

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Marta de Almeida Santiago

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE
INSUMOS E PROCESSOS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE KITS
PARA DIAGNÓSTICO**

Rio de Janeiro
2015

Marta de Almeida Santiago

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE
INSUMOS E PROCESSOS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE KITS
PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira
Álvaro Luiz Bertho dos Santos

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Santiago, Marta de Almeida

Aplicação da citometria de fluxo no controle de qualidade de insumos e processos utilizados no desenvolvimento de kits para diagnóstico / Marta de Almeida Santiago. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

109 f.: il

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, 2015.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira e Álvaro Luiz Bertho dos Santos

1. Citometria de fluxo. 2. MESF. 3. Microarranjos líquidos. 4. Conjugados. 5. Antígenos. 6. Controle de qualidade. I. Título.

Flow cytometry application in the quality control of reagents and processes used in the development of diagnostic kits.

Marta de Almeida Santiago

**APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NO CONTROLE DE QUALIDADE DE
INSUMOS E PROCESSOS UTILIZADOS NO DESENVOLVIMENTO DE KITS
PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovada em 23/06/2015

BANCA EXAMINADORA

Fabio Coelho Amendoeira (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – FIOCRUZ

Paula Mello De Luca (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rodrigo da Cunha Bisaggio (Doutor)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira (Doutor) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - FIOCRUZ

Álvaro Luiz Bertho dos Santos (Doutor) - Orientador
Instituto Oswaldo Cruz– FIOCRUZ

Dedico este trabalho
à minha amada filha Vitória,
minha maior conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Tininha e Álvaro, por terem aceitado caminhar comigo nesses quatro anos. Ao Álvaro, meu mestre em citometria de fluxo, por participar mais uma vez de minhas conquistas profissionais. À Tininha, por apostar nas ideias de uma desconhecida que bateu na sua porta. Obrigada a ambos pelos momentos de compreensão, questionamentos, discussão, revisões e correria. Finalmente, conseguimos!

Aos membros da minha banca, por aceitarem fazer parte desse momento e contribuírem com seus questionamentos para minha formação. Em especial, à minha amiga Paula pela revisão da tese e por estarmos mais uma vez trabalhando juntas após mais de 20 anos. Sempre muito bom. E ao amigo Rodrigo, por ter aceitado participar de todas as etapas de discussão desse trabalho. Foi sensacional poder discutir biologia com você novamente.

Aos meus colegas de turma, em especial Heliana, por tornarem essa jornada mais fácil e mais alegre.

Aos meus professores da Pós-Graduação do INCQS por estarem ali nos ensinando e disponibilizando seu tempo para nos formar, ajudar e guiar nesse assunto tão novo para mim, chamado Vigilância Sanitária.

Às meninas da Secretária da Pós-Graduação, em especial à Samela, pela dedicação e pela paciência em nos ajudar, afinal alunos são sempre alunos, independente do curso, da idade e da etapa da vida.

Ao professor Sergio Silva, INCQS, pela ajuda na análise estatística de meus dados e pela atenção.

À Raquel Ferraz, pela ajuda na organização das Figuras do artigo e pelo carinho.

Ao meu chefe Edimilson, pela compreensão nos momentos de dedicação à tese, pela confiança em meu trabalho, pela amizade e apoio.

Aos meus colegas do Bio-Manguinhos, em especial Christiane, Bruna, Marcelle, Bernardo, Leila, Keila, Roberto, Lilian e Elaine pelo apoio, amizade e carinho não só durante esses quatro anos de doutorado, mas por toda a nossa jornada em Bio-Manguinhos. Cabe aqui um agradecimento especial às minhas amigaaaaaas, como eu as chamo, Chris e Bruna pelo intenso envolvimento na tese, nas minhas conquistas, nos meus conflitos, resumindo, na minha vida. Vocês duas tornam meus dias mais leves e minha jornada mais iluminada. Como sempre digo, o que seria de mim sem vocês, meus queridos amigos.

À minha família por estar sempre ao meu lado nas alegrias e nas tristezas. Muito obrigada. Eu não poderia ter família melhor. Você, Luiz Fernando, faz parte dessa turma rsrs. Muito obrigada por caminhar comigo!

Aos meus pais, o que dizer? Tanta coisa... Mas vou resumir, pois não conseguirei terminar sem chorar... Obrigada por estarem presentes, SEMPRE!! Eu não teria conseguido chegar aqui sem vocês. Muito obrigada. AMO VOCÊS.

À minha filha, para quem dediquei esse trabalho, por tudo que ela é para mim. Meu maior tesouro, minha alegria, meu amor maior. Obrigada por você existir. EU TE AMO!

Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Ensaio baseado em microesferas tem sido alvo de inúmeros estudos na pesquisa básica e clínica, utilizando como metodologias tanto a citometria de fluxo como a plataforma de microarranjos líquidos. No entanto, ainda existe a necessidade de estudos que visem o desenvolvimento de metodologias de controle de qualidade de insumos e processos empregados nesses ensaios. Desta forma, a presente tese teve como objetivo principal desenvolver métodos aplicando a citometria de fluxo para avaliação de anticorpos ligados a fluorocromos e de processos de acoplamento de anticorpos e/ou antígenos a microesferas. A avaliação dos acoplamentos de anticorpos foi realizada através da citometria de fluxo tradicional e da citometria de fluxo quantitativa (CFQ). Conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE de diferentes fabricantes e lotes foram acoplados a microesferas e avaliados durante 18 meses. Os resultados mostraram que as melhores condições de acoplamento foram 5 µg/mL de anti-IgG-PE e 1:300 de anti-HBSAg-PE e que houve uma variação entre os lotes e fabricantes dos conjugados tanto na intensidade de fluorescência quanto na estabilidade. A CFQ se mostrou uma ferramenta fundamental para validação dos estudos de estabilidade. A avaliação dos acoplamentos de antígenos às microesferas foi tanto no citômetro de fluxo FACSCalibur quanto no equipamento LX200. Para tal, os diferentes antígenos foram acoplados às microesferas em distintas condições de acoplamento. Os resultados mostraram que a melhor condição de acoplamento foi 2 horas na presença de EDC/NHS. Além disso, todos os antígenos apresentaram uma queda significativa da marcação durante os 18 meses de avaliação, sendo essa tendência de queda diferente entre as avaliações feitas nos equipamentos FACSCalibur e LX200. Comparando os resultados dos dois equipamentos, o LX200 apresentou resultados muito mais dispersos que o FACSCalibur. Desta forma, concluímos que a citometria de fluxo pode ser utilizada como uma importante ferramenta de controle de qualidade de insumos e processos utilizados em ensaios de microarranjos líquidos. Além disso, esse protocolo citofluorimétrico pode ser utilizado na avaliação e controle de qualidade de outros conjugados e processos utilizados em outras tecnologias.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. MESF. Microarranjos líquidos. Conjugados. Antígenos. Controle de qualidade.

ABSTRACT

Bead-based assays have been the focus of numerous studies in basic and clinical research, using flow cytometry as well as liquid microarray platforms. However, studies are needed in order to develop methodologies for quality control of reagents and processes used in these assays. Thus, the present thesis aimed to develop methods using flow cytometry to evaluate monoclonal antibodies bound to fluorochromes and coupling processes of antibodies and/or antigens to beads. The evaluation of antibody coupling to beads was performed by both traditional and quantitative flow cytometry (QFC). Anti-IgG-PE and anti-HBSAg-PE conjugates of different lots and manufacturers were coupled to beads and evaluated for 18 months. The results showed that the best coupling conditions were 5 µg/mL for anti-IgG-PE and 1:300 for anti-HBSAg-PE. There was a difference in the fluorescence intensities and in the stability of different manufactures and lots of conjugates. The CFQ proved to be an essential tool for validation of stability studies. The evaluation of the antigens couplings to beads was carried out using FACSCalibur flow cytometer and the LX200 reader. Different antigens were coupled to the beads using diverse incubation conditions. The results showed that the best coupling condition was 2 hours. In addition, all antigens showed a noteworthy decrease in the staining during the 18-month evaluation. This decrease tendency was different between the LX200 and FACSCalibur analysis. Comparing the fluorescence responses between the two readers, LX200 had more dispersed results than FACSCalibur. Therefore, we concluded that flow cytometry can be used as an important quality control tool for reagents and processes used in bead-based assays. Furthermore, this flow cytometric protocol can be used for evaluation and quality control of other conjugates and processes used in other biotechnologies.

Keywords: Flow cytometry. MESF. Microarray bead based array. Conjugates. Antigens. Quality control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura esquematizada de uma molécula de anticorpo	19
Figura 2 – Esquema de ligação da R-PE ao anticorpo	24
Figura 3 – Desenho esquemático do citômetro de fluxo	27
Figura 4 – Padrão de identificação das microesferas da Luminex	32
Figura 5 – Etapas da reação microarranjos líquidos	33
Figura 6 – Técnica de acoplamento das microesferas com antígenos ou anticorpos	41
Figura 7 – Reação das microesferas acopladas com antígenos	42
Figura 8 – Avaliação das microesferas acopladas aos anticorpos	44
Figura 9 – Marcação das microesferas com anti-IgG-FITC	45
Figura 10 – Modelo de análise pela citometria de fluxo	47
Figura 11 – Gráficos representativos da análise de MESF utilizando o kit Quantum R-PE MESF	48
Figura 12 – Planilha para obtenção dos valores de MESF	49
Figura 13 – Avaliação da marcação de anti-IgG-PE em diferentes códigos de microesferas	52
Figura 14 – Avaliação da melhor concentração e diluição de acoplamento dos conjugados às microesferas	54
Figura 15 - Histogramas de PE dos conjugados A1 e A4 em diferentes concentrações de acoplamento	55
Figura 16 – Coeficientes de variação dos picos de PE dos conjugados anti-IgG-PE	56
Figura 17 – Histogramas dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE acoplados às microesferas	57
Figura 18 – <i>Dot plot</i> e histograma de PE das microesferas do kit Quantum R-PE MESF	59
Figura 19 – Avaliação das microesferas do kit Quantum R-PE MESF	60
Figura 20 – Avaliação das microesferas do kit Quantum R-PE MESF de diferentes lotes	61
Figura 21 – Avaliação de MESF dos conjugados durante 18 meses	63

Figura 22 – Avaliação da intensidade de fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE durante 18 meses	64
Figura 23 – Comparação dos histogramas de PE dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE nos pontos inicial e final da avaliação	66
Figura 24 – Avaliação do percentual de queda das intensidades de fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE após 18 meses	67
Figura 25 – Comparação entre a citometria de fluxo quantitativa e a tradicional	68
Figura 26 – Detecção da fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE	70
Figura 27 – Detecção da fluorescência do conjugado anti-IgG-FITC	71
Figura 28 – Avaliação no FACSCalibur das diferentes condições acoplamento	73
Figura 29 – Histogramas do primeiro mês de avaliação das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas	74
Figura 30 - Avaliação no FACSCalibur das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas durante 18 meses	75
Figura 31 - Comparação dos histogramas do primeiro e último mês de avaliação das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas	77
Figura 32 – Avaliação no LX200 das diferentes condições acoplamento	79
Figura 33 - Avaliação no LX200 das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas durante 18 meses	80
Figura 34 – Estabilidade dos antígenos nos 18 meses de avaliação no FACSCalibur	82
Figura 35 – Estabilidade dos antígenos nos 18 meses de avaliação no LX200	83
Figura 36 – Comparação dos percentuais de queda das marcações obtidos no FACSCalibur e no LX200	85
Figura 37 – Comparação entre a dispersão das intensidades de fluorescência e a tendência de queda entre os dados do FACSCalibur e do LX200	86
Figura 38 – Comparação das intensidades de fluorescência de amostras de provenientes de um poço ou sete poços de reação	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fluorocromos com seus respectivos picos de excitação e emissão e lasers	22
Quadro 2 – Médias geométricas e percentuais de queda da intensidade de fluorescência dos conjugados nas condições máximas e mínimas de acoplamento	58
Quadro 3 - Valores absolutos de MESF dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE	62
Quadro 4 – Médias geométricas e percentual de queda dos conjugados após 18 meses de avaliação no FACSCalibur	82
Quadro 5 - MFIs e percentuais de queda dos conjugados após 8 meses de avaliação no FACSCalibur	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A1, A2, A3 e A4 – conjugados anti-IgG-PE do fabricante A

