado. Para a análise citofluorimétrica, os conjugados anti-CD3/Cy5 e anti-CD8/Cy5 foram testados com variadas massas representadas por volumes diferentes, e também concentrações diferentes, correspondendo a algumas diluições das preparações dos conjugados.

A Tabela 4.4 apresenta os resultados da razão molar para os conjugados anti-CD3/Cy5 e anti-CD8/Cy5, calculados conforme descrito no item 3.6.

Tabela 4.4- Cálculo da razão molar dos conjugados anti-CD3Cy5 e do anti-CD8/Cy5.

Conjugado	Anti- CD3/Cy5 (3:1)	Anti- CD3/Cy5 (5:1)	Anti- CD3/Cy5 (7:1)	Anti- CD8/Cy5 (3:1)	Anti- CD8/Cy5 (5:1)	Anti- CD8/Cy5 (7:1)
Razão molar	3,66	5,07	6,45	1,75	3,37	4,46

4.2.4- Conjugado Anti-CD4/R-PECy7

O processo de conjugação utilizando o fluorocromo *tandem* apresenta-se mais complexo quando comparado aos processos utilizando um único fluorocromo. A principal dificuldade no processo de conjugação com este fluorocromo está na ligação do fluorocromo R-PE ao fluorocromo Cy7. A relação molar de 1 molécula de R-PE para 20 moléculas do fluorocromo Cy7 deve ser respeitada para que não ocorram ligações inespecíficas ou baixa fluorescência (Roederer, 2004). Neste sentido, Roederer e colaboradores (1996) sugeriram que a razão molar do conjugado R-PECy7, através do cálculo da razão das absorbâncias 755nm e 565nm, fosse 1,0 aproximadamente. Utilizando este critério, a razão 755nm/565nm estimada para o conjugado R-PECy7 produzido neste trabalho foi de 0,991. Este resultado corresponde a uma relação de 20 moléculas de Cy7 para cada molécula do fluorocromo R-PE.

Segundo dados da literatura a razão molar indicada para o processo de conjugação do *tandem* R-PECy7 é de 2 moléculas deste fluorocromo para cada molécula de anticorpo monoclonal. A razão molar obtida para este conjugado foi de 4,8, ou melhor, 5 moléculas de R-PECy7 por molécula de anticorpo monoclonal. (Roederer 2004). Apesar de o valor ser mais que o dobro do indicado na literatura, nas análises por citometria de fluxo não foram observados problemas de inespecificidade ou aumento de *background*. Neste mesmo artigo, Roederer ressalta que outras razões molares podem ser válidas.

Nos protocolos de conjugação dos fluorocromos R-PE, Cy5 e R-PECy7, sugeridos por Roederer (2004), não são apresentadas as equações matemáticas para o cálculo da razão molar, assim, as equações usadas foram sugeridas pela Molecular Probes (2003).

4.3- Análise dos conjugados por citometria de fluxo

Os conjugados (anticorpo monoclonal - fluorocromo) foram analisados por citometria de fluxo utilizando-se para tanto amostras de sangue de indivíduos normais. A figura 4.2 mostra uma representação gráfica das análises citofluorimétricas, utilizando o anticorpo monoclonal Tritest da BD, que serviu como uma orientação para a análise dos dados obtidos com os conjugados similares produzidos no LATED - Biomanguinhos.

Previamente ao desenvolvimento da análise citofluorimétrica dos conjugados produzidos no LATED, houve a necessidade de se ajustar alguns parâmetros relativos à quantidade de massa e a concentração dos referidos insumos. Os dados obtidos são a seguir apresentados e discutidos.

4.3.1- Conjugado Tritest da BD

O gráfico A da Figura 4.2, mostra a dispersão celular onde se observam as populações de linfócitos (R1), monócito (cor verde) e granulócitos (cor preta). A partir do gráfico de dispersão celular, foi identificada a população de interesse (linfócitos - R1). Os gráficos B, C e D são representações da dupla marcação dos três anticorpos marcados do Tritest da BD. Os gráficos (*dot plot*) E, F e G expressam a marcação dos anticorpos monoclonais marcados frente ao parâmetro granulosidade, o que nos possibilita avaliar a ocorrência de inespecificidade nas populações fora da

janela de linfócitos (R1). Os gráficos H, I e J são histogramas feitos a partir da janela de linfócitos e mostram os resultados das marcações simples em percentagem para cada anticorpo monoclonal. Este percentual é determinado pela identificação do pico entre as células marcadas positivamente, indicado pelo cursor M1. Os percentuais de marcação encontrados foram de 40,09% de células positivas para CD4⁺, 24,56% de células CD8⁺ e 65,31% de células CD3⁺.

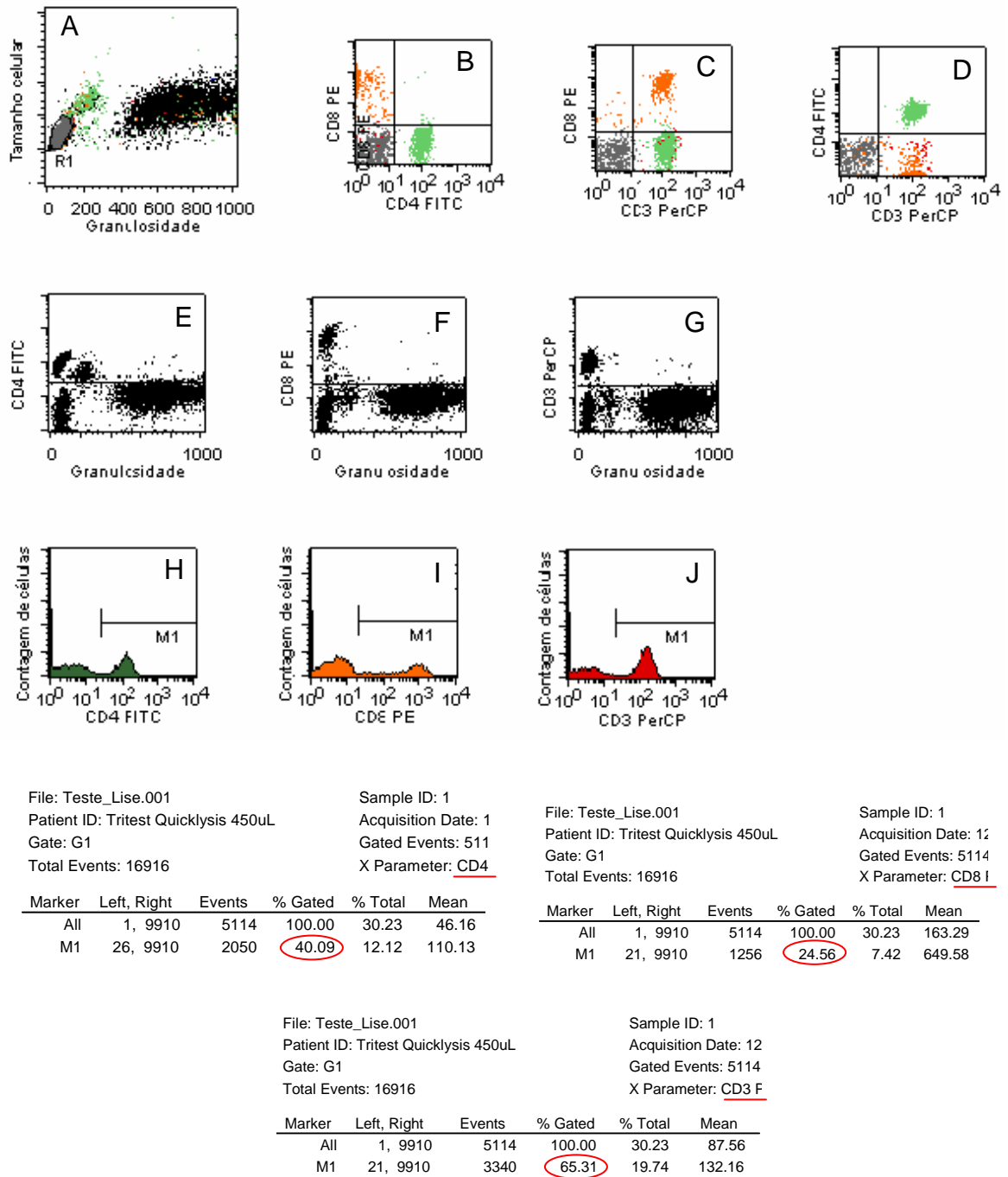


Figura 4.2: Representação das análises citofluorimétricas utilizando o anticorpo monoclonal do Tritest e o programa CellQuest. O gráfico A representa a dispersão celular, onde a população de linfócitos é observada em R1, monócitos em verde e granulócitos em preto. Os gráficos B, C e D são representações da dupla marcação do Tritest da BD. Os gráficos E, F e G referem-se ao parâmetro granulocidade que avalia a inespecificidade. Os gráficos H, I e J são histogramas feitos a partir da janela de linfócitos mostrando os resultados percentuais. Abaixo da figura foram apresentados os valores em porcentagem dos anticorpos monoclonais marcados.

4.3.2 – Análise dos conjugados Produzidos no LATED - Biomanguinhos

Definição dos Parâmetros (massa e concentração)

Os conjugados produzidos no LATED foram testados com diferentes massas, onde as massas foram representadas por diferentes volumes. Foram utilizados os volumes de 2,5, 5, 10 e 20 μL de todos os conjugados produzidos para as amostras de indivíduos normais. A Figura 4.3 exemplifica, a marcação do anti-CD8/Cy5, onde se observa que para a análise com o volume de 2,5 μL houve uma separação entre os picos de células positiva e negativa em relação aos demais volumes empregados. Observou-se também que os percentuais de linfócitos marcados também diminuíram com o aumento do volume. Estas constatações, isto é, a separação dos picos relativos às células marcadas (positivas) e células não marcadas (negativas) e o percentual de linfócitos dependem da massa de anticorpo monoclonal marcado, podendo assim, ter influência nos percentuais de linfócitos marcados. A melhor resolução entre os picos de células negativas e positivas também foi observada, com o volume de 2,5 μL , entre os demais conjugados testados anti-CD3/RPE, anti-CD3/Cy5, anti-CD4/FITC e anti-CD4/PECy7. Em todas as análises realizadas, as condições de voltagem para as fluorescências de cada canal (FL1, FL2, FL3 e/ou FL4) foram mantidas tanto para os conjugados produzidos em Biomanguinhos quanto para o Tritest da BD.

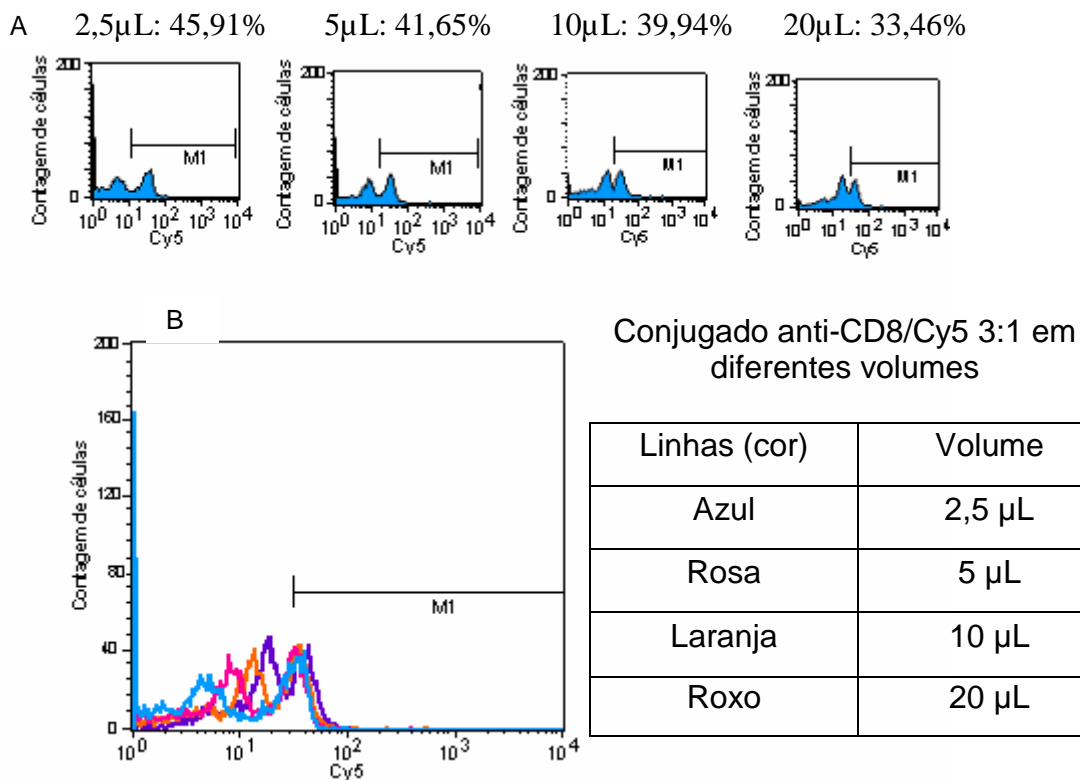


Figura 4.3: Citometria de fluxo proveniente das amostras de sangue indivíduos normais do conjugado anti-CD8/Cy5. Foram utilizadas diferentes massas, representadas pelos volumes de 2,5, 5, 10, 20 μ L do conjugado de Biomanguinhos, A. Histogramas de intensidade de fluorescência de Cy5 (eixo X) e número de células (eixo Y), sendo M1 o cursor de células positivas para o marcador (percentual de linfócitos positivos descritos acima). B. Gráficos de sobreposição dos histogramas de marcação.