AcMns - anticorpos monoclonais

AEQ – avaliação externa de qualidade

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

AgTc – antígenos de *Trypanossoma cruzi*

AgTc1 – antígeno 1 de *Trypanossoma cruzi*

AgTc2 – antígeno 2 de *Trypanossoma cruzi*

AgHIV – antígeno do vírus da imunodeficiência humana

AgHTLV – antígeno do vírus linfotrópico da célula humana

AgTp – antígeno de *Treponema pallidum*

AgHCV – antígeno do vírus da Hepatite C

AgHBV – antígeno do vírus da Hepatite B

Anti-HBSAg-PE – anticorpo contra antígeno de superfície da Hepatite B conjugado à ficoeritrina

Anti-HLA - anticorpo contra antígeno de leucócito humano

Anti-IgG-PE – anticorpo de cabra contra imunoglobulina G humana conjugado à ficoeritrina

Anti-IgG-FITC – anticorpo de coelho contra imunoglobulina G de cabra conjugado ao isotiocianato de fluoresceína

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC – alofocianina

APCs – alofocianinas

B1 e B2 – conjugados anti-IgG-PE do fabricante B

BD - Becton & Dickinson

Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

B-PE – R- ficoeritrina

BSA - albumina do soro bovina

C – conjugado anti-HBSAg-PE do fabricante C

CBA – arranjo citométrico de microesferas (*cytometric bead array*)

CD8 – marcador de superfície de células T e NK (*natural killer*)

CD20 – marcador de superfície de células B

CD38 – marcador de células T, B, NK, células precursoras, macrófagos/ monócitos

CF – citometria de fluxo

CL – regiões constantes das cadeias leves

CFQ – citometria de fluxo quantitativa

CH1, CH2 e CH3 – regiões constantes das cadeias pesadas

CV – coeficiente de variação

CVs – coeficientes de variação

Cy5 – cianina 5

Cy5.5 – cianina 5.5

D – conjugado anti-HBSAg-PE do fabricante D

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDC - 1-ethyl-3-[3 dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride

ELISA – ensaios enzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Fab – fragmento monovalente originário da digestão da molécula de anticorpo com papaína (Fab - *fragment antigen binding*)

(Fab')₂ – fragmento bivalente originário da digestão da molécula de anticorpo com pepsina (Fab - *fragment antigen binding*)

Fc – fragmento cristalizável

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FSC – tamanho (*forward scatter*)

HIV – vírus de imunodeficiência humana

HLA - antígeno de leucócito humano

IgG - imunoglobulina G

LATED - Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

Log – forma logarítmica

MES – 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

MESF - moléculas de fluorocromo solúvel equivalente (*Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome*)

MBAA – ensaios multitest baseados em microesferas (*multiplex bead array assays*)

MFI - mediana de intensidade de fluorescência

NaAz – azida sódica

NHS - N-hidroxysulfosuccimide (sulfo-NHS)

nm – nanômetros

PBS – tampão fosfato

PCR – reação em cadeia da polimerase

PCs - ficocianinas

PE – ficoeritrina

PE+ - cursor para avaliação dos dados numéricos no histograma de PE

PEs – ficoeritrinas

PECS – ficoeritrocianinas

PerCP – Peridina clorofila

PMTs – fotomultiplicadores

Razão F/P – razão fluorocromo/proteína (o mesmo que razão D/P)

RPM – rotações por minuto

RD1 - rodamina

R-PE – R- ficoeritrina

SSC – granularidade (*side scatter*)

VL – regiões variáveis da cadeia leve

VH – regiões variáveis das cadeias pesadas

λ_{\max} – comprimento de onda máximo

WFI – *water for injection*

ZAP-70 – membro da família das tirosina quinases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 ANTÍGENOS, ANTICORPOS E FLUOROCROMOS	19
1.2 CITOMETRIA DE FLUXO	26
1.3 IMUNOENSAIOS BASEADOS EM MICROARRANJOS	31
1.4 CONTROLE DE QUALIDADE	34
1.5 VIGILÂNCIA SANITÁRIA	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 GERAL	37
2.2 ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 AMOSTRAS E REAGENTES	38
3.1.1 Microesferas, conjugados e antígenos	38
3.1.2 Soros	39
3.2 ACOPLAMENTO DAS MICROESFERAS	39
3.2.1 Acoplamento dos antígenos	39
3.2.2 Acoplamento dos anticorpos	40
3.3 ENSAIO DE MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTÍGENOS	41
3.4 ENSAIO DE MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTICORPOS	43
3.5 MARCAÇÃO DAS MICROESFERAS ACOPLADAS A ANTI-IGG-PE COM ANTI-IGG-FITC	44
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO	46
3.7 AVALIAÇÃO DOS CONJUGADOS ANTI-IGG-PE POR ESPECTROFOTOMETRIA	50
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS	51
4.1 AVALIAÇÃO DAS MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTICORPOS	51
4.1.1 Avaliação de diferentes códigos de microesferas	51
4.1.2 Avaliação de diferentes concentrações e diluições de acoplamento em relação à intensidade de fluorescência e perfil dos histogramas	53
4.1.3 Citometria de fluxo quantitativa (CFQ)	59
4.1.4 Avaliação dos conjugados pela CFQ	61
4.1.5 Avaliação de brilho e estabilidade dos conjugados	63

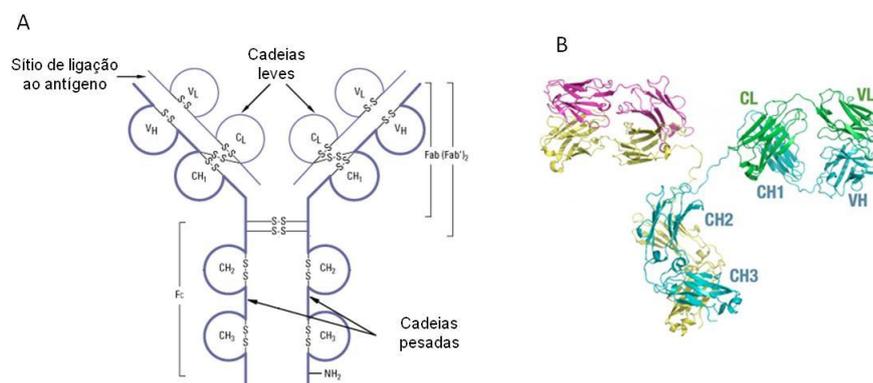
4.1.6 Comparativo entre a citometria de fluxo quantitativa (CFQ) e a tradicional (CFT)	67
4.1.7 Avaliação da marcação dos conjugados anti-IgG-PE com anti-IgG-FITC	68
4.1.8 Avaliação pela espectrofotometria dos conjugados anti-IgG-PE	71
4.2 AVALIAÇÃO DAS MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTÍGENOS	72
4.2.1 Avaliação dos acoplamentos no citômetro FACSCalibur	72
4.2.2 Avaliação dos acoplamentos no LX200	78
4.2.3 Avaliação da estabilidade dos acoplamentos no FACSCalibur	81
4.2.4 Avaliação da estabilidade dos acoplamentos no LX200	82
4.2.5 Comparação dos resultados de estabilidade dos acoplamentos obtidos no FACSCalibur e no LX200	84
5 DISCUSSÃO	89
6 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTÍGENOS, ANTICORPOS E FLUOROCROMOS

Os anticorpos são glicoproteínas que se ligam a moléculas ou fragmentos de moléculas conhecidos como antígenos. Os antígenos são substâncias que podem ser reconhecidas pelas células T, células B ou ambas através de receptores representados por anticorpo ou TCR (receptor de célula T) específicos. Enquanto os antígenos completos ou imunógenos são antígenos capazes de ativar uma resposta imune, os antígenos incompletos não são capazes de ativar essa resposta (ALMEIDA, 2015). Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são produzidos por linfócitos B e são constituídos por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Ligam-se aos antígenos com um alto grau de especificidade e afinidade através do sítio de ligação ao antígeno localizado nas regiões variáveis N-terminais das cadeias leves e pesadas (ABBAS, 2007). Essas regiões variáveis conferem especificidade a uma única porção do antígeno chamada epítopo (WEINER et al, 2010). Na Figura 1 encontra-se ilustrada a estrutura esquematizada de uma imunoglobulina G (IgG).

Figura 1 – Estrutura esquematizada de uma molécula de anticorpo



A. estrutura aproximada de uma molécula de IgG, onde se localizam as cadeias leves, com suas regiões constantes (CL) e variáveis (VL) e as cadeias pesadas, com suas regiões constantes (CH₁, CH₂ e CH₃) e variáveis (VH). Sítios de ligação dos antígenos e porções Fab, (Fab')₂ e Fc da molécula identificados na Figura. B. Esquema da estrutura bidimensional da IgG. A. Modificada de <https://www.lifetechnologies.com>. B. Modificada de <http://www.blopi.com>

As imunoglobulinas são amplamente utilizadas em experimentos *in vitro* e ou *in vivo* visto que a obtenção de reagentes específicos a um determinado antígeno é um processo há décadas padronizado (TETIN; STROUPE, 2004). Sua importância e utilização foram ainda mais expandidas com a descoberta dos anticorpos monoclonais e desenvolvimento da tecnologia necessária para sua produção (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; GALFRE et al, 1977; LO et al., 1984).

Os anticorpos monoclonais (AcMns) são anticorpos específicos a um determinado epítopo e são produzidos utilizando a técnica do hibridoma de células B (KÖHLER; MILSTEIN, 1975, GALFRE et al, 1977; LO et al, 1984). Basicamente, a técnica para a produção desses anticorpos consistia na fusão de linhagens de mieloma com células de baço de camundongos imunizados com um determinado antígeno. Essas células B imortalizadas secretavam anticorpos de um único tipo, recebendo o nome, então, de anticorpos monoclonais (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; ALKAN, 2004). A descoberta dessa técnica de hibridomas para a produção de anticorpos aumentou a especificidade, a sensibilidade e a capacidade de produção dessas moléculas. Hoje em dia, podem ser produzidas em bactérias, leveduras, células de mamíferos e animais transgênicos. Sua alta especificidade favoreceu seu uso não apenas na pesquisa, mas também nos campos do diagnóstico e terapia (TETIN; STROUPE, 2004).

Na terapia, os AcMns são utilizados nos tratamentos para câncer, doenças infecciosas, alergia, asma, algumas doenças autoimunes e em transplantes. Seu uso se tornou vantajoso visto que são altamente específicos e mostram alta afinidade a seus alvos, além de apresentarem efeitos adversos limitados (ALKAN, 2004). Existem vários AcMns licenciados para o tratamento de doenças como câncer, alergia e doenças autoimunes, como, por exemplo, artrite reumatoide e doença de Crohn (DOS SANTOS et al, 2006; SHUKLA et al, 2007; LI et al, 2010; WEINER et al, 2010). Na pesquisa básica, são fundamentais no estudo de receptores de superfície (fenotipagem celular) e intracelulares e na avaliação da produção de citocinas intracelulares (SHAPIRO, 2003). Para a área da imunologia, o descobrimento dessas moléculas representou um avanço singular, gerando novos conceitos bem como novas hipóteses. Essas moléculas são utilizadas em inúmeros métodos laboratoriais como imunoensaios, ensaios de purificação e identificação de proteínas, marcação de antígenos em células e tecidos, purificação de células e

avaliação de interações antígenos anticorpos (ABBAS, 2007; WEINER et al, 2010). No campo de diagnóstico, são fundamentais também na imunocitoquímica, imunofluorescência direta e indireta e citometria de fluxo (REILLY, 1996; TETIN; STROUPE, 2004). No diagnóstico clínico, independente da técnica empregada, os AcMns estão envolvidos na detecção de hormônios, avaliação de alergias, diagnóstico de doenças infecciosas, avaliação de doenças linfoproliferativas, acompanhamento de pacientes com o vírus de imunodeficiência humana (HIV), diagnóstico de doenças malignas como leucemias e linfomas e doenças reumáticas (SCHMIDT, 1989; SALES; MORAES-VASCONCELOS, 2013).

Uma das aplicações dos anticorpos monoclonais é seu uso como ligantes reveladores de reações. Para tal, essas proteínas devem ser conjugadas a outras moléculas permitindo que a reação entre esses anticorpos e seus antígenos específicos se torne detectável. Em relação aos imunoensaios, esses reveladores da reação incluem radioisótopos e enzimas com seus respectivos substratos cromogênicos e, mais recentemente, substratos fluorogênicos e quimioluminescentes (TETIN; STROUPE, 2004). Nas tecnologias de microarranjos líquidos e citometria de fluxo, essas moléculas reveladoras são corantes fluorescentes chamados de fluorocromos.

Os fluorocromos são compostos fluorescentes que absorvem luz em um determinado comprimento de onda (excitação) e emitem luz em um comprimento de onda maior (emissão). O processo de emissão é conhecido como fluorescência. Essa fluorescência se torna bastante útil na citometria de fluxo, por exemplo, quando esses fluorocromos apresentam propriedades biológicas ou estão acoplados a anticorpos monoclonais, pois ela permite a “revelação” de uma molécula de superfície ou intracelular ou de uma atividade fisiológica da célula. Existem inúmeros fluorocromos disponíveis cada qual com seu respectivo comprimento de onda de excitação e emissão (BERTHO; FERRAZ, 2013). Entre os marcadores fluorescentes mais utilizados estão os corantes orgânicos (fluoresceína ou FITC, Alexa488 e cianina5 ou Cy5), as proteínas fluorescentes (R-ficoeritrina ou R-PE e alofocianina ou APC), as nanopartículas de polímeros (FluoSpheres) e os nanocristais semicondutores (Quantum dots) (MAYR; MOSER; KLIMANT, 2009).

A ficoeritrina (PE) é um dos fluorocromos mais utilizados visto que essas moléculas são altamente fluorescentes e, por isso, despertam um grande interesse para sua utilização em tecnologias que necessitam de agentes reveladores, como a citometria de fluxo e imunoenaios. As ficoeritrinas (PEs) são proteínas da família das ficobiliproteínas encontradas em algas vermelhas e cianobactérias, tendo um papel crítico no aparato fotossintético desses organismos. A família de ficobiliproteínas também é composta pelas ficocianinas e aloficocianinas. Essa classificação é baseada nas propriedades de absorção e no tipo de bilinas (cromóforos) presentes. Enquanto as PEs apresentam comprimentos de onda máximos (λ_{max}) de absorção entre 540-570 nm, as ficocianinas (PCs) absorvem entre 610-620 nm, as aloficocianinas (APCs) entre 650-655 nm e as ficoeritrocianinas (PECS) entre 560-600nm (MUNIER, 2014). Dentre as ficoeritrinas, as mais utilizadas são a R-ficoeritrina (R-PE) e a B-ficoeritrina (B-PE), ambas apresentando características diferentes como origem, espectro de absorção e estabilidade (SHAPIRO, 2003; MUNIER, 2014). Abaixo, estão descritos alguns fluorocromos com seus respectivos comprimentos de onda de excitação e emissão e os lasers utilizados para excitá-los (Quadro 1).

Quadro 1 – Fluorocromos com seus respectivos picos de excitação e emissão e lasers

Fluorocromo	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Laser (nm)
Alexa Fluor® 405	401	421	405, 407
Cascade Blue	395	420	334-364, 351-356, 405, 407
Cascade Yellow	400	550	405-407
Pacific Blue	405	455	405-407
Alexa Fluor® 430	433	541	405-407
PerCP	490	570	488
FITC	495	525	488
Alexa Fluor® 488	495	519	488
Alexa Fluor® 532	532	555	514

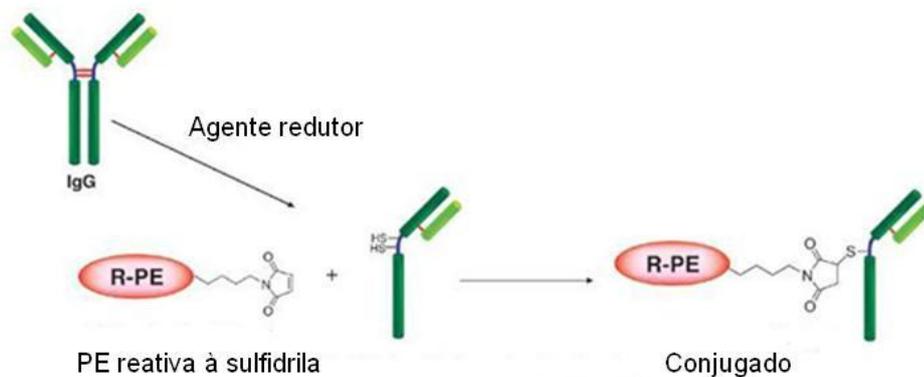
PE	562	575	488, 514, 568
RD-1	564	578	488, 514, 568
Texas Red	595	615	568
Alexa Fluor® 633	630	650	633, 635, 647
Alexa Fluor® 647	647	670	633, 635, 647
APC	650	660	633, 635, 647
Cy5	650	665	633, 635, 647
Alexa Fluor® 660	660	690	633, 635, 647
Cy5.5	675	695	633, 635, 647
Alexa Fluor® 680	680	700	633, 635, 647
Alexa Fluor® 700	700	720	633, 635, 647

Fonte: Modificada de BERTHO; FERRAZ, 2013.

Para que os anticorpos possam ser utilizados como agentes reveladores das reações realizadas em imunoenaios, essas moléculas devem ser acopladas ou às enzimas (ensaio enzimático – ELISA) ou a fluorocromos (ensaio de microarranjos líquidos e citometria de fluxo), através de processos de conjugação. Essa modificação de proteínas, DNA e outros biopolímeros através da marcação com moléculas reveladoras se tornou uma importante ferramenta na imunologia, histoquímica e biologia celular (BRINKLEY, 1992). Nos ensaios baseados em anticorpos acoplados a marcadores fluorescentes, a seletividade das interações de ligação dos anticorpos é associada à detecção simples, sensível e não perigosa da detecção da fluorescência (HEMPEN; KARST, 2006). Existem vários artigos que descrevem protocolos de conjugação para anticorpos (HOLMES; LANTZ; RUSS, 1997; BRINKLEY, 1992; HAYASHI-TAKANAK et al, 2014) além da disponibilização online (ROEDERER, 2004). Para cada fluorocromo existe um protocolo de conjugação a ser seguido, pois os procedimentos de conjugação dependem do tipo de grupo reativo aderido ao fluorocromo (HOLMES; LANTZ; RUSS, 1997). A Figura 2 mostra o sítio de ligação da PE às sulfidrilas das imunoglobulinas para formação de um conjugado R-PE. Os processos de conjugação envolvem uma série de reações químicas e variam de acordo com a natureza das moléculas e seus marcadores fluorescentes. Fatores como tipo de grupos reativos da molécula,

tampão, solventes, pH, concentração de proteína e de fluorocromo e processos de purificação devem ser avaliados e escolhidos de acordo com as características de cada molécula (BRINKLEY, 1992). Os processos de conjugação com ficobiliproteínas, como PE e APC, por exemplo, são mais difíceis que os utilizados para FITC e biotina e se baseiam, de um modo geral, em três etapas: preparo da PE, preparo do anticorpo e conjugação dos dois reagentes modificados (HOLMES; LANTZ, RUSS, 1997).

Figura 2 – Esquema de ligação da R-PE ao anticorpo



Ligação da R-PE à sulfidril da IgG formando o conjugado IgG-PE. Agente redutor é um composto que expõe as sulfidrilas da IgG. Fonte: Modificada de <http://www.dojindo.com>

Em todos os processos de conjugação descritos com corantes fluorescentes, a espectrofotometria é a técnica mais utilizada para avaliar o grau de eficiência do processo de conjugação. Esse processo é aplicável a corantes e outras moléculas que apresentam absorção de luz acima de 280 nm. A conjugação é avaliada pela espectrofotometria pela razão corante/proteína (razão D/P - *dye/protein*), também conhecida como razão fluorocromo/proteína (razão F/P) nos corantes fluorescentes. O cálculo dessa razão se baseia na determinação da concentração do corante medida através de sua absorção no comprimento de onda máximo específico e na determinação da concentração da proteína através de sua absorção a 280 nm (BRINKLEY, 1992). Embora existam questionamentos sobre essa metodologia, inclusive a inexistência do método ao considerar que o corante sozinho tem

características iguais ao corante ligado à proteína (BRINKLEY, 1992), essa metodologia ainda é a técnica mais utilizada para avaliar a eficiência de um processo de conjugação. No que diz respeito à fluorescência de conjugados, embora a razão F/P possa determinar o número de fluorocromos por molécula de conjugado, não necessariamente ela representa a emissão da fluorescência pois esta depende também da energia de excitação (VOGT et al, 2000). Sendo a emissão da fluorescência o desfecho da vasta maioria dos ensaios tanto na pesquisa quanto no diagnóstico fica este parâmetro em aberto na avaliação da conjugação do anticorpo em questão.

O tipo de fluorocromo a ser utilizado no processo de conjugação dependerá do tempo disponível para executar o processo de conjugação, do tipo de fontes de excitação disponíveis, no caso da citometria de fluxo, o tipo de laser do equipamento que será utilizado, da quantidade de antígeno a ser avaliada e da presença ou não de combinações de fluorocromos para análise multiparamétrica (HOLMES; LANTZ, RUSS, 1997). Além disso, características como brilho e estabilidade são parâmetros importantes na escolha do melhor corante a ser utilizado em uma determinada técnica (MAHMOUDIAN et al, 2011). Diversos trabalhos têm apontado diferenças nessas características em relação ao tipo de fluorocromo como também aos efeitos após exposição à luz, diferentes pH e temperaturas (PATSENKER et al, 2008; MAYR; MOSER; KLIMANT, 2009; GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al, 2014; MUNIER et al, 2014). No caso de estudos com células vivas, além do brilho e da estabilidade, devem ser avaliados também os efeitos da conjugação na função da proteína assim como a possível ligação do corante a outros elementos celulares (HAYASHI-TAKANAKA et al, 2014).

Um equipamento que tem sido amplamente utilizado para avaliar e quantificar a ligação de anticorpos a antígenos diversos e vice versa é o citômetro de fluxo. Desta forma, tendo em vista a relevância deste equipamento no contexto desta tese, segue uma sucinta descrição da citometria de fluxo.