Além do percentual e perfil das marcações na janela referente aos linfócitos, a presença ou ausência de marcação inespecífica fora da janela, ou seja, a marcação de monócitos e granulócitos foram analisadas. Os monócitos marcam com pouca intensidade para CD4, e são negativos para CD3 e CD8 enquanto os granulócitos são negativos para os três marcadores CD3, CD4 e CD8. Desta forma, qualquer marcação destas populações celulares para CD3 e CD8 e, no caso dos granulócitos, para CD4 são consideradas inespecíficas. Esta avaliação de inespecificidade foi levada em consideração na escolha dos volumes e das diluições, ou melhor, as massas e as concentrações dos conjugados a serem utilizados. A Figura 4.4 mostra que a partir do volume de 10 μ L, o conjugado anti-CD3/R-PE mostrou uma marcação inespecífica para monócitos e granulócitos. Esta marcação inespecífica está representada no gráfico de dispersão celular (cor laranja) e no gráfico de densidade ou *density plot* (setas). Como o histograma representa apenas a marcação dentro da janela dos linfócitos não foi possível avaliar inespecificidade neste gráfico.

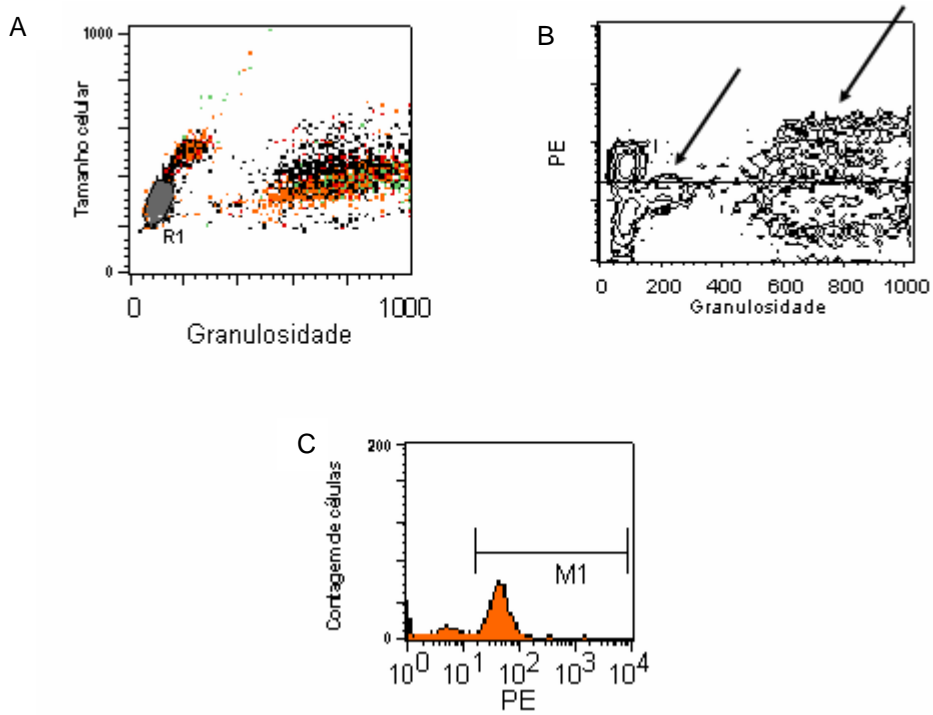


Figura 4.4: Citometria de fluxo, do conjugado anti-CD3/R-PE (10 μ L) de Biomanguinhos utilizando amostras de sangue indivíduos normais. A - *Dot plot* da dispersão celular granulosidade. B – Gráfico de densidade de fluorescência *versus* granulosidade, onde as setas representam a inespecificidade do conjugado. C -. Histograma da fluorescência emitida pela R-PE, onde o cursor M1 representa as células positivas dentro da janela de linfócitos.

Para os demais conjugados (anti-CD3/Cy5, anti-CD8/Cy5, anti-CD4/FITC e anti-CD4/PECy7) também foi observada inespecificidade em volumes superiores a 10 μ L (Figura 4.5)

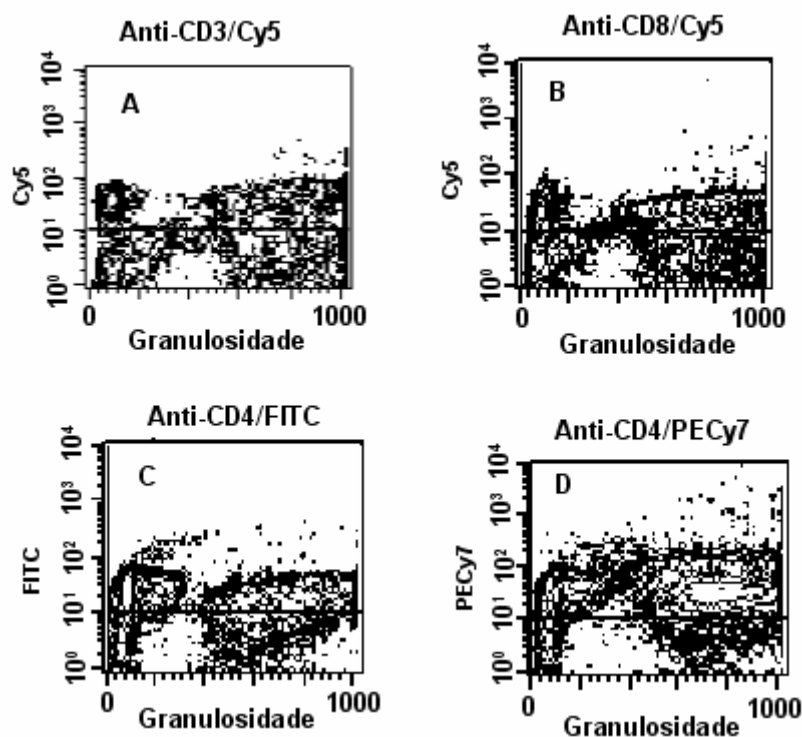


Figura 4.5: Gráfico de densidade de fluorescência *versus* granulosidade dos conjugados produzidos no LATED-Biomanguinhos, nos volumes de 10 μ L, onde em A - representa a inespecificidade do conjugado anti-CD3/Cy5, em B - representa a inespecificidade do conjugado anti-CD8/Cy5, C - inespecificidade do conjugado anti-CD4/FITC e em D - inespecificidade do conjugado anti-CD4/PECy7.

Constatou-se que com o volume de 2,5 μ L os conjugados produzidos em Biomanguinhos ainda não apresentavam perfis adequados, isto é, a resolução entre os picos referentes às células negativas e positivas, não era satisfatória. A análise seguinte dos anticorpos monoclonais marcados em Biomanguinhos foram testados em diferentes concentrações representadas por diferentes diluições. Portanto, os anticorpos monoclonais foram testados na concentração original, equivalente ao volume de 2,5 μ L e em diferentes diluições. As diluições analisadas foram: 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v.

A Figura 4.6 apresenta o resultado da análise por citometria de fluxo do conjugado anti-CD4/FITC não diluído e com diferentes diluições utilizando o volume de 2,5 μ L. O anticorpo monoclonal marcado na sua concentração original não apresentou uma resolução satisfatória entre os picos negativo e positivo. Já as diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v, usadas a partir da concentração original, apresentaram perfis parecidos. Todavia foi escolhida a diluição 1:10 v/v para os experimentos seguintes por ser esta a diluição que apresentou o melhor

deslocamento do pico negativo para a direita e por ter a melhor resolução entre os picos referentes as células negativas e positivas.

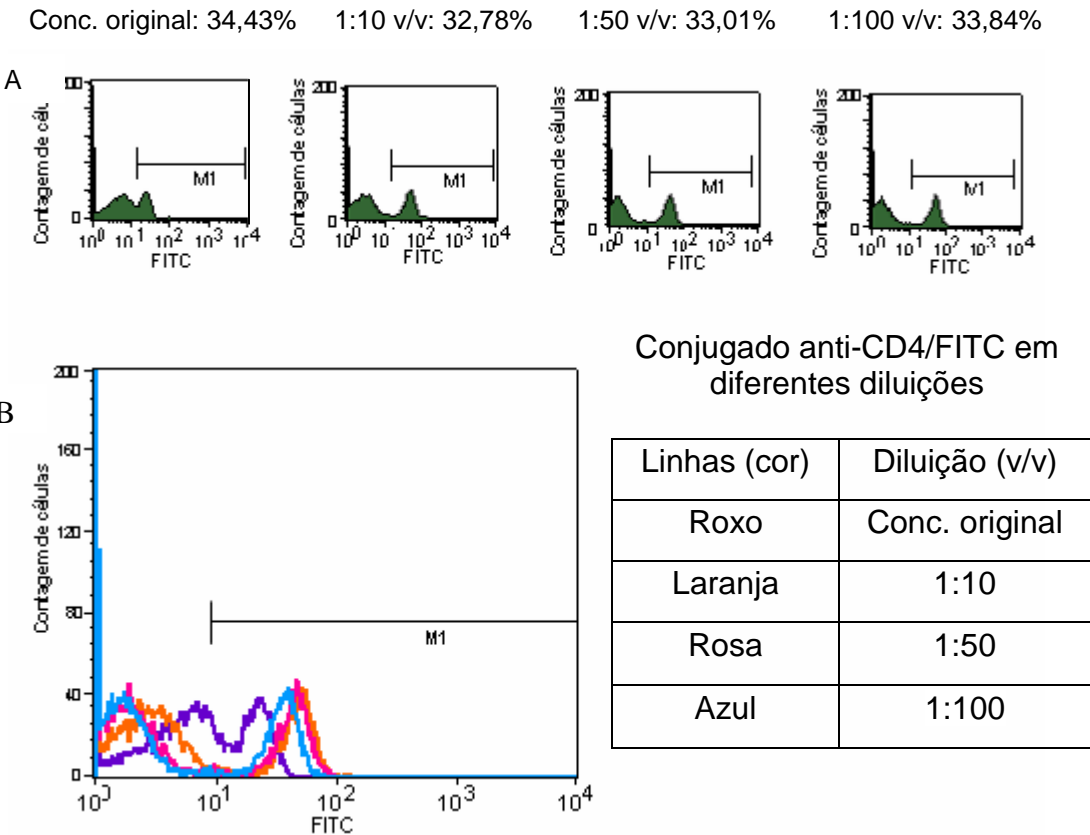


Figura 4.6: Citometria de fluxo referente a 2,5 μ L da concentração original do conjugado anti-CD4/FITC de Biomanguinhos. Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos normais, na concentração original e nas diluições de 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. A. Histogramas de intensidade de fluorescência emitida pelo FITC, onde o cursor M1 representa as células positivas dentro da janela dos linfócitos. B. Gráficos de sobreposição dos histogramas dos conjugados marcados em diferentes diluições.

Segundo Roederer (2004) e Deka et al (1996), a razão molar (anti-CD4 / FITC) maior que seis moléculas pode ocasionar uma diminuição da intensidade de fluorescência. Nas análises citofluorimétricas, a perda da intensidade de fluorescência é um problema para a análise quantitativa dos linfócitos T. Na análise feita com o conjugado anti-CD4/FITC em diferentes concentrações, não foi observada a perda de intensidade de fluorescência, mostrando ainda que a diluição 1:10 v/v apresenta a melhor separação entre as células negativas e positivas (Figura 4.6).

A Figura 4.7 mostra a análise por citometria de fluxo do conjugado anti-CD3/R-PE produzido em Biomanguinhos. Na diluição 1:10 v/v a partir da solução original correspondendo ao volume de 2,5 μ L do conjugado, foi observada a melhor resolução entre os picos referentes às células não marcadas (negativas) e marcadas

(positivas). Assim, a diluição 1:10 v/v foi escolhida para ser usada nos experimentos posteriores.

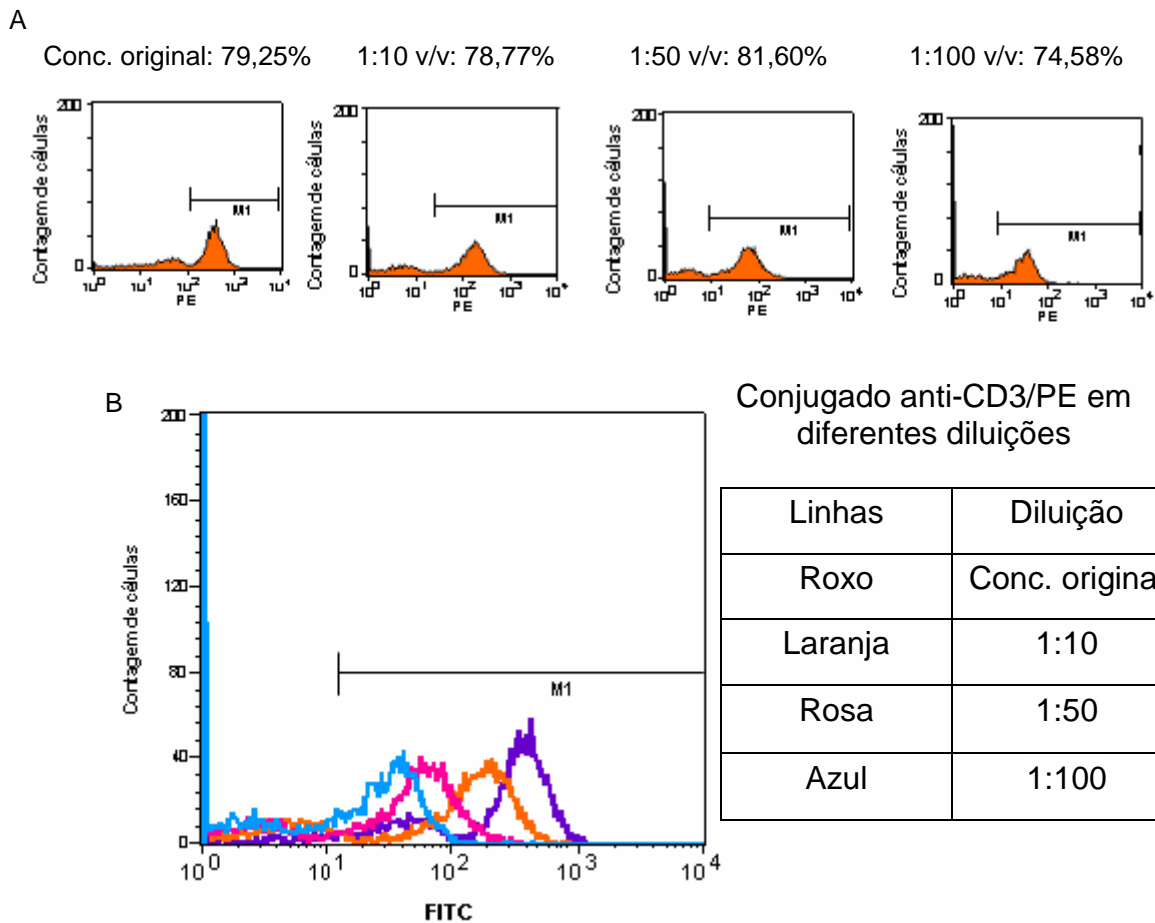


Figura 4.7: Citometria de fluxo referente a 2,5 μ L da concentração original do conjugado anti-CD3/R-PE de Biomanguinhos. Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos normais, na concentração original e nas diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. A. Histogramas de intensidade de fluorescência emitida pela R-PE, onde o cursor M1 representa as células positivas dentro da janela dos linfócitos. B. Gráficos de sobreposição dos histogramas dos conjugados marcados em diferentes diluições.

No processo de conjugação do anti-CD3 e anti-CD8 com o fluorocromo Cy5 foram analisadas as razões molares de 3:1, 5:1 e 7:1 entre os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD8 e o fluorocromo Cy5. As análises efetuadas por citometria de fluxo referentes aos conjugados e suas razões molares descritas acima, indicaram que a razão molar 3:1 apresentou o melhor perfil entre os picos negativo e positivo na janela dos linfócitos para ambos os conjugados.

A Figura 4.8 apresenta o resultado do teste do conjugado anti-CD3/Cy5 3:1 na concentração original correspondendo ao volume de 2,5 μ L e com diferentes diluições. No caso deste conjugado, a utilização do anticorpo monoclonal na concentração original apresentou um perfil de marcação adequado, mas o pico referente às células negativas mostrou-se com uma intensidade de fluorescência

maior do que as demais diluições. Já no pico negativo do conjugado anti-CD3/Cy5 3:1 na diluição 1:10 v/v não houve deslocamento, este permaneceu dentro da faixa de fluorescência de 10^1 , isto é, no local onde é estipulado que as células negativas devam se situar. As diluições 1:50 v/v e 1:100 v/v apresentaram um deslocamento maior dos picos positivos para esquerda, aproximando-se do pico das células negativas. Por estas razões, a diluição 1:10 v/v foi selecionada para os experimentos posteriores.

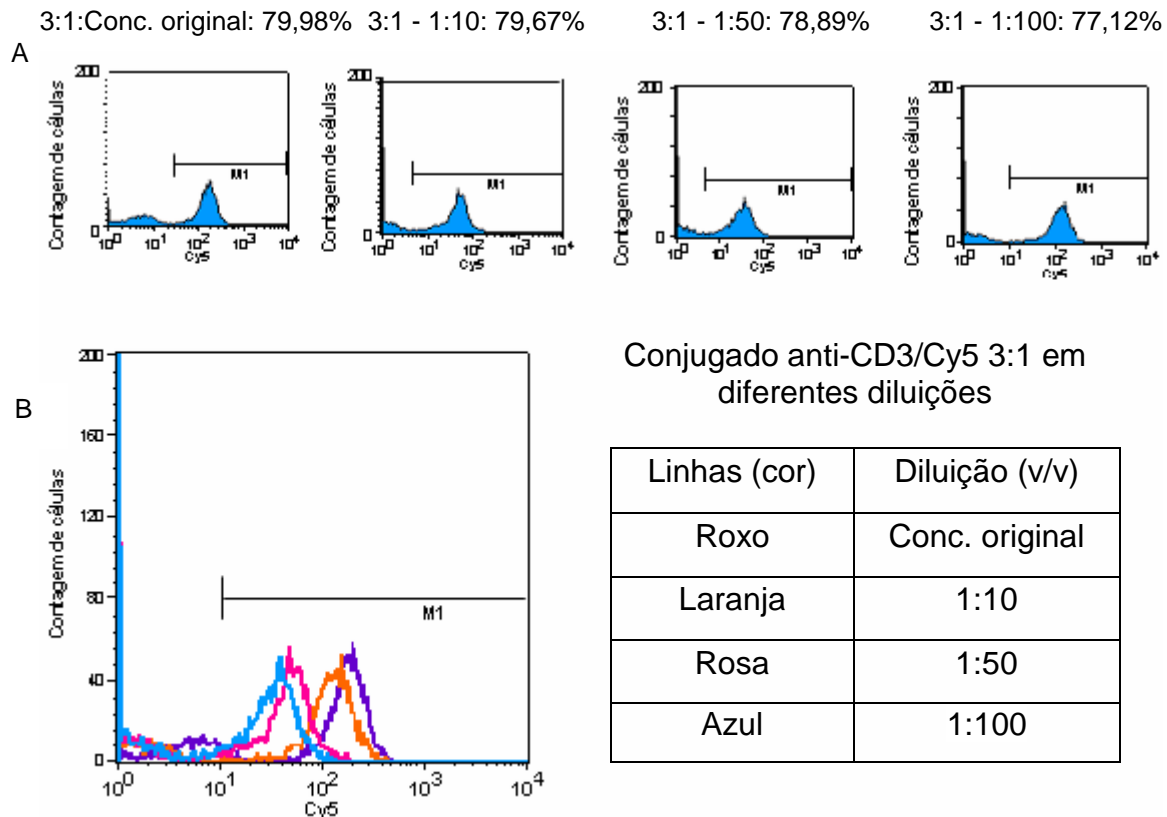


Figura 4.8: Citometria de fluxo referente a 2,5 μ L da concentração original do conjugado de Biomanguinhos anti-CD3/Cy5 na razão de 3:1. Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos normais na concentração original e nas diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. A. Histogramas de intensidade de fluorescência emitida pelo Cy5, onde o cursor M1 representa as células positivas dentro da janela dos linfócitos. B. Gráficos de sobreposição dos histogramas dos conjugados marcados em diferentes diluições.

A Figura 4.9 mostra o resultado do teste do conjugado anti-CD8/Cy5 na razão molar de 3:1, na concentração original e com diferentes diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. Observou-se que usando o anticorpo monoclonal marcado, na concentração original, não houve uma separação satisfatória entre os picos referentes às células negativas e positivas, tendência esta, revertida com o uso o anticorpo monoclonal marcado em diferentes diluições. No entanto, assim como no

anti-CD3/Cy5, foi selecionada a diluição 1:10 v/v por esta diluição apresentar uma resolução melhor entre os picos de células negativas e positivas.