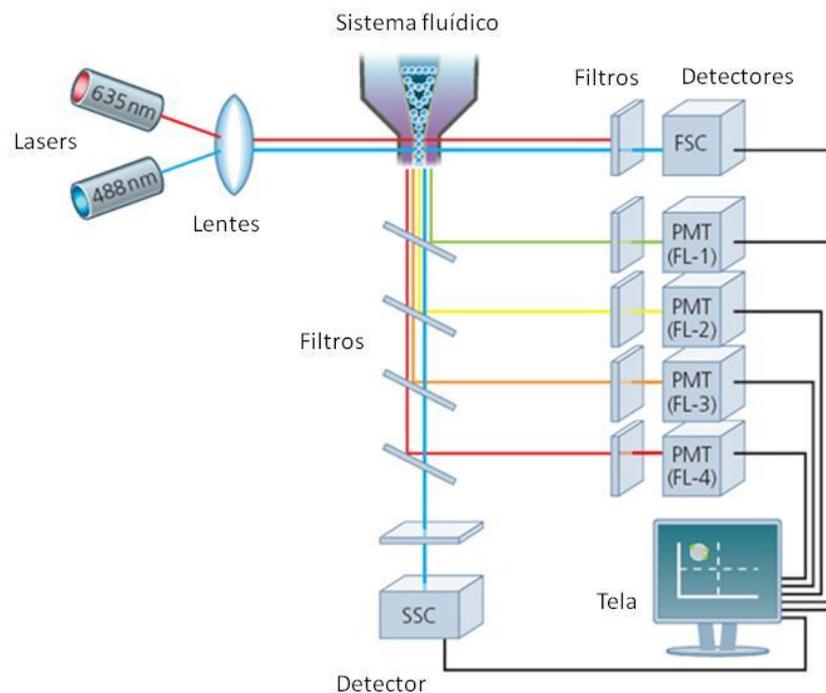
1.2 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo pode ser definida como um processo onde características físicas e/ou químicas de células são medidas individualmente, à medida que essas células passam através de um fluxo aquoso contínuo, no interior de uma câmara especial, onde são então interceptadas por um feixe de laser. Podem ser avaliados inúmeros parâmetros entre eles: tamanho e granularidade, conteúdo de DNA, atividade enzimática, integridade de membrana, pH intracelular e expressão de moléculas intracelulares e de superfície. Alguns parâmetros, denominados intrínsecos, não necessitam de reagentes para serem evidenciados como é o caso do tamanho celular, por exemplo. Outros, os parâmetros extrínsecos, necessitam de reagentes fluorescentes para serem mensurados, como, por exemplo, a expressão de determinadas moléculas de superfície (SHAPIRO, 2003). A citometria de fluxo tem sido uma ferramenta bastante utilizada nas diversas áreas da biologia, sendo de fundamental importância na pesquisa básica; no diagnóstico clínico de diversas síndromes hematopoiéticas; no estudo de bactérias, vírus e protozoários; na imunofenotipagem de células em cultura ou de sangue periférico de indivíduos ou animais; em testes farmacopeicos; em testes alternativos à experimentação animal; na microbiologia sanitária e ambiental; na microbiologia de alimentos e etc. (SHAPIRO, 2003; BARTH et al, 2008; WICZLING; AIT-OU DHIA; KRZYZANSKI, 2009; JUNG et al, 2010; BERTHO; FERRAZ, 2013; SOHIER et al, 2014).

Os citômetros de fluxo são equipamentos compostos por uma ou mais fontes de luz (lasers), um sistema ótico com filtros e espelhos, um sistema fluídico e um sistema de fotossensores/eletrônica. Os lasers são responsáveis pela excitação dos fluorocromos. O sistema ótico é composto por filtros e espelhos, que são responsáveis pelo direcionamento da luz emitida pelos fluorocromos e pela dispersão da luz relacionada às características físicas das células, representando o tamanho (dispersão frontal) e a granularidade intracelular (dispersão lateral). O sistema fluídico é formado por um fluxo contínuo de salina, regulado por pressão, que é responsável pelo transporte das células para uma câmara onde as partículas ou células são interceptadas pelo(s) feixe(s) do(s) laser(s). Já os fotossensores (detectores) e os componentes eletrônicos são responsáveis pela detecção dos sinais gerados pelo sistema ótico, conversão dos sinais em pulsos elétricos e

monitoramento/controle do funcionamento do equipamento (BERTHO; FERRAZ, 2013). Hoje existem diversos equipamentos disponíveis no mercado, sendo esses, citômetros analisadores (*bench-top analyzers*) ou citômetros de fluxo separadores de células (*cell sorters*). A medição de cada detector é denominada na citometria de parâmetro, ou seja, *forward scatter* (tamanho), *side scatter* (granularidade) e fluorescência (BERTHO; FERRAZ, 2013). A Figura 3 mostra um desenho esquemático de um citômetro de fluxo, com seus lasers, filtros e lentes, o sistema fluídico, os detectores e sistema eletrônico.

Figura 3 – Desenho esquemático do citômetro de fluxo



Esquema de um citômetro de fluxo com dois lasers: 635nm e 488nm. Ilustrado tanto o seu sistema fluídico quanto o sistema óptico contendo filtros e lentes. Os detectores dos parâmetros SSC, FSC, FL-1 a FL-4 e sistema eletrônico também estão ilustrados. Modificada de <http://www.abdserotec.com>

Na citometria de fluxo tradicional, a imunofenotipagem fornece medidas semiquantitativas da expressão ou não de determinados marcadores ou a sua expressão em alta ou baixa intensidade (RIGATO; BRITO, 2013). Essas medidas

semiquantitativas são evidenciadas através de valores como percentuais, médias e coeficientes de variação de células positivas ou negativas demonstrados em histogramas mono e biparamétricos.

No entanto, recentemente, além da citometria de fluxo tradicional, um novo protocolo citofluorimétrico foi desenvolvido e denominado citometria de fluxo quantitativa (CFQ). A CFQ é definida pela medição calibrada da intensidade de fluorescência de partículas marcadas, podendo ser células ou microesferas, de modo a determinar o número real de fluorocromos (ou conjugados fluorocromos-proteínas) ligados a cada partícula. Tais medições são feitas através da avaliação dos valores de moléculas de fluorocromo solúvel equivalente chamadas de MESF (*Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome*), expressas pelo número de moléculas de fluorocromos na solução, necessárias para produzir a mesma intensidade de fluorescência medidas na partícula marcada (HENDERSON et al, 1998; WANG et al, 2002).

Os estudos sobre as MESF se baseiam na equivalência entre o número de fluorocromos em duas soluções onde uma delas é uma suspensão de microesferas marcadas e a outra uma amostra desconhecida (SCHWARTZ et al, 2002; WANG et al, 2002). Desta forma, o valor real de intensidade de fluorescência de uma amostra desconhecida é calculado a partir do momento que as amostras são analisadas nas mesmas condições que os padrões de MESF, sendo estes valores determinados através da extrapolação de uma curva de calibração construída a partir dos padrões de MESF. Uma vez que o citômetro de fluxo esteja calibrado, a análise dos padrões de microesferas permite a construção de uma curva de calibração que relaciona o número do canal do histograma ao valor de MESF. Esta curva pode ser usada para ler os valores de MESF de histogramas de fluorescência de amostras desconhecidas, baseada numa análise canal a canal, ou para caracterizar a intensidade de fluorescência total de uma população usando a média ou a mediana da distribuição. Os mesmos parâmetros do citômetro devem ser mantidos para os padrões e a amostra desconhecida. Qualquer alteração no ganho e/ou na voltagem dos fotomultiplicadores (PMTs) e nos parâmetros de compensação requer nova curva de calibração (VOGT et al, 2000).

Diversos trabalhos têm utilizado a CFQ como ferramenta de estudo nas diversas áreas de pesquisa, terapia e diagnóstico. KAY e colaboradores (2006) demonstraram que a expressão de ZAP-70, uma proteína que tem sido apontada como um marcador do prognóstico da leucemia linfocítica crônica, pode ser avaliada pela CFQ e que os pacientes com altos níveis de ZAP-70 apresentam período mais curto de progressão da doença quando comparados a pacientes com baixa expressão de ZAP-70. Além disso, a CFQ é capaz de fornecer dados mais específicos e reprodutíveis, tornando a análise de ZAP-70 mais eficiente. CHAN e colaboradores (2007) descreveram um protocolo para avaliação dos níveis de CD20 na superfície de linfócitos B após terapia com o anticorpo monoclonal Rituximab. De fato, o tratamento efetivo com este anticorpo mascara a expressão de CD20. Os autores propõem que a qualificação dos níveis de CD20 pela CFQ poderia ajudar a determinar a eficácia da terapia e dar subsídios para a escolha da dose e esquema da terapia. Já WANG e colaboradores (2006), comparando células B normais às células B de pacientes com leucemia crônica linfocítica, demonstraram que a expressão de CD20 pode ser quantificada pela CFQ utilizando a expressão de CD4 como calibrador biológico. MOBAREZ e colaboradores (2010) descreveram um método para avaliação de micropartículas originárias de plaquetas através da CFQ. Os autores discutem que os métodos existentes para o estudo dessas micropartículas não apresentam padronização tornando a comparação entre estudos muito difícil e que o estudo de MESF apresentou uma queda considerável da variabilidade quando comparado ao método tradicional de registro do número de micropartículas. Além disso, a CFQ possibilitou a comparação dos resultados entre instrumentos e laboratórios diferentes. ISHIDA e colaboradores (2010) utilizaram a CFQ para avaliar os títulos de anticorpo anti-HLA (anticorpo contra antígeno de leucócito humano) em indivíduos submetidos a transplante de rim e demonstraram que pacientes com valores de MESF altos (acima de 3000) para anticorpos específicos do doador, apresentaram alta incidência de rejeição mediada por anticorpo, enquanto os pacientes com níveis de MESF abaixo de 3000 não apresentaram rejeição. Desta forma, a CFQ pode fornecer dados mais precisos para avaliação de rejeição de enxertos antes de transplantes de rim. GRITZAPIS e colaboradores (2003) desenvolveram um método para detectar e quantificar receptores de estrogênio e progesterona em linhagens de tumores de mama, o que pode ser útil no desenho de protocolos clínicos de tratamento. Em 1997, LIU e

colaboradores demonstraram níveis mais elevados da expressão de CD38 em células CD8⁺ de pacientes HIV⁺ associados ao risco de progressão para AIDS e sugeriram que o CD38 poderia ser um marcador útil no acompanhamento clínico de pessoas HIV⁺.

Em suma, as aplicações da CFQ percorrem desde o estudo de respostas imunes a biofármacos, expressão de antígenos de superfície em células de indivíduos HIV⁺ ou pacientes portadores de leucemias a calibração e verificação da linearidade dos equipamentos (MITTAG; TÁRNOK, 2009). Existem diferentes técnicas propostas para esta avaliação quantitativa, cada uma tendo seus problemas e melhorias a serem alcançadas, apontando sempre para a necessidade de uma padronização no que diz respeito aos instrumentos, reagentes (anticorpos e microesferas) e células a serem estudadas (GRATAMA et al, 1998; WANG et al, 2008).