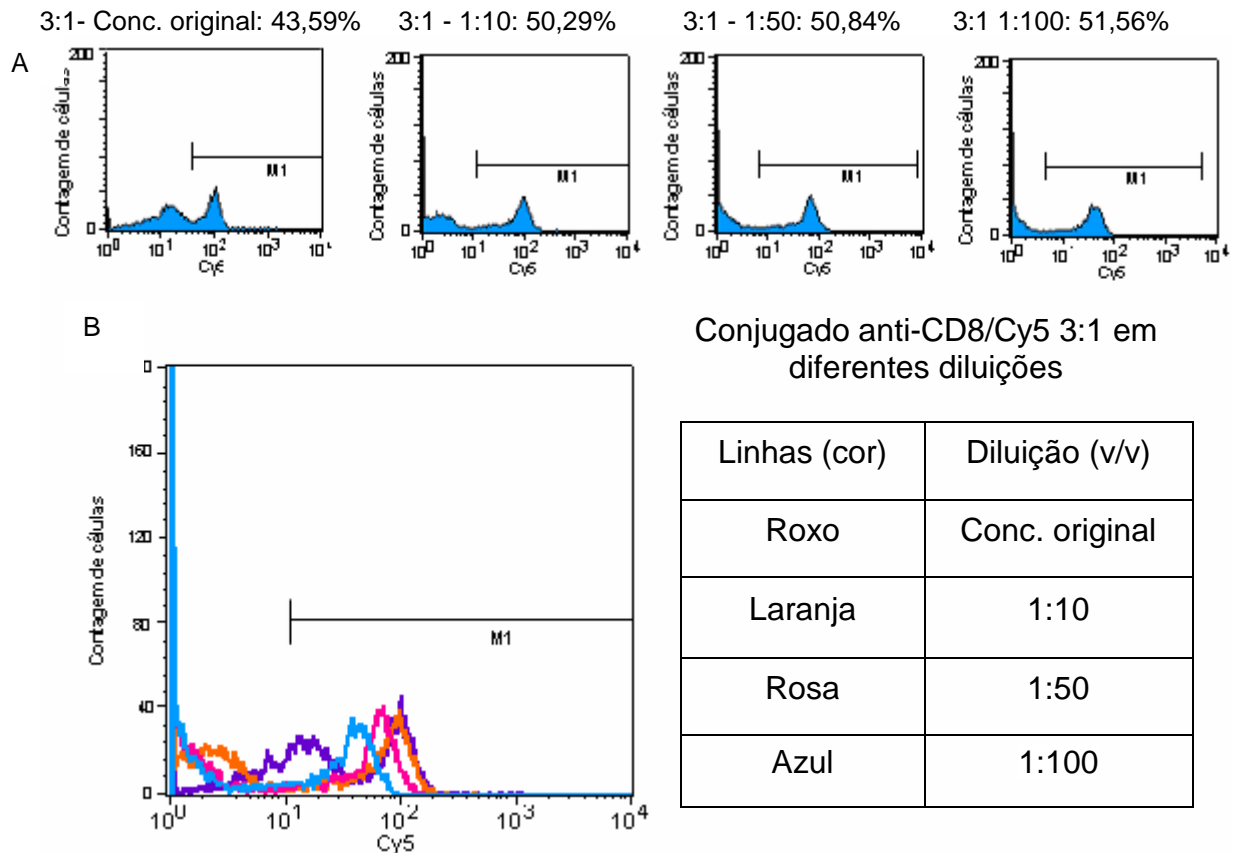


Figura 4.9: Citometria de fluxo referente a 2,5 μ L da concentração original do conjugado de Biomanguinhos anti-CD8/Cy5 na razão de 3:1. Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos normais na concentração original e nas diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. A. Histogramas de intensidade de fluorescência emitida pelo Cy5, onde o cursor M1 representa as células positivas dentro da janela dos linfócitos. B. Gráficos de sobreposição dos histogramas dos conjugados marcados em diferentes diluições.

Segundo Roederer et al (1996) e Baumgarth e Roederer (2000), o fluorocromo Cy5, ligado ou não, possui uma afinidade para um receptor presente nos monócitos, podendo levar a uma inespecificidade e um alto *background* nas marcações atribuídas a este fluorocromo. Entretanto, os conjugados testados com o fluorocromo Cy5, a saber, anti-CD3/Cy5 e anti-CD8/Cy5, não apresentaram marcação inespecífica nas populações dos monócitos (dados não apresentados). Vale ressaltar que a marcação específica da população de linfócitos T é muito importante, pois as células T CD4⁺ são monitoradas na supressão e na progressão da doença de pacientes infectados pelo HIV. A contagem absoluta das células T CD4⁺ é o parâmetro mais importante para a mudança do esquema terapêutico de antirretrovirais (Helbert e Breuer, 2000, Pattanapanyasat e Thakar, 2005).

O conjugado anti-CD4/R-PECy7 também foi analisado na concentração original e em diferentes diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. A Figura 4.10 mostra que o anticorpo monoclonal usado na concentração original novamente não mostrou uma boa separação entre as células marcadas (negativas e positivas). No entanto, diferente dos outros conjugados analisados, não houve nenhuma marcação nas células marcadas (positivas) referentes às diluições 1:50 v/v e 1:100 v/v. Por esta razão, mais uma vez, optou-se pela diluição de 1:10 v/v, observando-se que no caso atual as células linfocitárias marcadas (positivas), mostram uma separação adequada das células linfocitárias não marcadas (negativas) e ainda que a marcação foi específica para os linfócitos. O mesmo não foi verificado na concentração original, selecionando-se assim, a diluição de 1:10 v/v para as análises posteriores.

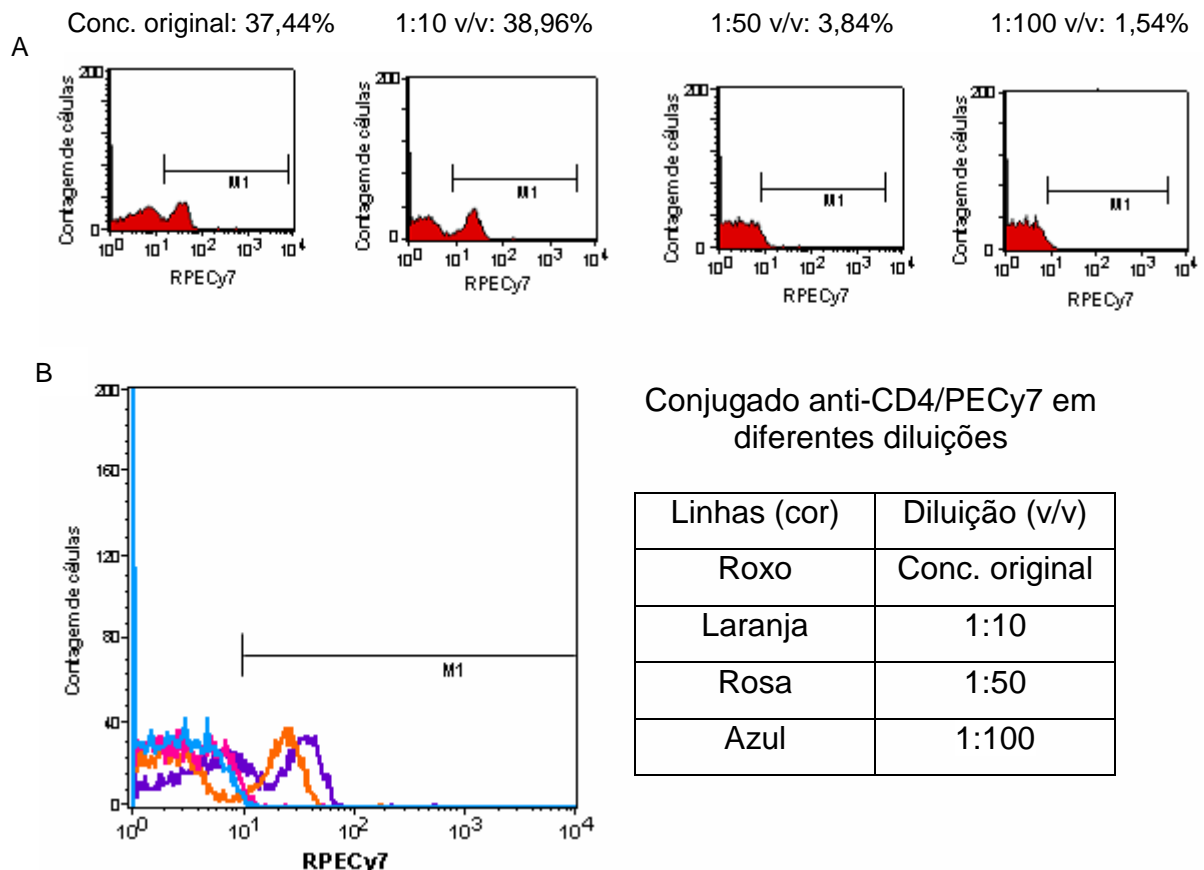


Figura 4.10: Citometria de fluxo referente a 2,5 μ L da concentração original do conjugado de Biomanguinhos anti-CD4/R-PECy7 na razão de 3:1. Foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos normais na concentração original e nas diluições 1:10 v/v, 1:50 v/v e 1:100 v/v. A. Histogramas de intensidade de fluorescência emitida pelo RPE-Cy7, onde o cursor M1 representa as células positivas dentro da janela dos linfócitos. B. Gráficos de sobreposição dos histogramas dos conjugados marcados em diferentes diluições.

Segundo Forman e Gupta (2007) a qualidade dos conjugados formados para os diferentes fluorocromos (fluorocromo *tandem*) pode ser questionada em relação

ao desempenho e a consistência do reagente. Os fluorocromos *tandem* podem apresentar problemas durante o processo de ligação, citando entre eles: (1) inadequação na transferência de energia do doador R-PE para o acceptor Cy7, resultando na necessidade de ajustes na compensação, baixa intensidade de fluorescência devido à variação lote a lote; (2) por uma razão decorrente do resultado de diferentes razões molares, presença de ligações inespecíficas e (3) uma maior degradação do conjugado ao longo do tempo, em relação aos fluorocromos *não-tandem*.

As análises usando o fluorocromo *tandem* conjugado ao anticorpo monoclonal anti-CD4, mostraram valores percentuais muito parecidos aqueles resultante das análises com o padrão Tritest da BD, sem a necessidade de ajuste de compensação padronizada durante a análise do padrão comercial (Baumgarth e Roederer 2000). Também não foram observadas ligações inespecíficas do referido conjugado de Biomanguinhos. Em relação ao perfil citofluorimétrico, o resultado mostrou que a resolução entre o pico referente às células negativas e positivas não foi tão expressiva (Figura 4.10). A justificativa para a baixa intensidade de fluorescência observada na figura 4.10 (eixo das abscissas) pode ser decorrente ao processo de transferência de energia entre os fluorocromos conjugados (R-PE e o Cy7).

As análises acima mostraram que diferentes fluorocromos marcados com o mesmo anticorpo monoclonal pode resultar em resoluções diferentes entre os picos de células negativas e positivas. Assim, ficou evidenciada a necessidade de se avaliar outras marcações dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 com diferentes fluorocromos. A escolha do fluorocromo a ser usado vai depender do nível de expressão e do tipo celular que será expresso (Baumgarth e Roederer 2000).

4.3.3 – Análise comparativa entre o Tritest da BD e os conjugados produzidos em Biomanguinhos

- Análise de amostras de pacientes HIV+

Os conjugados com tripla marcação (anti-CD3/R-PE, anti-CD4/FITC e anti-CD8/Cy5) e a dupla marcação (anti-CD3/Cy5 e anti-CD4/R-PECy7) produzidos no LATED – Biomanguinhos, após ajuste das quantidades de massa e concentração, foram confrontados com o Tritest da BD, através da análise citofluorimétrica. Neste

contexto, foram analisadas 62 amostras de pacientes HIV+ com a tripla marcação, sendo 15 deste total analisado com a dupla marcação.

A Figura 4.11 mostra a análise citofluorimétrica, que representa uma das diversas análises de igual comportamento, da marcação utilizando o padrão Tritest da BD frente às marcações dupla e tripla de Biomanguinhos. A análise do confronto entre os diferentes conjugados (anti-CD3/RPE, anti-CD3/Cy5, anti-CD4/FITC, anti-CD4/PECy7 e anti-CD8/Cy5) de Biomanguinhos e do Tritest da BD, mostrou, em valores percentuais de marcação dos linfócitos CD3, CD4 e CD8, muito próximos ao padrão Tritest. Na figura 4.11 também pode ser observado um valor percentual de marcação de células positivas para CD4 muito baixo no Tritest da BD (anti-CD4/FITC), sendo este valor também observado nos conjugados anti-CD4/FITC e anti-CD4/PECy7 de Biomanguinhos, indicando assim, que os conjugados produzidos em Biomanguinhos acompanham, em valor percentual, as variações de marcação dos linfócitos apresentadas no conjugado Tritest da BD.

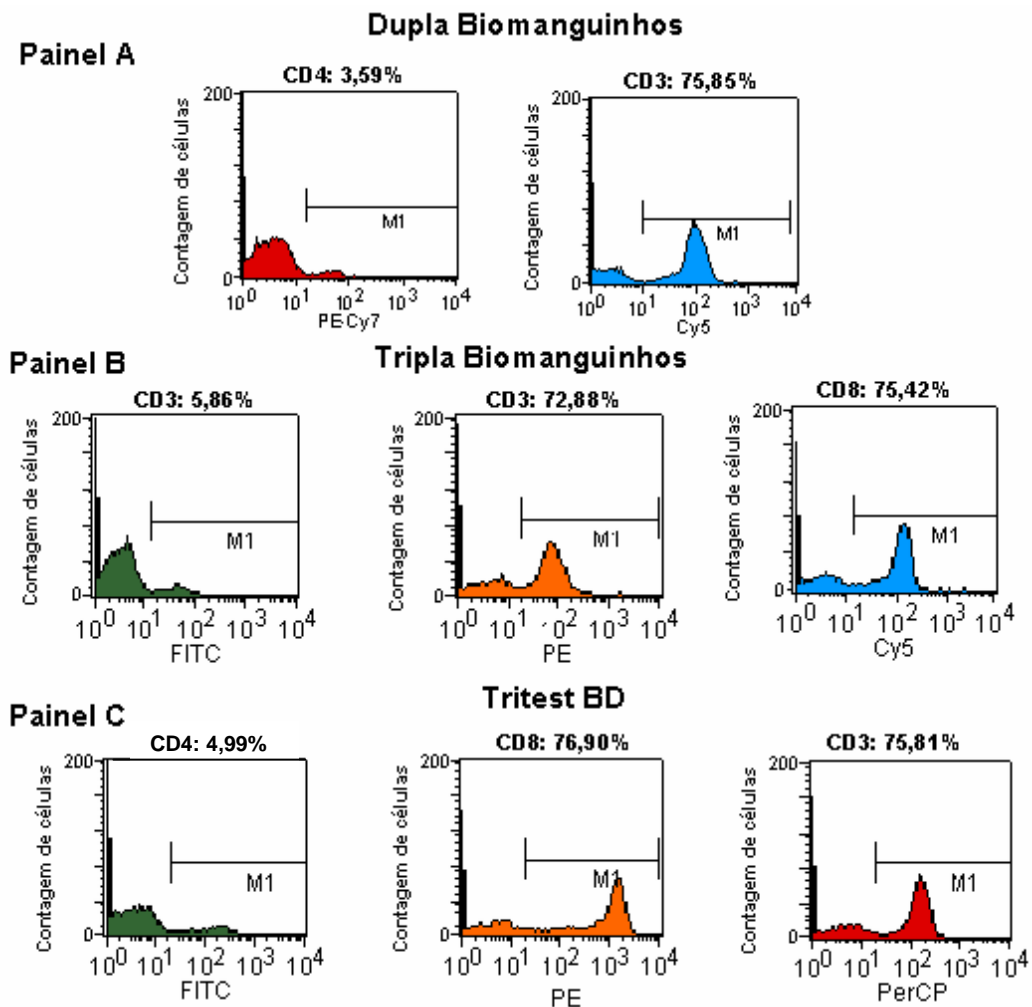


Figura 4.11: Análise dos conjugados de Biomanguinhos comparados ao Tritest da BD de um paciente HIV+. Painel A: dupla marcação de Biomanguinhos, Painel B: Tripla marcação de Biomanguinhos e Painel C: Tritest da BD.

Na figura 4.11 observa-se o perfil de marcação do conjugado anti-CD8/Cy5 em relação ao anti-CD8/PE do Tritest da BD. Esta figura mostra a existência de uma grande diferença na resolução entre pico de células negativas e positivas. A possível explicação para essa diferença de perfil de expressão pode estar no uso de diferentes fluorocromos nos conjugados de Biomanguinhos quanto no Tritest da BD. O fluorocromo PE possui uma autofluorescência em relação ao fluorocromo Cy5, mas seus valores percentuais de marcação permanecem bem próximos, alterando somente a resolução referente ao pico de células negativas e positivas na janela dos linfócitos (Lansdorp et al., 1991, Baumgarth e Roederer 2000).

Na figura 4.11 é mostrada a análise citofluorimétrica dos linfócitos (CD3, CD4 e CD8) marcados, onde nos painéis A e B faz-se referência aos conjugados produzidos no LATED - Biomanguinhos (dupla e tripla marcação) e no painel C diz respeito ao conjugado Tritest da BD. Foi observado para todos os receptores celulares marcados que houve um percentual de marcação linfocitária equivalente para todos os insumos testados.

A Figura 4.12 mostra na forma de um histograma as médias aritméticas dos valores percentuais obtidos através da análise de 62 amostras de sangue de pacientes HIV+ na marcação tripla de Biomanguinhos (anti-CD3/R-PE, anti-CD4/FITC e anti-CD8/Cy5), comparadas a marcação do Tritest da BD, não havendo diferença significativa, entre os percentuais de marcação da BD e os conjugados de Biomanguinhos.

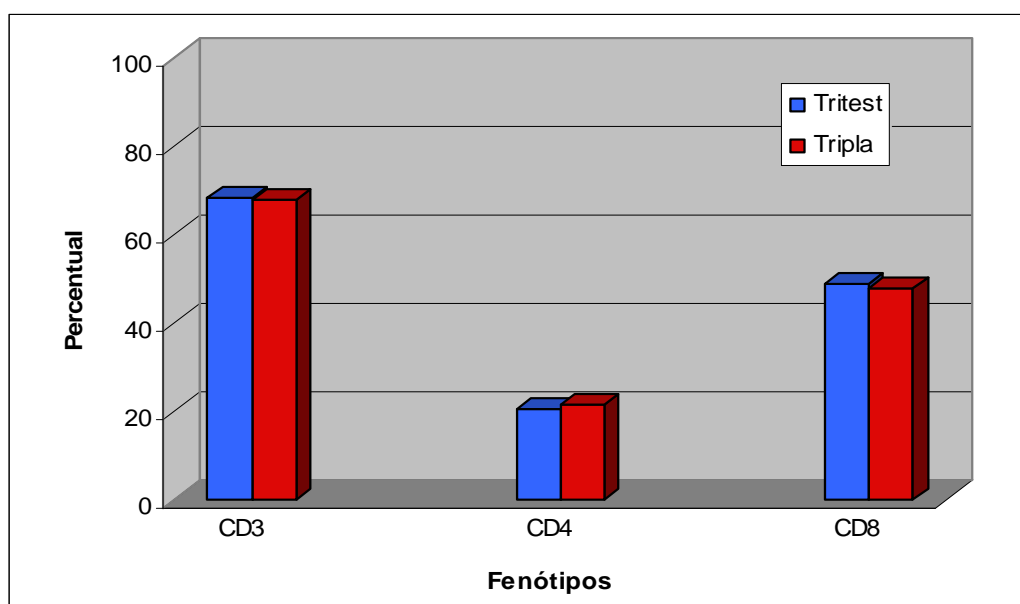


Figura 4.12: Histograma da marcação tripla dos conjugados de Biomanguinhos comparados ao Tritest da BD, para amostras de pacientes HIV+.

A Figura 4.13 mostra os dados obtidos das análises de 62 pacientes HIV+ usando os conjugados com marcação dupla (anti-CD4/R-PECy7 e anti-CD3/Cy5) do LATED - Biomanguinhos, comparado com o Tritest da BD. Os valores percentuais de marcação linfocitária (CD3 e CD4) foram muito próximos do padrão comercial da BD.

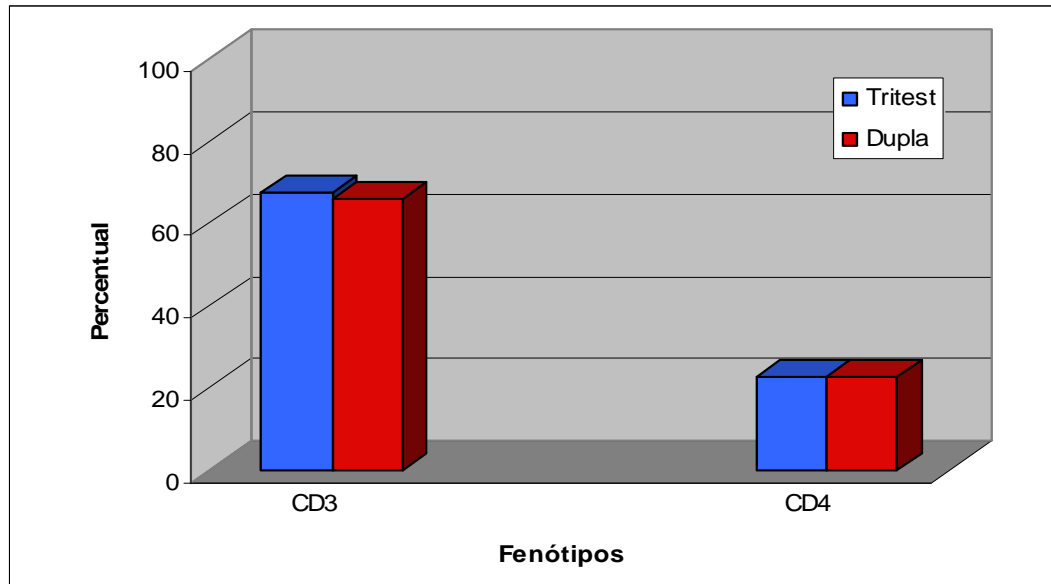


Figura 4.13: Histograma da marcação dupla dos conjugados de Biomanguinhos comparados ao Tritest da BD, para amostras de pacientes HIV+.

Em suma, o resultado das análises das amostras dos pacientes HIV+, levando-se em conta a tripla e na dupla marcação dos anticorpos monoclonais marcados, isto é, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 efetuados no LATED - Biomanguinhos, comparadas ao Tritest da BD, indicaram que as médias aritméticas dos valores percentuais das marcações foram similares ao padrão comercial. Tal resultado foi confirmado através da correlação linear de Pearson (Tabela 4.5). Esta correlação foi próxima de 1 para todos os conjugados analisados no LATED - Biomanguinhos, mostrando desta forma uma alta correlação com o conjugado Tritest da BD. Segundo Pestana e Gageiro (2005), valores da correlação de Pearson entre 0,9 e 1 são resultados considerados satisfatórios, devido a uma associação muito alta.

Tabela 4.5: Dados obtidos através da correlação linear de Pearson, referente às avaliações dos conjugados no LATED - Biomanguinhos das amostras de pacientes HIV+ comparado ao Tritest da BD.

		Conjugados Biomanguinhos				
		CD3-PE	CD3-Cy5	CD4-FITC	CD4-PECy7	CD8-Cy5
		Tripla	Dupla	Tripla	Dupla	Tripla
Tritest BD	CD3	0,928	0,983	-	-	-
	CD4	-	-	0,992	0,995	-
	CD8	-	-	-	-	0,979

- Análise de amostras de indivíduos normais

As figuras 4.14 (painéis A, B e C) mostraram os resultados das análises dos conjugados, utilizando amostras de sangue indivíduos normais para cada anticorpo monoclonal marcado (anti-CD3/R-PE, anti-CD3/Cy5, anti-CD4/FITC, anti-CD4/R-PECy7 e anti-CD8/Cy5) comparado ao Tritest BD. O painel A apresenta as marcações do anti-CD3/R-PE e anti-CD3/Cy5 do período de 329 dias após a primeira avaliação, o painel B mostra a as avaliações do anti-CD4/FITC do período de 301 dias e de 259 dias do anti-CD4/R-PECy7, enquanto o painel C apresenta a marcação de anti-CD8/Cy5 do período de 329 dias. Em todos os painéis podemos observar que os conjugados produzidos no LATED - Biomanguinhos acompanham, em valores percentuais, o padrão comercial Tritest da BD.