A utilização de microesferas acopladas a diferentes ligantes como anticorpos, antígenos, citocinas, produtos de PCR e reações enzimáticas para a detecção de reações multiteste por citometria de fluxo tem sido largamente descrita (KELLAR; IANNONE, 2002). A presença de propriedades como faixas de tamanho, estabilidade, uniformidade e capacidade de absorver e reter corantes fluorescentes fez com que essas partículas fossem rapidamente adaptadas para o estudo de reações multiteste por citometria de fluxo. Entre alguns trabalhos, podemos citar o estudo de JANI e colaboradores (2002) que discute o impacto que a utilização de ensaios multiteste com microesferas acopladas a antígenos poderia ter no diagnóstico e acompanhamento de doenças infecciosas em países pobres. Nesse contexto, as vantagens da citometria de fluxo como alta capacidade de processamento, possibilidade de quantificação, necessidade de pequeno volume de amostra, alta reprodutibilidade, alta sensibilidade associada à capacidade de realizar múltiplos testes simultaneamente tornaria o processo diagnóstico mais rápido e barato. Ensaios baseados em microesferas utilizando a citometria de fluxo podem ser mais sensíveis que imunoenaios tradicionais, mais baratos devido à redução de custos com o tempo de realização, consumíveis e custo do ensaio, mais rápidos através da utilização de anticorpos de alta afinidade, quantitativos e reproduzíveis (JANI et al, 2002). Recentemente, SOUSA e colaboradores (2013) desenvolveram um ensaio sorológico utilizando antígenos recombinantes de *Leishmania* acoplados

a microesferas e citometria de fluxo. O ensaio aumentou o desempenho do diagnóstico sorológico de leishmaniose canina, pois foi capaz de detectar animais infectados que eram soronegativos nos testes sorológicos convencionais.

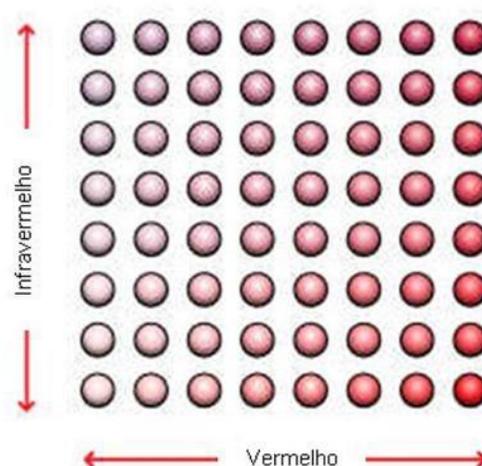
As três tecnologias mais utilizadas para ensaios baseados em microesferas são Luminex xMAP (Luminex, TX, USA), CBA (*cytometric bead array*, Becton & Dickinson – BD, CA, USA) e VeraCodeTM/ BeadXpress (Illumina, CA, USA) cada uma com características específicas quanto ao tamanho e composição das microesferas, tipo de processo de conjugação a sua superfície, detecção de fluorescência, capacidade multiteste e aplicações (HSU; JOOS; KOGA, 2009). As três tecnologias apresentam equipamentos específicos para a leitura das reações, mas as microesferas da Luminex xMAP e CBA podem ser avaliadas também por citômetros de fluxo tradicionais desde que esses equipamentos apresentem lasers com comprimentos de onda entre 488 nm e 635 nm para a excitação dos fluorocromos de identificação das microesferas e dos conjugados reveladores das reações.

1.3 IMUNOENSAIOS BASEADOS EM MICROARRANJOS

Os imunoenaios do tipo multiteste foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar as informações médicas diagnósticas e prognósticas por meio de estratégias de detecção de múltiplos alvos em uma mesma amostra, aliando miniaturização e paralelismo em um único poço. Assim como os ensaios individualizados, cujo maior representante é o ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*, os multitestes se baseiam na imobilização de proteínas para captura de moléculas em amostras e posterior revelação através de ligantes marcados. Existem duas classes de imunoenaios multiteste: os arranjos sólidos e líquidos (ELLINGTON et al, 2010; YIGITBASI 2012). No primeiro formato, os anticorpos de captura são imobilizados em uma matriz bidimensional (em geral placas ou lâminas) e no segundo os anticorpos são ligados a diferentes microesferas (beads). Os ensaios de microarranjos líquidos também são conhecidos como ensaios em suspensão, baseados em microesferas ou MBAA - *multiplex bead array assays* (HSU; JOOS; KOGA, 2009; ELLINGTON et al, 2010; YIGITBASI, 2012).

As reações de microarranjos líquidos se baseiam na utilização de microesferas fluorescentes de poliestireno, magnéticas ou não, com diferentes tamanhos, como suporte para moléculas de captura. As microesferas podem apresentar grupos funcionais capazes de propiciar acoplamentos de proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos e polissacarídeos (KELLAR, IANNONE, 2002). No caso da tecnologia Luminex xMAP, cada microesfera apresenta proporções distintas de dois corantes fluorescentes, um vermelho e outro infravermelho. A combinação de dez diferentes intensidades desses dois corantes fornece 100 códigos diferentes de microesferas. A Figura 4 mostra o esquema dos possíveis códigos de microesferas disponíveis de acordo com as combinações de intensidades dos dois corantes. Os corantes são excitados por um laser 635 nm que emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda, tornando sua identificação possível. Além disso, a partícula é excitada também por um laser de 532 nm, o qual excita a molécula reveladora que pode ser um antígeno ou um anticorpo ligado a outro fluorocromo, como PE, por exemplo (HSU; JOOS; KOGA, 2009).

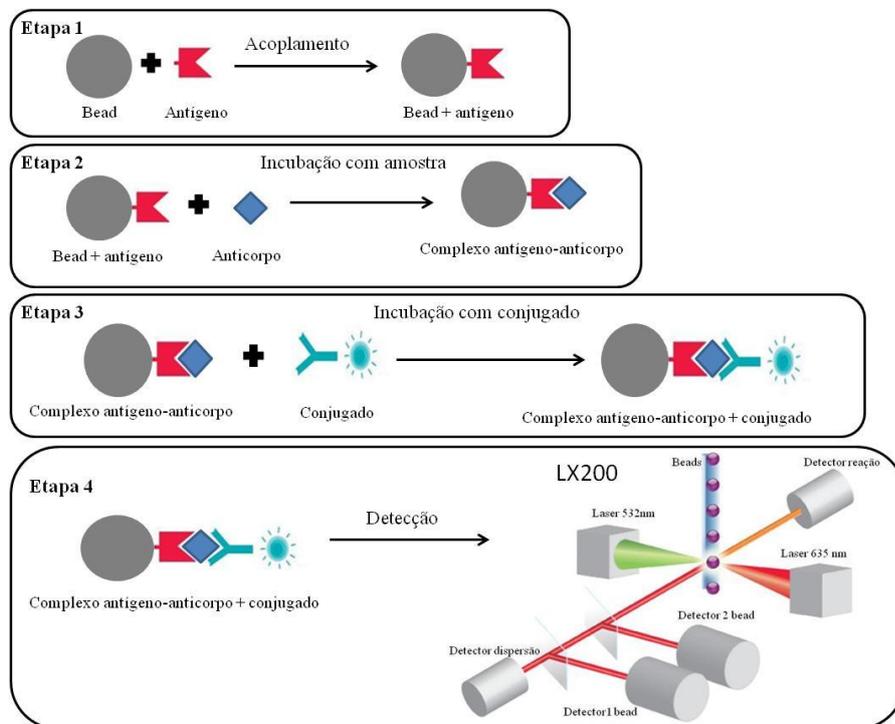
Figura 4 – Padrão de identificação das microesferas da Luminex



Desenho esquemático das microesferas de acordo com as intensidades do corante vermelho (eixo X) e do corante infravermelho (eixo Y). Cada círculo representa um código de microesfera de acordo com as diferentes intensidades dos corantes vermelho e infravermelho, fornecendo uma identificação única para cada código que será reconhecida pelo equipamento LX200. Fonte: Modificada de <http://www.luminexcorp.com>.

A Figura 5 mostra o esquema básico de uma reação para detecção de anticorpos em uma amostra utilizando microesferas acopladas com um antígeno específico. Em resumo, para a realização dos ensaios, cada grupo de microesferas é acoplado a uma molécula de captura específica (etapa 1) e, posteriormente, exposto ao soro de um indivíduo ou sobrenadante de cultura contendo a molécula-alvo a ser detectada, que pode ser, por exemplo, um anticorpo ou um antígeno. Se a molécula-alvo estiver presente no soro ou sobrenadante, esta se ligará especificamente às moléculas de captura acopladas às microesferas (etapa 2). A ligação será revelada pela utilização de um anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo (etapa 3). Se não houver a formação do complexo antígeno-anticorpo (etapa 2), não haverá formação do complexo antígeno-anticorpo + conjugado (etapa 3) e a reação será negativa, ou seja, não haverá fluorescência do conjugado a ser detectada pelo detector de reação (etapa 4).

Figura 5 – Etapas da reação microarranjos líquidos



Etapa 1: acoplamento; etapa 2: formação antígeno anticorpo; etapa 3: revelação com o conjugado; etapa 4: detecção. LX200: fluxo de microesferas (beads), os lasers verde (532 nm) e vermelho (635 nm), detectores de fluorescências 1 e 2 das beads (detector 1 e 2 bead), detector da reação e detector de dispersão. Fonte: Modificada de <http://www.ebioscience.com>.

Os microarranjos líquidos são ideais para a avaliação de dezenas de alvos em uma única amostra. Nos últimos anos, essa tecnologia vem sendo cada vez mais utilizada e os inúmeros trabalhos publicados demonstram a habilidade dessa plataforma para a detecção dos mais variados analitos e a forte tendência em direção à sua adoção como método diagnóstico nos mais variados temas, como por exemplo: HLA para transplantes, leucemias crônicas, diagnóstico microbiológico e alergias (VIGNALI, 2000; KELLAR; IANNONE, 2002; KAY et al, 2006; TAIT et al, 2009; HSU; JOOS; KOGA, 2009; ISHIDA et. al., 2010; YIGITBASI, 2012; TIGHE et al, 2013).

Diferentes grupos de pesquisa têm comparado o desempenho de ensaios em formato multiteste com os tradicionais ELISA e demonstrado as vantagens de sua utilização, relacionadas à capacidade multiteste, à reprodutibilidade, simplicidade, sensibilidade e à substancial redução de custos e de volume da amostra analisada (VIGNALI, 2000; ELSHAL; MCCOY, 2006; KINGSMORE, 2006; LENG et al, 2008; TIGHE, 2013). Apesar das vantagens, os ensaios multitestes necessitam de validação rigorosa da configuração do ensaio e de seu desempenho. Neste contexto, a seleção e imobilização dos ligantes às microesferas, a calibração do ensaio, a determinação dos períodos de incubação, a redução de reação cruzada entre os ensaios e a ligação inespecífica de proteínas são fatores importantes que devem ser determinados para assegurar um bom desempenho do ensaio multiteste (ELLINGTON et al, 2010).

1.4 CONTROLE DE QUALIDADE

A padronização de métodos e o desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade para protocolos de citometria de fluxo vêm sendo discutidos há algum tempo. No caso de laboratórios hematológicos, por exemplo, a citometria de fluxo substituiu muitos testes laboratoriais convencionais devido a maior acurácia, sensibilidade e rapidez dos testes citofluorimétricos em relação aos tradicionais. Entretanto, são observadas discrepâncias em alguns resultados devido à falta de protocolos não padronizados e controle de qualidade adequado. Entre os importantes aspectos a serem controlados estão o desempenho dos equipamentos e os reagentes, em particular, os anticorpos monoclonais (D'HAUTCOURT, 1996).

A citometria de fluxo tem sido proposta como uma ferramenta importante no estudo de protocolos de controle de qualidade, na área de processos e/ ou produtos da indústria de alimentos (COMAS-RIU; RIUS, 2009; SOHIER et al, 2014), de produtos imunoterápicos para câncer (RANDLEV et al, 2010), de avaliação de potência para eritropoietina (WEI et al, 2007; BARTH et al, 2008) e de protocolos e ensaios em laboratórios clínicos (CAREY; OLDAKER, 2007; LYSÁK et al, 2010). Diversos estudos têm apontado para a necessidade de desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e da importância de programas de qualidade para obtenção de resultados satisfatórios nos laboratórios clínicos (LYSÁK et al, 2010), necessidades essas que são compartilhadas com outras áreas como produção e controle de qualidade de processos e insumos, inclusive em órgãos de vigilância sanitária responsáveis por analisar produtos para a saúde e seus processos de fabricação.