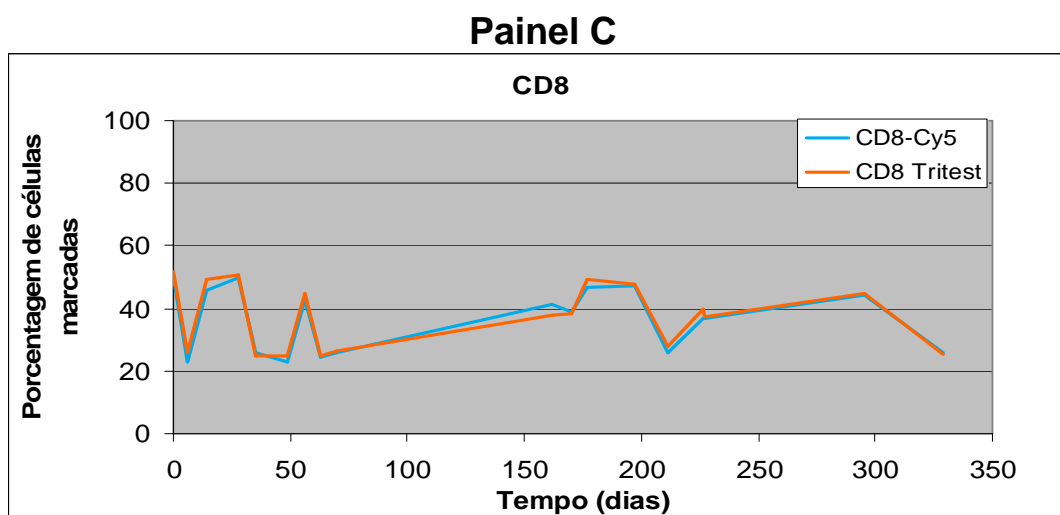
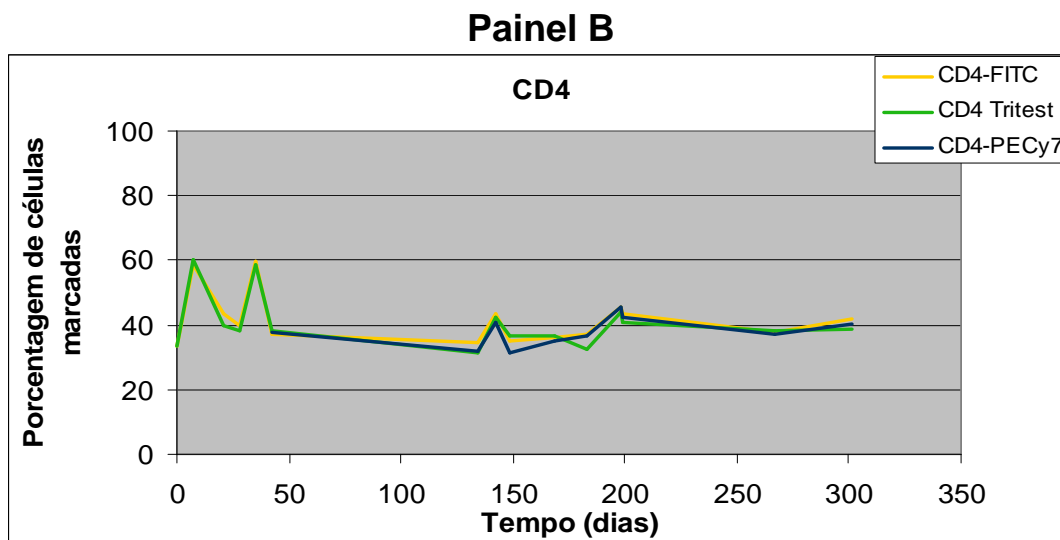
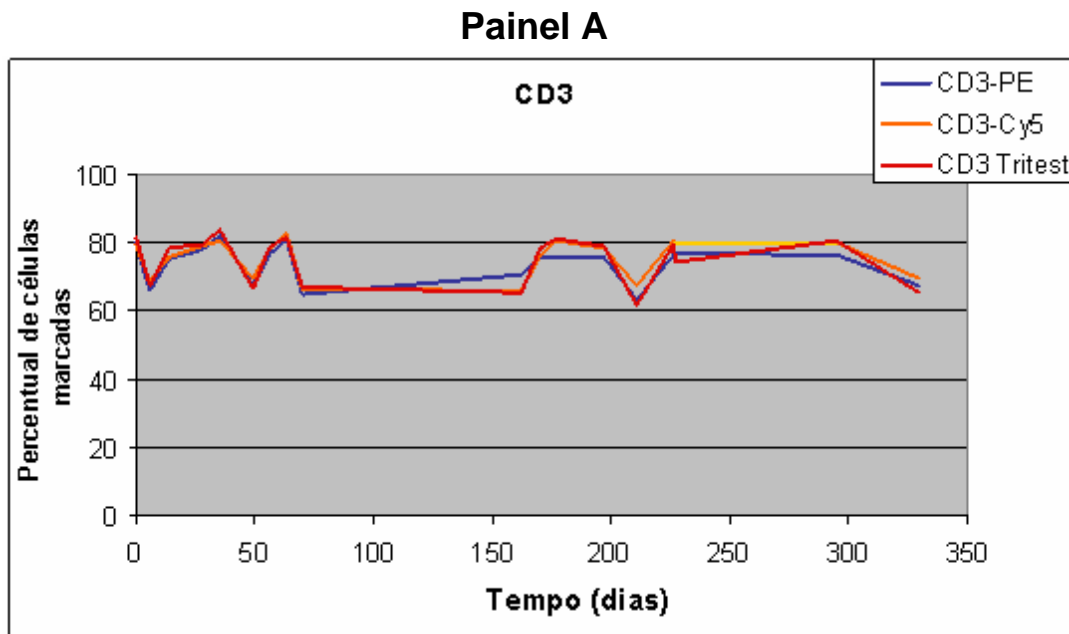


Figura 4.14: Análise comparativa entre os conjugados em Biomanguinhos e oTritest da BD, utilizando amostras de indivíduos normais. Painel A apresenta as marcações do anti-CD3 no período de 329 dias, enquanto no painel B mostra os resultados do anti-CD4/FITC no período de 301 e de 259 dias para o anti-CD4/R-PECy7. O painel C apresenta o resultado do anti-CD8 no período de 329 dias.

A tabela 4.6 é referente à análise estatística das amostras de indivíduos normais dos conjugados no LATED - Biomanguinhos comparados ao padrão BD. Os resultados das análises da correlação linear de Pearson, mostram valores muito próximos de 1, mostrando que os conjugados do LATED - Biomanguinhos possuem uma alta correlação com o conjugado Tritest da BD.

Tabela 4.6: Dados obtidos através da correlação linear de Pearson, referente às avaliações dos conjugados de Biomanguinhos de 62 amostras de indivíduos normais comparados ao Tritest da BD.

		Conjugados Biomanguinhos				
		CD3-PE Tripla	CD3-Cy5 Dupla	CD4-FITC Tripla	CD4-PECy7 Dupla	CD8-Cy5 Tripla
Tritest BD	CD3	0,923	0,941	-	-	-
	CD4	-	-	0,971	0,822	-
	CD8	-	-	-	-	0,987

Ao longo de aproximadamente onze meses os conjugados produzidos no LATED - Biomanguinhos, tomando como referência o conjugado Tritest da BD, foram analisados levando-se em conta o percentual de marcação das células linfocitárias, tanto em indivíduos normais como em pacientes HIV+. Através das diversas análises efetuadas, não foi constatada nenhuma alteração significativa no valor percentual de marcação celular dos conjugados para os indivíduos normais e para os pacientes HIV+. Embora tenham sido usadas amostras de diferentes pacientes (HIV+ e indivíduos normais), nas duas análises o comportamento dos conjugados do LATED - Biomanguinhos (dupla e tripla marcação) em relação aos linfócitos CD3, CD4 e CD8 foram os mesmos frente ao Tritest da BD, onde os valores percentuais se mostraram sempre similares. O conjunto de dados obtidos através das análises citofluorimétricas indicou a existência de uma correlação entre os conjugados de Biomanguinhos e o Tritest da BD. Tal constatação é relevante, pois dá consistência a avaliações de indivíduos HIV+.

Em suma, todos os conjugados (anti-CD3/RPE, anti-CD3/Cy5, anti-CD4/FITC, anti-CD4/PECy7 e anti-CD8/Cy5) produzidos no LATED - Biomanguinhos, analisados por citometria de fluxo, em diferentes marcações, simples, dupla e tripla, apresentaram-se similares ao conjugado Tritest da BD.

5- CONCLUSÃO

Em decorrência dos resultados obtidos nos processos de conjugação dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 com os fluorocromos PE, FITC, Cy5 e PECy7, levando-se em conta os valores das razões molares descritas na literatura, podemos concluir que os insumos conjugados no LATED - Biomanguinhos foram produzidos adequadamente, permitindo assim que estes fossem avaliados comparativamente ao conjugado Tritest da BD.

Com os dados obtidos nas análises citofluorimétricas comparados entre os insumos produzidos no LATED - Biomanguinhos e os insumos inerentes ao Tritest da BD, usando-se amostras de indivíduos normais e pacientes HIV+, tanto nas marcações simples como nas marcações dupla e tripla, concluímos que os conjugados produzidos em Biomanguinhos podem ser uma alternativa para um teste de imunofenotipagem para a quantificação de linfócitos T CD4⁺. Tal afirmativa é fundamentada nos resultados decorrentes da grande linearidade observada através da correlação de Pearson e dos valores percentuais de marcação muito próximas entre ambos os insumos analisados.

O teste de estabilidade dos anticorpos monoclonais (anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8) marcados com fluorocromos foram analisados durante um período de onze meses, sempre empregando o Tritest da BD como referência para as análises comparativas. Usando-se neste período amostras diferentes de indivíduos normais, os conjugados de Biomanguinhos mostraram valores percentuais similares ao do padrão comercial, concluindo-se assim, que tal insumo produzido em Biomanguinhos apresenta também qualidade compatível ao conjugado Tritest da BD em termos de estabilidade.

6- PERSPECTIVAS

» Com o objetivo de aumentar a recuperação protéica, o processo de ultrafiltração pelo sistema Amicon deverá ser novamente testado, procurando-se melhorar a forma de recuperação da proteína aderida a membrana, através do aumento do número de lavagens do recipiente e da membrana usada no processo. Um outro processo de concentração protéica, como a liofilização parcial, poderá ser usada com o objetivo de melhorar o processo de concentração dos anticorpos monoclonais.

» Para a seleção do melhor fluorocromo para cada anticorpo monoclonal cedido por Cuba, serão necessários outros processos de conjugação onde cada anticorpo monoclonal (anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8) será conjugado com diferentes fluorocromos (FITC, R-PE, Cy5 e R-PECy7).

» Uma melhor avaliação da estabilidade dos conjugados será feita usando um reagente comercial que possui valores para anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 pré-determinados, evitando assim a análise de diferentes indivíduos normais, com valores de linfócitos bem diferentes.

» Após o recebimento do anticorpo monoclonal, anti-CD45 a ser enviado por Cuba, será determinada a concentração, verificação da homogeneidade e conjugação a diferentes fluorocromos. O anti-CD45 é um marcador presente nos leucócitos e tem como objetivo melhorar a discriminação entre a população celular dos linfócitos em relação aos monócitos e granulócitos.

» Propor um *kit* alternativo com quatro marcações celulares (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD45) conjugados com a diferentes fluorocromos, para um teste de imunofenotipagem para a quantificação de linfócitos T CD4⁺, com o objetivo de substituir o padrão comercial Tritest da BD.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Cellular and Molecular Immunology**. In:Saunders Elsevier. 6ª ed., Chap. 3. p. 47-71; 2007.

Alcamí J. **Advances in the immunopathogenesis of HIV infection**. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. V 22(8): p. 486-496; 2004.

Alkan SS. **Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine**. *Perspective - Nature Reviews Immunology*. v.4, p. 153-156; 2004.

Balakrishnan P, Solono S, Kumarasamy N, Mayer KH. **Low cost monitoring of HIV infected individuals on highly active antiretroviral therapy (HAART) in developing countries**. *Indian J. Med.Res.* v. 121(4), p. 345-355; 2005.

Barnett D, Walker B, Landay A, Denny T N. **CD4 immunophenotyping in HIV infection**. *Nature Reviews / microbiology* v (11), p. S7-S15; 2008.

Bastos FI, Telles PR, Castilho EA, Barcellos C. **A epidemia de AIDS no Brasil**. In: *Os Muitos Brasis: Saúde e População na Década de 80* (M. C. S. Minayo, org.), São Paulo: Editora Hucitec/Rio de Janeiro: ABRASCO; 1995.

Baumgarth N, Roederer M, A **practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping**. *Journal of Immunological Methods*. 243, p. 77-97; 2000.

Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, et al. **Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions**. *Journal Clinical Investigation*. 115 (11): p. 3265-3275; 2005.

Bikoue A, Janossy G, Barnett D. **Stabilised cellular immuno-fluorescence assay: CD45 expression as a calibration standard for human leukocytes**. *Journal of Immunological Methods*. 266: p. 19-32; 2002.

Brinkley M. **A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents**. *Bioconjugate. Chem.* v 3(1): p. 2-13; 1992.

Carding SR, Egan PJ. **Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity**. Nature Reviews Immunology. v. 2: p.336-345; 2002.

Castilho EA, Bastos FI, Scwarcwald CL, Fonseca MG. **A AIDS no Brasil: uma epidemia em mutação**. Caderno de Saúde Pública. v. 16 (sup.1) p. 4-5; 2000.

Center for Disease Control and Prevention: **Basic Informations HIV**. [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 12 Outubro 2007] Disponível em:<http://www.cdc.gov/hiv/topics/basic/index.htm>.

Center for Disease Control and Prevention. **The Global HIV/AIDS Pandemic, 2006** MMWR – Morbidity and mortality Weekly Report. 55 (31); 841-844 August 11, 2006 [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 10 Julho 2007] Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml>.

Davis SJ, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker T R, Merwe P. A van der. **The nature of molecular recognition by T cells**. Nature Immunology. v. 4, p. 217-224; 2003.

Deka C, Lehnert BE, Lehnert NM, Jones GM, Sklar LA, Steinkamp JA. **Analysis of Fluorescence Lifetime and Quenching of FITC-Conjugated Antibodies on Cells by Phase - Sensitive Flow Cytometry**. Cytometry. v. 25: p.271-279; 1996.

Erman B, Feigenbaum L, Coligan JE, Singer A. **Early TCR α expression generates TCR $\alpha\gamma$ complexes that signal the DN-to-DP transition and impair development**. Nature Immunology. v.3 (6), p.564-569; 2002.

Forman MA, Gupta R. **Tandem dyes for flow cytometry: can we overcome quality concerns?** Clinical Issues. Beckman Coulter. P. 1-2; 2007.

Ghosh R, Cui Z F. **Purification of Lysozyme Using Ultrafiltration**. Biotechnology And Bioengineering, v. 68 (4) p. 192-203; 2000.

Ghosh R, Wan Y, Cui Z F, Hale G. **Parameter Scanning Ultrafiltration Rapid Optimisation of Protein Separation**. Biotechnology And Bioengineering, v. 81 (3), p. 673-682; 2003.

Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. **The fluorescent toolbox for assessing protein location and function**. Science. v. 312, p. 217-224; 2006.

Gil ES, Kubota LT. **Alguns aspectos de imunoensaios a aplicados à química analítica**. Química Nova. 22(6); p. 874-881; 1999.

Glazer AN, Stryer L. **Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. Emission Wavelength shifting by energy transfer**. Biophys J. v. 43(9): p. 383-386; 1983.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. **Overview of the immune system**. In: Kuby Immunology. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company. chap. 1, p. 3-26; 2000.

Golim MA, Deffune E, Rossi-Ferreira R, Oliveira AP, Padovani CR, Machado PE. **Conjugação e validação de controle isotópico IgG₁-FITC para uso em citometria de fluxo.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 29 (4), p. 361-368; 2007.

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Fan PT, Saxon A, Weisman DO. **Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men.** N Engl J Med. 305: p.1425-1431; 1981.

Greene W C. **A history of AIDS: Looking back to see ahead.** Eur. J. Immunology. 37: p. S94-102; 2007.

Guardian Unlimited. **Archive: Cesar Milstein.** Wednesday, March 27, 2002. [Capturado 13 de novembro 2007] Disponível em: <http://www.guardian.co.uk>

Gürtler L. **Difficulties and strategies of HIV diagnosis.** The Lancet. v. 348 (9021), p. 176-179; 1996.

Hahn CD, Riener C K, Gruber H J. **Labeling of Antibodies with Cy3-, Cy3.5-, Cy5-, and Cy5.5-monofunctional Dyes at Defined Dye/Protein Ratios.** Single Molecules. v 2:(2), p. 1-5; 2001.

Helbert M e Breuer J, **Monitoring patients with HIV disease.** J. Clin. Pathol; v. 53; p. 266-272; 2000.

Helbert M. **T cell receptor variable gene products and early HIV-1 infection.** The Lancet. v.23: 339 (8804):1299-1300; 1992.

Hermanson GT. **Bioconjugate techniques.** In: Academia Press. 1^a ed.; Chap. 8. p.297-364; 1996.

Herzenberg LA, De Rosa SC, Herzenberg LA. **Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunology and medicine.** Review Immunology Today. v.21 (8), p. 383-390; 2000.

Iweala OI. **HIV diagnostic tests: An overview.** Contraception. 70, p. 141-147; 2004.

Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. **Acquired Immune Deficiency Syndrome in the United States. The first 1000 cases.** J Infection Diseases. 148(2): p. 339-345; 1983.

Jensen PE. **Recent advances in antigen processing and presentation.** Nature immunology. v.8 (10), p.1041-1048; 2007.

Katzeinstein TL. **Molecular Biological Assessment Methods and Understanding the Course of the HIV Infection.** APMIS Suppl. (114): 1-37; 2003.

Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. **Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex**. *Immunity*. v. 24(2): p. 133-139; 2006.

Lansdorp PM, Smith C, Safford M, Terstappen LWMM, Thomas TE. **Single laser three color immunofluorescence staining procedures base don energy transfer between phycoerythrin and cyanine 5**. *Cytometry*. v. 12: p. 723-730; 1991.

Liu LN, Chen XL, Zhang XY, Zhang YZ, Zhou BC. **One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata***. *Journal of Biotechnology*.116: p. 91-100; 2005.

Luft S, Seme K, Poljak M. **Laboratory diagnosis of human immunodeficiency virus infection**. *Acta Dermatoven APA*. v. 13 (2), p. 43-49; 2004.

Marmor M, Friedman-Kien AE, Laubenstein L, Byrun RD, William DC, D' onofrio S, Dubin N. **Risk Factors for Kaposi's sarcoma in Homosexual Men**. *Lancet*.v.1 (8281):1083-1087; 1982.

Marsac NT. **Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations**. *Photosynth. Res*. 76, p. 197-205; 2003.

Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico – AIDS**, XII, Semana Epidemiológica 09 a 21, março/maio; 1999.

Ministério da Saúde – **Boletim Epidemiológico, 2007**. [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 26 de Novembro 2007] Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages>.

Ministério da Saúde - **AIDS vinte anos - Esboço histórico para entender o Programa Brasileiro, 2005**. [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2005 [Capturado 16 de Fevereiro 2009] Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/>

Ministério da Saúde. **DST-AIDS / Diagnóstico** - [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 13 de outubro 2007] Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS873A3DC1PTBRIE.htm>

Ministério da Saúde – **Recomendações para a terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**. Documento preliminar. 7ª Ed. P. 5-72; 2007

Ministério da Saúde – **Diagnóstico e acompanhamento** - [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 25 de fevereiro 2009] Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISA5935B3CPTBRIE.htm>

Ministério da Saúde. **DST-AIDS / Evolução clínica do HIV** - [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 13 de outubro 2007] Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD94061BAPTBRIE.htm>.

Ministério da Saúde. Secretaria Executiva/MS – **Subsecretaria de Assuntos Administrativos** – Ata de Realização do Pregão Presencial-SRP Nº 98/2006 Publicado no Diário Oficial de 01/09/2006.

Molecular Probes – Invitrogen, Product information. **Amine-Reactive Probes**. Revised december, 2003.

Nelson PN, Reynolds GM, Waldron E E, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. **Demystified... Monoclonal antibodies**. J. Clin Pathol: Mol Pathol. v. 53, p.111-117; 2000.

Neves Jr I, Morgado MG. **Immunological evaluation of human immunodeficiency vírus infected individuals by cytometry**. Mem. Inst Oswaldo Cruz, v. 95, p. 393-400; 2000.

Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. **Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis**. Eletrophoresis. v. 6 (9): p. 427-448; 1985.

Nunes GS. **Métodos imunoquímicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estado da arte e perspectiva**. Química Nova. v. 28 (3), p. 462-471; 2005.

Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimley G, Gray T. **How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein**. Protein Science. v. 4 (11): p. 2411-2423; 1995.

Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzardi GP, Kanh J, Fox CH, Schnittman SM, Schwartz DH, Corey L, Fauci AS. **Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implication for antiviral therapy**. Nature Medicine. v. (3): p. 341 - 345; 1998.

Pantaleo G, Fauci AS. **Immunopathogenesis of HIV Infection**. Annu Rev Microbiol. 50: p.825-854; 1996.

Paranjape RS. **Immunopathogenesis of HIV infection**. Indian J Med Res. v 121 (3): p. 240-255; 2005.

Parkin J, Cohen B. **An overview of the immune system**. The Lancet. v.357 (6), p. 1777-1789; 2001.

Pattanapanyasat K e Thakar MR. **CD4+ T cell count as a tool to monitor HIV progression e anti-retroviral therapy**. Indian J Med Res. 121: p. 539-549; 2005.

Payne WJ, Marshall DL, Shockley RK, Martin WJ. **Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies**. Clinical Microbiology Review. p. 313-329; 1988.

- Perfetto SP, Roederer M. Increased **immunofluorescence sensitivity using 532nm laser excitation**. Cytometry Part A. 71A: p. 73-79; 2007.
- Pestana MH, Gageiro JN. **Análise de dados para ciências sociais. A complementaridade do SPSS**. In: Lisboa. Contingência, associação e correlação. 4ª ed. chap. 2; p. 120-196; 1993.
- Phillips AN, Lee CA, Elford J, Janossy G, Timms A, Bofill M, Kernoff PBA. **Serial CD4 lymphocyte counts and development of AIDS**. The Lancet. v.337, p. 389-392; 1991.
- Pinheiro R R, Gouveia A M G, Yorinori E H, Andriol A. **Comparação de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de agar**. Braz J vet Res anim Sci. v. 42 (6), p. 453-458; 2005.
- Rahman M, Lane A, Swindell A, Bartram S. **Introduction to Flow Cytometry**. ABD Serotec. Chap.2, p. 9-14; 2006.
- Reilly JT. **Use and evaluation of leucocyte monoclonal antibodies in the diagnostic laboratory: a review**. Clin. Lab. Haem. 18, p. 1-5; 1996.
- Roederer M, Kantor AB, Parks DR, Henenberg LA. **Cy7PE and Cy7APC: Bright New Probes for Immunofluorescence**. Cytometry. 24: p. 191-197; 1996.
- Roederer M., **Conjugation of monoclonal antibodies** (August, 2004). [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 21 de Novembro 2007]. Disponível em: <http://www.drmmr.com/abcon/>.
- Roque ACA, Silva CSO, Taipa MA. **Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives**. Journal of Chromatography A. 1160, p. 44-55; 2007.
- Sevier ED, David GS, Martinis J, Desmond WJ, Bartholomew RM, Wang R. **Monoclonal Antibodies in Clinical Immunology**. Clin. Chem. 27(11), p. 1797-1806; 1981.
- Shapiro HM. **Practical Flow Cytometry**. 4ª edição. Ed.: A John Wiley e Sons, INC., Publication; 2003.
- Silva ACM, and Barone AA. **Fatores de risco para infecção pelo HIV em pacientes com o vírus da hepatite C**. Rev. Saúde Pública. v. 40, no.3, p.482-488; 2006.
- Silva TL, Reis A, Hewitt, Roseiro C. **Citometria de fluxo – Funcionalidade celular on-line em bioprocessos**. Boletim de Biotecnologia. v. 77 (4): p. 32-40; 2004.
- Strauss K, Hannet I, Engels S, Shiba A, Ward DM, Ullery S, Jinguji MG, Valinsky J, Barnett D, Orfao A, Kestens L. **Performance evaluation of the FACScout**

system: a dedicated system for clinical cellular analysis. Cytometry. v.26, p. 52-59; 1996.

Sudharshan S, Biswas J. **Introduction and immunopathogenesis of acquired immune deficiency syndrome.** Indian J Ophthalmol. v. 56: p. 357-362; 2008.

Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MAP, Andrade CLT. **A disseminação da epidemia da AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: uma análise espacial.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16(Sup.1): p. 7-19; 2000.

Tjioe I, Legerton T, Wegstein J, Herzenberg LA, Roederer M. **Phycoerythrin-allophycocyanin: A resonance energy transfer fluorochrome for immunofluorescence.** Cytometry. 44: p. 24-29; 2001.

Trowbridge I S, Thomas ML. **CD45: An Emerging Role as a Protein Tyrosine Phosphatase Required for Lymphocyte Activation and Development.** Annu. Rev. Immunol. 1994. 12, p. 85-116; 1994.

United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) - **AIDS Epidemic Update 2007.** [online] Rio de Janeiro, Brasil; 2007 [Capturado 26 de Novembro 2007] Disponível em: http://www.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments07_epiupdate

Zola H. **Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies.** Expert Opin Biol Ther. v.1, n.3, p. 375-383; 2001.