Assim como os protocolos de citometria de fluxo, os imunoenaios baseados em microarranjos líquidos necessitam de controle de qualidade para sua validação. Ainda existem poucos materiais e procedimentos para o controle de qualidade dos ensaios na plataforma de microarranjos líquidos, havendo a necessidade de desenvolvimento de validações e controles de qualidade adequados para que esta tecnologia alcance o mercado diagnóstico *in vitro* (ELLINGTON et al, 2010). Neste contexto, a citometria de fluxo pode ser uma importante ferramenta para avaliar materiais e processos utilizados nas reações de microarranjos líquidos já que ambas são capazes de realizar estudos baseados em microesferas (VIGNALI, 2000; KELLAR; IANNONE, 2002; HSU; JOOS; KOGA, 2009; TIGHE et al, 2013). Essas microesferas têm sido ferramentas importantes para a citometria de fluxo apresentando aplicações tanto na avaliação de linearidade e sensibilidade de equipamentos como na avaliação de número de células e determinação de MESF. Para cada aplicação existem vários tipos de microesferas e fabricantes (MITTAG; TÁRNOK, 2009). Desta forma, a utilização de microesferas e citometria de fluxo associadas aos ensaios de microarranjos líquidos podem fornecer dados complementares importantes podendo servir como parâmetros de aceitabilidade e acompanhamento dos insumos e/ou processos.

1.5 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

No contexto da Vigilância Sanitária, as medidas de controle de qualidade devem garantir a produção de lotes de medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e correlatos, produtos de higiene, cosméticos, perfumes, saneantes domissanitários e produtos destinados à correção estética e outros que satisfaçam às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade (Brasil, 1976). Embora a lei 6360/76 (Brasil, 1976) determine que sejam aplicadas medidas de controle que verifiquem a qualidade das matérias-primas ou substâncias, tal garantia, algumas vezes, não pode ser 100% assegurada apenas com as metodologias convencionais já estabelecidas. A utilização de metodologias mais modernas é um importante avanço para o desenvolvimento de técnicas com maior sensibilidade para controle de qualidade de produtos e processos, e desta forma, contribui para a garantia de qualidade dos produtos oferecidos à população. A introdução de novas metodologias nessa área tem uma posição de destaque, visto que cada vez mais, encontramos novos produtos sendo lançados no mercado com tecnologias de ponta e sem protocolos de análise de controle de qualidade adequados para tais avaliações.

O desenvolvimento de ferramentas de controle de qualidade utilizando a citometria de fluxo traz uma importante contribuição para a avaliação de insumos e processos visto que essa tecnologia apresenta grande aplicabilidade, alta sensibilidade e acurácia. Insumos como antígenos e conjugados bem como processos relacionados à conjugação de anticorpos a fluorocromos, além de reações imunológicas realizadas em kits de diagnóstico podem ser facilmente avaliadas por essa tecnologia. Essa avaliação pode ser aplicada durante o desenvolvimento do produto, durante os processos de registro desses novos produtos junto à ANVISA bem como no controle de qualidade posterior, através de análises de controle e/ou fiscais desses produtos. O desenvolvimento de novas ferramentas de controle de qualidade contribui, de forma significativa, com o sistema de vigilância através da introdução de novas tecnologias de controle de qualidade que poderão assegurar, com eficiência e reprodutibilidade, a segurança e eficácia dos produtos para saúde desenvolvidos e/ou testados em nossa instituição, consolidando a importância da citometria de fluxo nos estudos de controle de qualidade, estudos estes pouco desenvolvidos na FIOCRUZ.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver métodos citofluorimétricos para avaliação de anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos e de processos de acoplamento de anticorpos e/ ou antígenos a microesferas, para que possam ser aplicados nos projetos em desenvolvimento na FIOCRUZ.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método citofluorimétrico para avaliação da eficiência dos processos de acoplamento de microesferas a antígenos e anticorpos que possa ser utilizado como parâmetro de controle de qualidade desses processos.

- Desenvolver um método de CFQ para avaliação dos conjugados ligados ao fluorocromo PE.

- Determinar a eficiência da citometria de fluxo tradicional e da CFQ como controle de qualidade de conjugados (avaliação de diferenças lote a lote e de conjugados de fabricantes diferentes).

- Verificar a aplicabilidade dos métodos citofluorimétricos como parâmetro de acompanhamento da estabilidade dos conjugados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS E REAGENTES

3.1.1 Microesferas, conjugados e antígenos

Foram utilizadas microesferas magnéticas (xMAP®, Luminex) de diferentes números de identificação (012, 027, 035, 065, 070), acopladas ao anticorpo de cabra anti-IgG humana ligado à ficoeritrina (anti-IgG-PE); ao anticorpo contra o antígeno de superfície da hepatite B ligado à ficoeritrina (anti-HBSAg-PE); ou aos antígenos específicos a doenças infecciosas e parasitárias. Cada número de identificação representa uma população de microesfera com intensidades diferentes de dois corantes internos fornecendo uma identidade específica para cada população, tornando possível a realização de ensaios múltiplos em um único poço. Os lotes testados de microesferas foram: 012- B18738, 027- B23910, 035- B18308 e B21752, 039- B20966, 065- B15928 e B22601, 070- B18006. Para os acoplamentos de anticorpos às microesferas foram empregados os códigos 012, 027, 065 e 070 e para os acoplamentos de antígenos o código 035. Foram avaliados seis conjugados anti-IgG-PE diferentes, sendo quatro lotes de um fabricante (A1, A2, A3 e A4) e dois lotes de outro fabricante (B1 e B2). Quanto aos conjugados anti-HBSAg-PE, foram testados dois anticorpos de fabricantes diferentes (C e D). Em relação aos antígenos, foram estudados os seguintes antígenos: *Trypanossoma cruzi* (AgTc), vírus da imunodeficiência humana (AgHIV), vírus linfotrópico da célula humana (AgHTLV), *Treponema pallidum* (AgTp), vírus da hepatite C (AgHCV) e vírus da hepatite B (AgHBV). No caso dos antígenos de *Trypanossoma cruzi*, foram estudados dois antígenos diferentes AgTc1 e AgTc2. Com exceção do AgTc2, todos os antígenos utilizados são proteínas recombinantes. Os antígenos e os fabricantes não foram identificados por questões de sigilo, visto que esses insumos são componentes de um kit em desenvolvimento em Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ com acordo de sigilo firmado.

3.1.2 Soros

Foram obtidas amostras de soros provenientes de painéis sorológicos reagentes para *Trypanosoma cruzi*, HIV, HLTV, *Treponema pallidum*, HCV e HBV. Os painéis sorológicos fazem parte do portfólio de produtos de Bio-Manguinhos e são produzidos para atender às demandas do Ministério da Saúde, através de convênios que permitem sua distribuição para os laboratórios e hemocentros da rede pública. Esses produtos se destinam a programas de controle de qualidade ou avaliação externa de qualidade (AEQ).

Alíquotas de soros reagentes para os antígenos acima foram separadas e estocadas a -20 °C até o momento de uso. O volume separado para cada soro foi o suficiente para realização de duas reações, de modo que a alíquota não sofresse mais que dois ciclos de descongelamento. O mesmo soro reagente para AgTc, AgHIV, AgHTLV, AgTp, AgHCV e AgHBV foi utilizado para a avaliação de cada antígeno durante os 18 meses de avaliação.

3.2 ACOPLAMENTO DAS MICROESFERAS

A técnica de acoplamento das microesferas aos antígenos e/ou anticorpos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por FONSECA *et al.* (2011), com algumas alterações, conforme descrito abaixo nos itens 3.2.1 Acoplamento dos antígenos e 3.2.2 Acoplamento dos anticorpos.

3.2.1 Acoplamento dos antígenos

A partir de uma solução estoque de $1,25 \times 10^7$ microesferas/mL, 10^6 microesferas (80 µL) foram distribuídas em placas de 96 poços fundo chato (Nunc) e lavadas com 200µL de água bidestilada. Após a lavagem, foram adicionados 80 µL de tampão bicarbonato de sódio (Merck) (AgsTc, AgHIV, AgHCV, AgHBV) ou tampão MES (AgHTLV e AgTp) (tampão de acoplamento). Para estabilização e ativação das microesferas, foram acrescentados a esse tampão de acoplamento 10 µL de 1-ethyl-3-[3 dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC - Thermo) e 10 µL de N-hidroxysulfosuccimide (sulfo-NHS - Thermo) (tampão de ativação). No

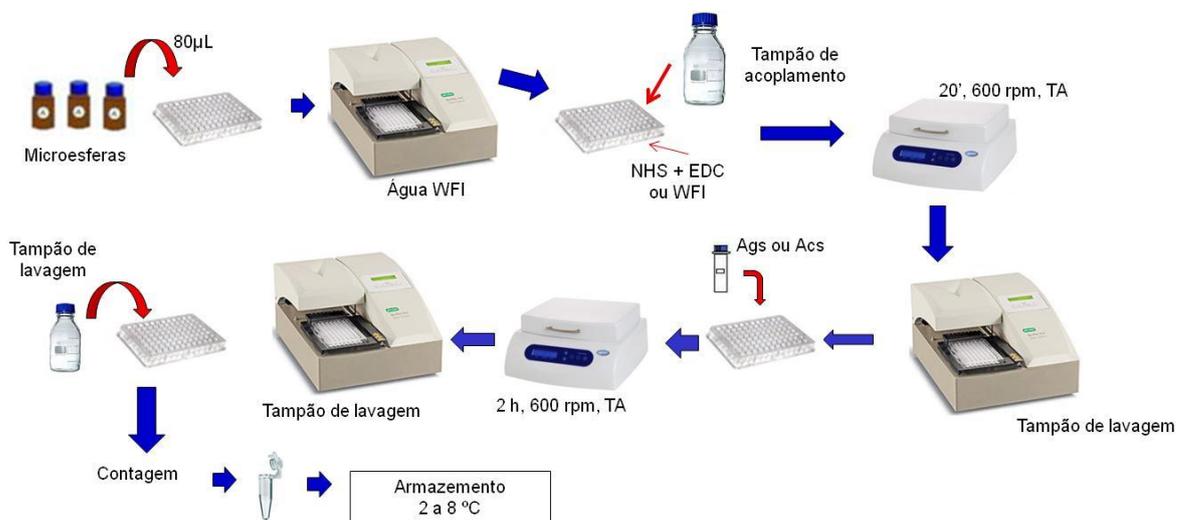
caso das amostras sem EDC/NHS, foram adicionados 20 µL de água WFI (*water for infusion*). Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente e no escuro, foram adicionadas as concentrações de antígenos em um volume final de 100 µL de tampão fosfato (PBS) com Tween 20 (Merck) 0,02%, albumina do soro bovina (BSA) 1% (Amresco) e azida sódica 0,05% (Merck) (PBS+Tween+BSA+NaAz - tampão de lavagem). Esses antígenos foram titulados no processo de padronização dos ensaios da plataforma de microarranjos líquidos no âmbito de um projeto em desenvolvimento em Bio-Manguinhos/ Fiocruz. A suspensão foi incubada por 2 horas em agitação, a temperatura ambiente. Após esta incubação, as microesferas foram lavadas duas vezes com 200 µL de tampão de acoplamento/ lavagem, a concentração ajustada para 10^6 /mL e estocadas em tubos *low binding* de 1,5 mL (USA Scientific), a 2-8°C, protegidas da luz. O volume final das alíquotas variou de acordo com o rendimento da técnica de acoplamento. As microesferas acopladas permaneceram, pelo menos, 24 horas armazenadas antes da realização dos ensaios. Todas as lavagens foram realizadas utilizando lavadora de placas com suporte magnético (HydroFLEX, TECAN) (Figura 6).

3.2.2 Acoplamento dos anticorpos

A partir de uma solução estoque de $1,25 \times 10^7$ microesferas/mL, 10^6 microesferas (80 µL) foram distribuídas em placas de 96 poços fundo chato (Nunc) e lavadas com 200 µL de água bidestilada. Após a lavagem, foram adicionados 80 µL de tampão de lavagem (PBS+Tween+BSA+AzNa) e, para estabilização e ativação das microesferas, foram adicionados 10 µL de EDC e 10 µL de sulfo-NHS (tampão de ativação). Após 20 minutos de incubação, a temperatura ambiente, no escuro, e, após duas lavagens com tampão de lavagem, foram adicionadas as quantidades de anticorpo descritas abaixo em um volume de 100 µL de PBS (tampão de acoplamento). Para anti-IgG-PE foram utilizadas quatro concentrações distintas de acoplamento (0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL) enquanto para os conjugados anti-HBSAg-PE foram avaliadas três diluições distintas de uso (1:3000, 1:1000 e 1:300) a partir de soluções estoque de 1 mg/mL (conjugado C) e 2,7 mg/mL (conjugado D). A suspensão foi incubada por 2 horas em agitação, a temperatura ambiente. Após esta incubação, as microesferas foram lavadas duas

vezes com 200 μL de tampão de lavagem, a concentração ajustada para $10^6/\text{mL}$ e estocadas tubos *low binding* de 1,5 mL, a 2-8 $^{\circ}\text{C}$, protegidas da luz. O volume final das alíquotas variou de acordo com o rendimento da técnica de acoplamento. As microesferas acopladas permaneceram, pelo menos, 24 horas armazenadas antes da realização dos ensaios. Todas as lavagens foram realizadas utilizando lavadora de placas com suporte magnético (HydroFLEX, TECAN) (Figura 6).

Figura 6 – Técnica de acoplamento das microesferas com antígenos ou anticorpos



Adaptado de Souza, 2015.

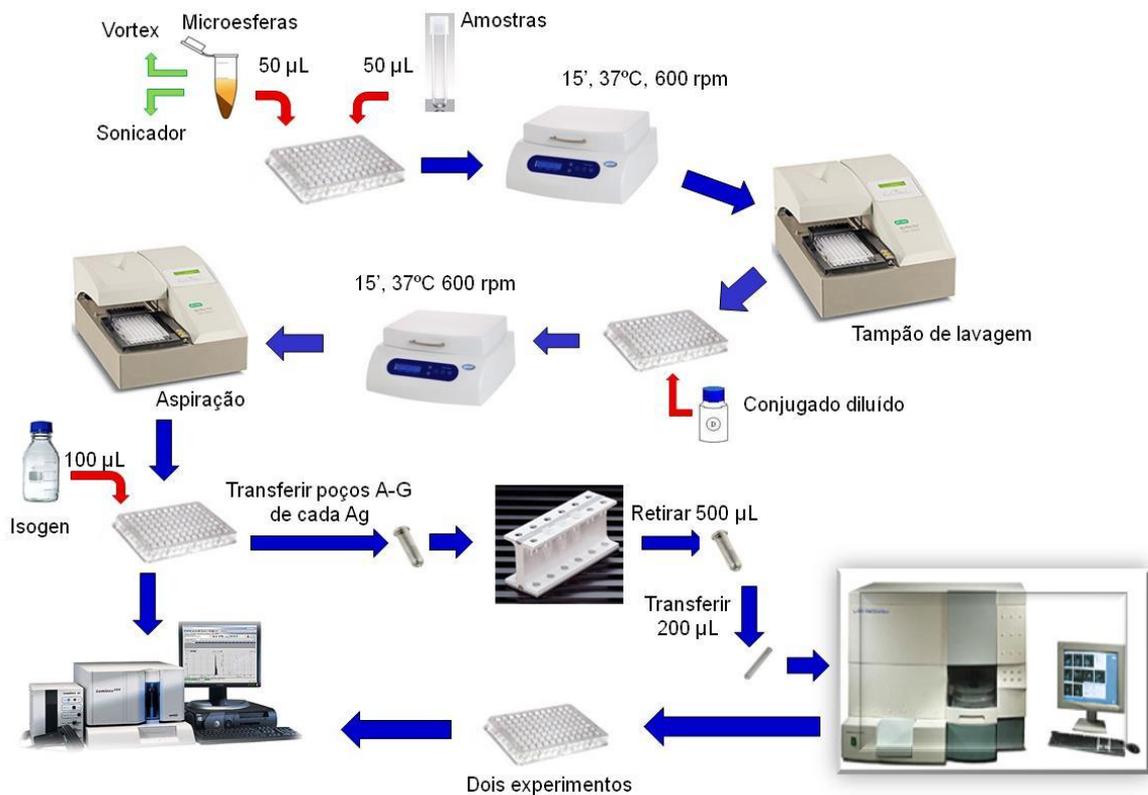
3.3 ENSAIO DE MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTÍGENOS

Em cada poço da placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 50 μL de microesferas acopladas a cada antígeno (2000 microesferas/ poço) e 50 μL da diluição dos soros (1:100). Cada coluna da placa recebeu um antígeno e o soro reagente para aquele antígeno, com exceção das colunas controle. Após uma incubação por 15 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$, sob agitação e ao abrigo da luz, as microesferas foram lavadas duas vezes com 100 μL de tampão de lavagem (PBS+Tween+BSA+NaAz). Após a adição de 100 μL do conjugado anti-IgG-PE (Sigma), na diluição 1:400, as microesferas foram incubadas por 15 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$, sob agitação e ao abrigo da luz. Após esta incubação, o líquido da reação foi aspirado na lavadora de placas e as microesferas foram ressuspensas em 100 μL de

da solução eletrolítica IsoGen (Biotek), tampão utilizado no sistema fluido de citômetros de fluxo composto de sais de sódio, sal de potássio e conservante. O conteúdo dos sete poços de cada antígeno (linhas A-G) foram misturados e colocados em tubos de 2mL (*collection tubes*, Qiagen) para concentração das microesferas em estante de campo magnético (Promega). Após 2 minutos, 500 μ L de IsoGen foram aspirados com pipeta, os tubos retirados da estante magnética e os 200 μ L restantes distribuídos em microtubos de diluição (Scientific Specialities Inc.) para leitura no citômetro.

O poço restante de cada antígeno (fileira H) foi lido no equipamento LX200 (Luminex Corp.), de acordo com as instruções de uso. Os dados obtidos nesse equipamento foram expressos pela mediana de intensidade de fluorescência (MFI). Em dois experimentos, o restante das amostras lidas no citômetro de fluxo foi redistribuído na placa de 96 poços para leitura no LX200 (Figura 7).

Figura 7 – Reação das microesferas acopladas com antígenos



Adaptado de Souza, 2015.

Para cada ponto de avaliação foram feitas duas placas contendo todos os antígenos e condições de acoplamento. Microesferas não acopladas com proteínas, incubadas com soro e com o conjugado anti-IgG-PE (para exclusão da ligação do anticorpo monoclonal na microesfera por adsorção) e microesferas acopladas com cada proteína, sem adição dos soros e com adição de conjugado anti-IgG-PE (*background*) foram utilizadas como controles.

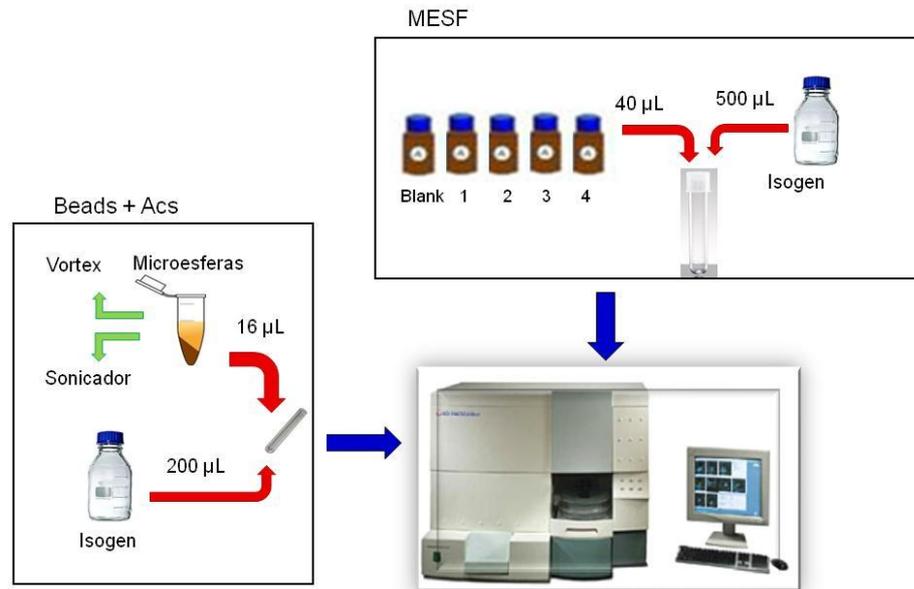
Os pontos de avaliação descritos nos resultados se referem às 18 avaliações mensais realizadas durante o estudo. Os acoplamentos dos antígenos foram avaliados de setembro de 2012 a março de 2014, sendo que a avaliação de maio de 2013 não foi realizada.

3.4 ENSAIO DE MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTICORPOS

As microesferas conjugadas com os anticorpos A1, A2, A3, A4, B1, B2, C e D foram avaliadas diretamente no citômetro de fluxo. Dezesesseis microlitros da solução de cada microesfera acoplada com os anticorpos acima foram distribuídos em microtubos de diluição (Scientific Specialities Inc.) contendo 200 µL de IsoGen por tubo. As amostras foram, então, avaliadas no citômetro de fluxo.

Para a análise pela citometria de fluxo quantitativa (CFQ), além da aquisição das microesferas acopladas com os conjugados, foi medida também a amostra de MESF do kit Quantum R-PE MESF (Bangs Laboratories Inc.). Para tal, uma gota (aproximadamente 40 µL) de cada microesfera do kit (uma microesfera negativa e quatro microesferas positivas) foi adicionada a 500 µL de IsoGen (Biotek) e a amostra avaliada no citômetro de fluxo (Figura 8).

Figura 8 – Avaliação das microesferas acopladas aos anticorpos



Os pontos de avaliação descritos nos resultados se referem às 18 avaliações mensais realizadas durante o estudo. Os acoplamentos dos anticorpos foram avaliados de julho de 2012 a fevereiro de 2014, sendo que as avaliações de julho de 2012 e de maio de 2013 não foram realizadas.