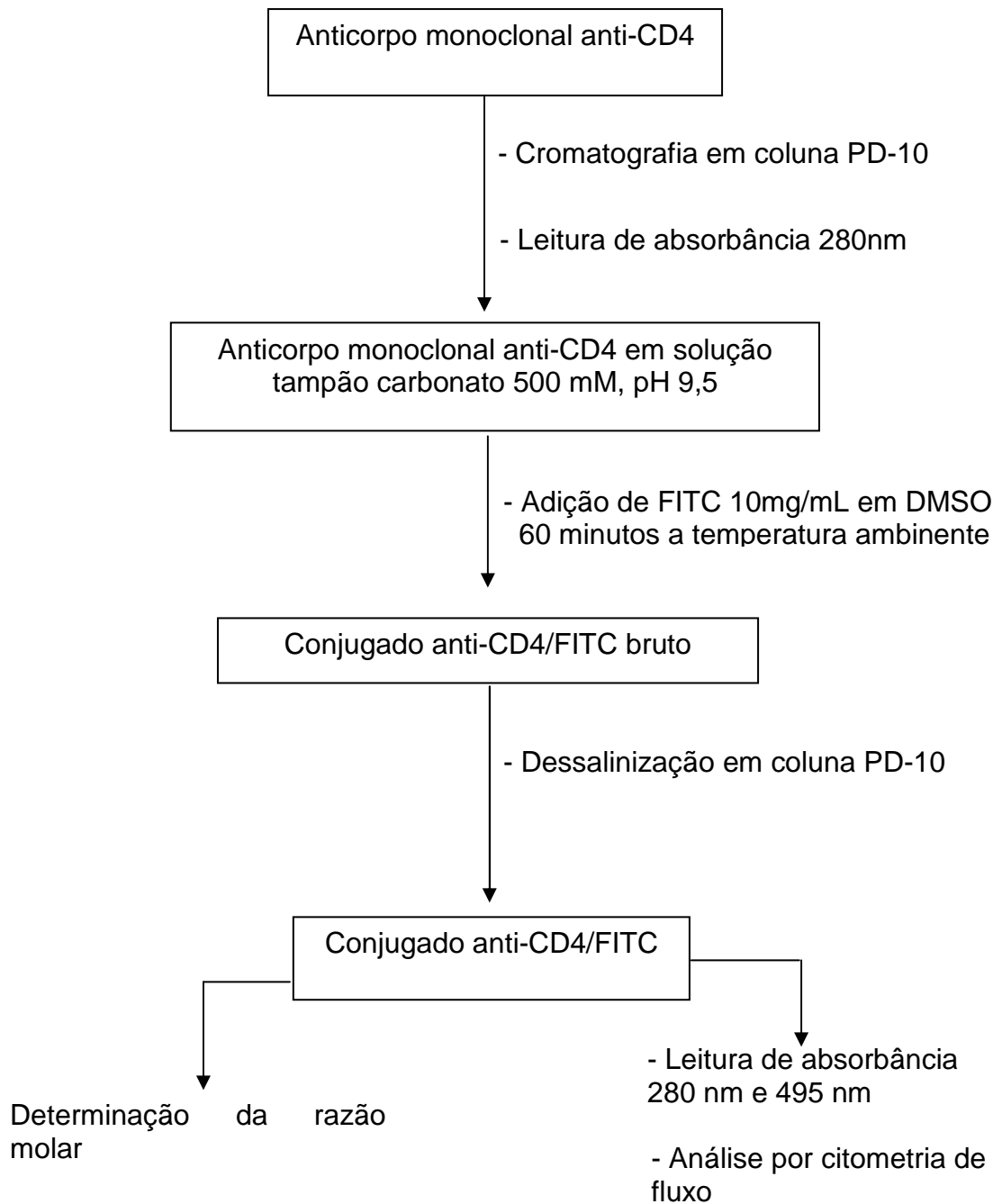
Waggoner AS, Ernst LA, Chen CH, Rechtenwald DJ **PECy5. A new fluorescent antibody label for three-color flow cytometry with a single laser.** Ann NY Acad Sci. 677: p. 185-193; 1993.

World Health organization. **Laboratory Guidelines for Enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS.** Chap. 2, p. 11-17; 2007.

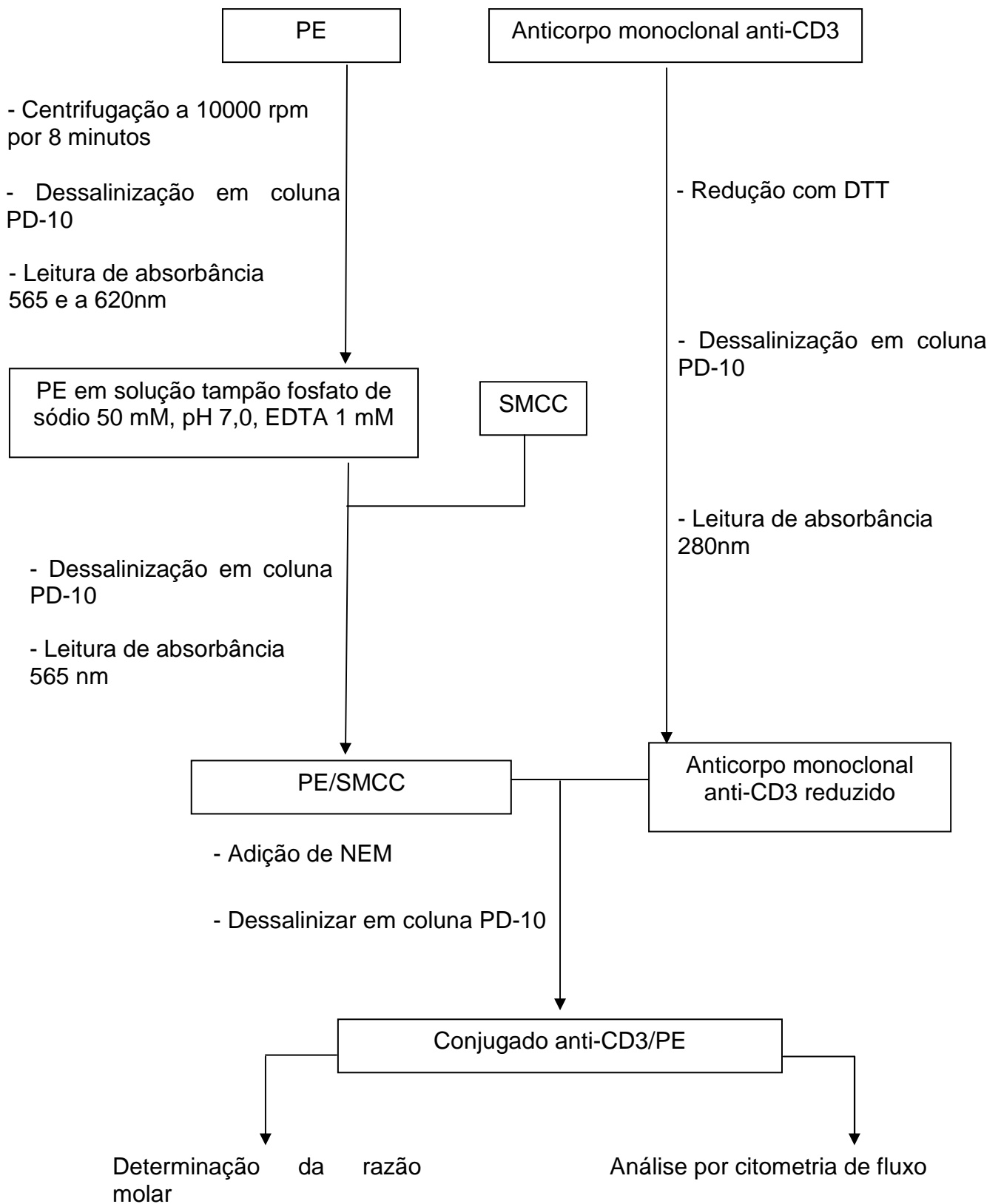
World Health organization. **Guidelines for HIV Diagnosis and Monitoring of Antiretroviral Therapy.** Chap. 3; 2005.

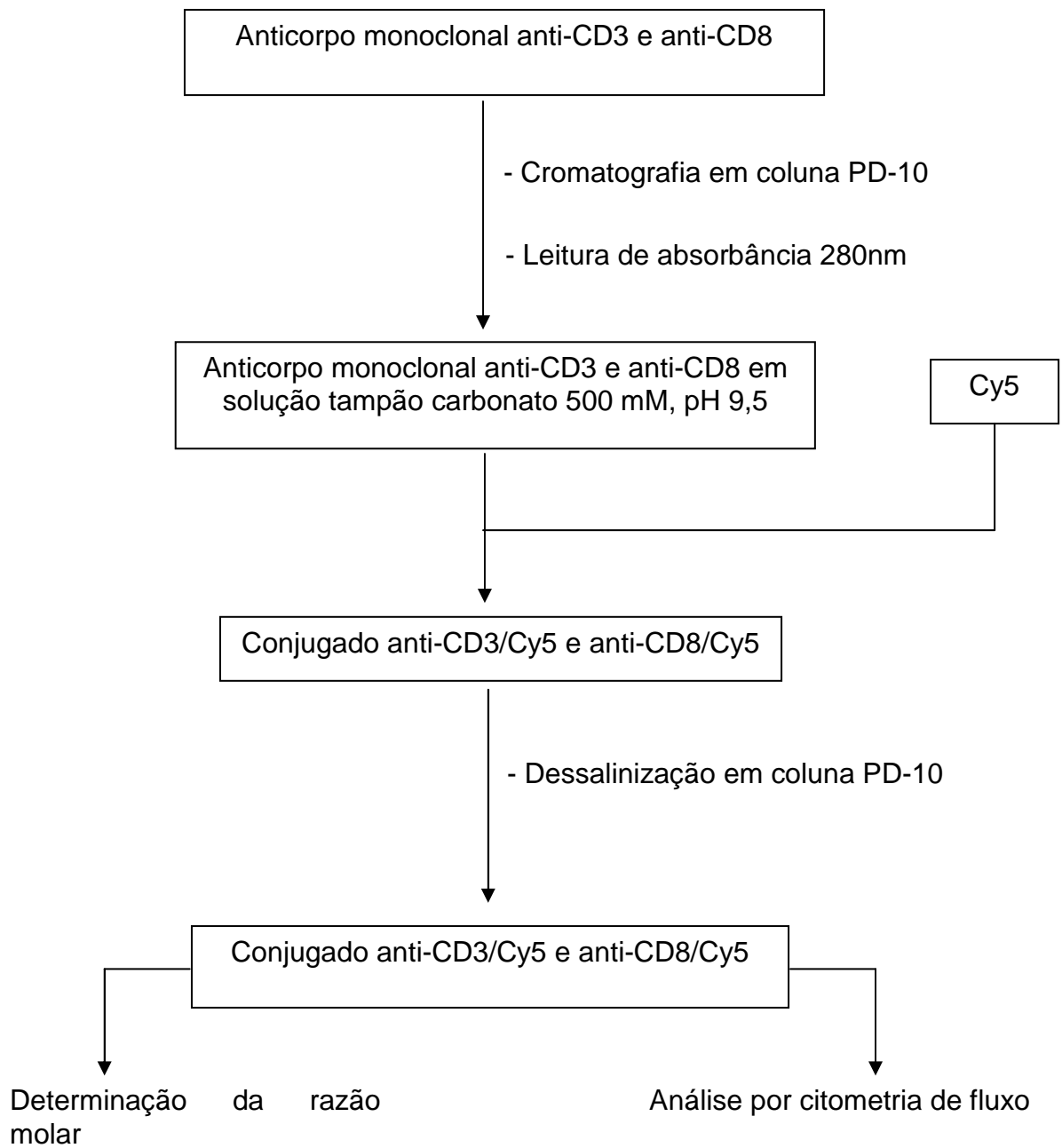
8- Anexo I

Fluxograma da conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD4 com FITC



Fluxograma da conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD3 com R-PE



Fluxograma da conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD3 e anti-CD8/Cy5

Fluxograma da conjugação do anticorpo monoclonal anti-CD4 com R-PECy7