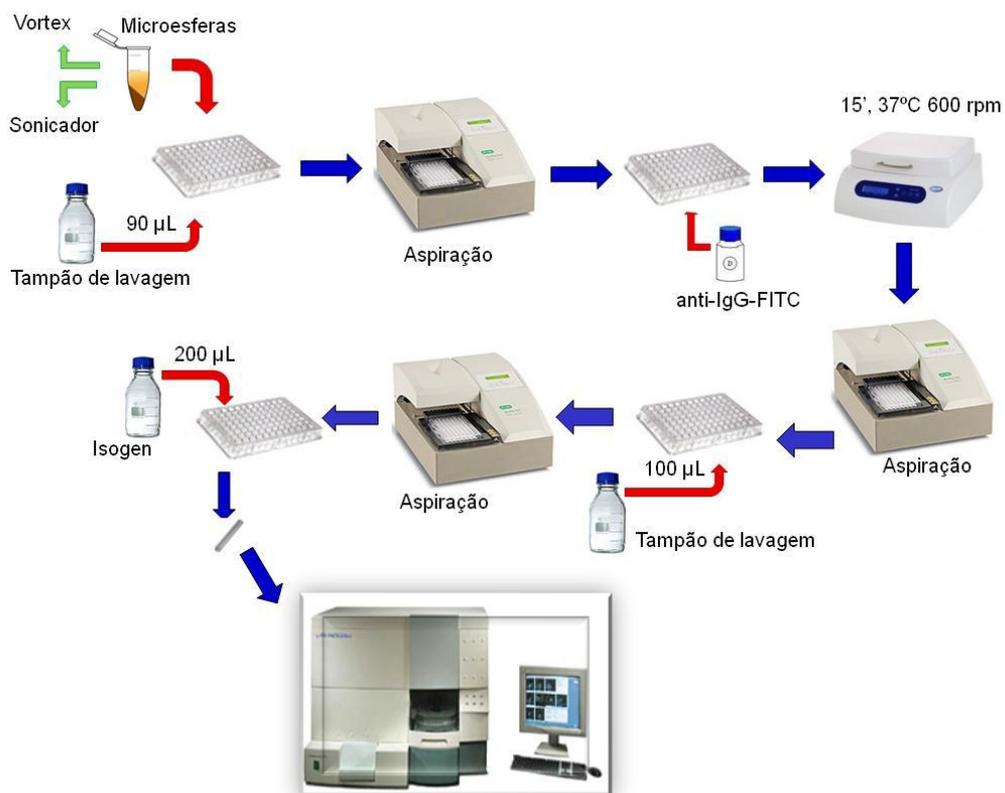
3.5 MARCAÇÃO DAS MICROESFERAS ACOPLADAS A ANTI-IgG-PE COM ANTI-IgG-FITC

Foi realizada uma marcação dos conjugados A1, A2, A3 e A4 acoplados às microesferas (descrita no item 3.2.2) com o anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), denominado de anti-IgG-FITC (Sigma), a fim de controlarmos possíveis quedas de fluorescência ou desacoplamento de antígenos.

Primeiramente, foi realizado um ensaio de titulação do anticorpo anti-IgG-FITC para avaliar qual a melhor concentração de uso para marcação dos conjugados anti-IgG-PE acoplados às microesferas. Para tal, microesferas acopladas com A1 e A4 foram marcadas com as diluições 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:800 e 1:1600 de anti-IgG-FITC. O protocolo de marcação foi o descrito a seguir: 10 µL das microesferas acopladas com A1 ou A4 foram colocadas em poços

da placa de 96 poços de fundo chato e lavadas com 90 μL de tampão de lavagem (PBS+Tween+BSA+NaAz). O tampão foi aspirado e adicionado 100 μL do conjugado anti-IgG-FITC nas diluições descritas acima. As microesferas foram incubadas por 15 minutos, a 37 °C, sob agitação e ao abrigo da luz. A solução foi aspirada e foram adicionados 100 μL de tampão de lavagem e, após nova aspiração, foram adicionados 100 μL de IsoGen. As soluções foram distribuídas nos tubos de diluição e as amostras avaliadas no citômetro de fluxo. Todas as lavagens e aspirações foram realizadas utilizando lavadora de placas com suporte magnético (HydroFLEX, TECAN) (Figura 9).

Figura 9 – Marcação das microesferas com anti-IgG-FITC



Para comprovar que a marcação com anti-IgG-FITC seria capaz de diferenciar entre a queda de fluorescência da PE e a queda do acoplamento dos conjugados anti-IgG-PE, alíquotas das microesferas acopladas aos conjugados A1, A2, A3 e A4 foram deixadas na bancada à temperatura ambiente e na luz para induzir a queda de fluorescência da PE. A queda de intensidade de PE sem a queda

da marcação de FITC demonstraria que a anti-IgG-FITC continuava se ligando a anti-IgG-PE acoplada, mas que o conjugado acoplado às microesferas teve uma queda na intensidade de seu fluorocromo (PE). Uma queda ou ausência da marcação de FITC demonstraria que a anti-IgG-PE não estaria mais acoplada às microesferas ocasionando uma não marcação de FITC.

Os resultados obtidos seguindo o protocolo acima descrito foram comparados às mesmas microesferas que ficaram estocadas a 2-8 °C, protegidas da luz, que apresentariam marcação de FITC e PE inalteradas, ou seja, acoplamento do conjugado anti-IgG-PE e intensidade de fluorescência da PE mantidos. Para tal, após a titulação do conjugado anti-IgG-FITC, ensaios de avaliação da intensidade de fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE e anti-IgG-FITC foram realizados. Com o intuito de mantermos o mesmo número de microesferas do estoque (utilizadas como controle) e de microesferas acopladas, 2 µL de microesferas não acopladas (estoque) foram diluídas em 23 µL de tampão de lavagem. Após a diluição, 10 µL da solução diluída de microesferas não acopladas e 10 µL das microesferas acopladas com A1, A2, A3 e A4, estocadas na bancada ou na geladeira, foram colocadas em poços da placa de 96 poços e foi seguido o procedimento de marcação descrito para o ensaio de titulação. Após a marcação, as soluções foram distribuídas nos tubos de diluição e as amostras avaliadas no citômetro de fluxo.

Como controles, foram feitos poços utilizando microesferas não acopladas incubadas com anti-IgG-FITC ou com tampão de lavagem e microesferas acopladas com A1, A2, A3 e A4 incubadas com tampão de lavagem.

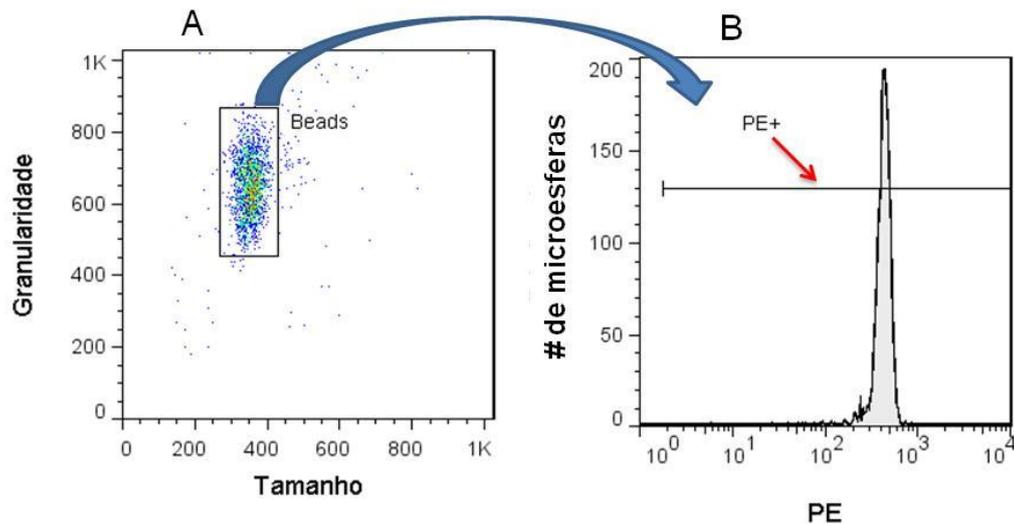
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO

A análise citofluorimétrica foi realizada utilizando o citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton & Dickinson), do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), Bio-Manguinhos, equipado com um laser de argônio (488nm) e um laser diodo vermelho (635nm). O fluorocromo PE foi avaliado no filtro 585/42 e o fluorocromo FITC no filtro 530/30.

O protocolo de aquisição foi realizado utilizando o programa CellQuest do FACSCalibur. Já as análises citofluorimétricas foram realizadas através do software

FlowJo 7.6.1 (Tree Star Inc., USA). As avaliações se basearam nos gráficos de tamanho e granularidade (Figura 10A) e nos gráficos de intensidade de fluorescência para PE (Figura 10B). No *dot plot* de tamanho e granularidade foi criada uma região, ou *gate*, para avaliação da população de microesferas (retângulo identificado como beads, na Figura 10A). Nos histogramas de PE foram criados cursores (PE+, setas em vermelho) para obtenção dos dados numéricos de média geométrica, mediana e coeficiente de variação (CV) (Figura 10B). No caso das avaliações de FITC, foram avaliados os dados numéricos de média geométrica nos histogramas de FITC semelhante ao descrito para PE. As intensidades de PE e FITC foram avaliadas na forma logarítmica (log)

Figura 10 – Modelo de análise pela citometria de fluxo



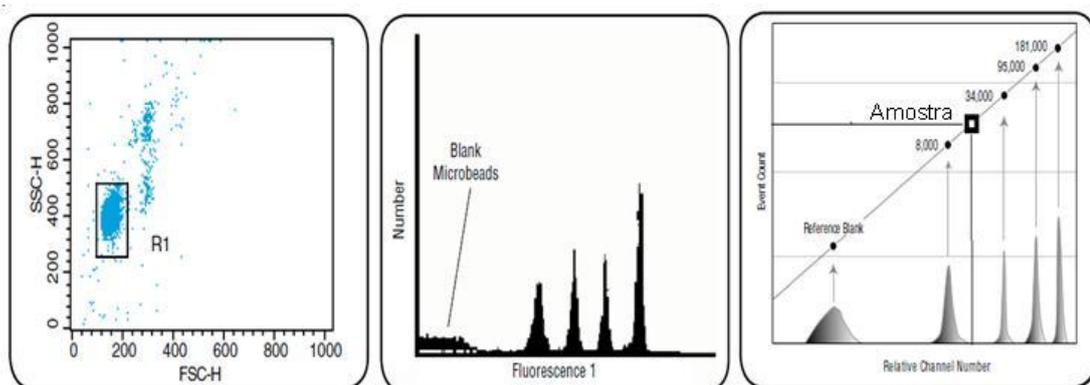
A: *Dot plot* de tamanho (eixo X) vs. granularidade (eixo Y). *Gate* das microesferas (retângulo, beads). B: Histograma de marcação de PE. Eixo X – intensidade de fluorescência em log. Eixo Y – Número de microesferas. PE+ - cursor para avaliação dos dados numéricos.

Para cada amostra foram adquiridos 2000 eventos na região (*gate*) de microesferas excluindo-se desta maneira possíveis contaminantes. Na citometria de fluxo tradicional ou qualitativa, as microesferas acopladas com os antígenos e com os conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE foram avaliadas quanto ao seu perfil de marcação e quanto à marcação de PE (média geométrica, mediana e CV). Como

parte integrante da padronização da metodologia, os parâmetros de voltagem e ganho foram estabelecidos no início dos ensaios, permanecendo os mesmos por todo o estudo. As marcações de anti-IgG-FITC só foram analisadas pela citometria de fluxo tradicional através da avaliação da média geométrica e percentual de marcação para FITC em log.

Na citometria de fluxo quantitativa (CFQ), foi realizada a quantificação da intensidade de fluorescência do fluorocromo PE dos conjugados através da utilização do kit comercial Quantum R-PE MESF (Bangs Laboratories Inc.). Este kit é composto por quatro populações de microesferas marcadas com diferentes intensidades de fluorocromo e uma população negativa. Uma gota de cada população de microesferas do kit (aproximadamente, 40 μ L) foi adicionada a 500 μ L de salina (IsoGen). As microesferas do kit foram adquiridas e o equipamento foi ajustado, em termos de voltagem e ganho, para que as populações ficassem de acordo com as instruções de uso do fabricante (Figura 11). Esta padronização foi realizada no início dos ensaios sendo mantida durante toda a avaliação dos conjugados.

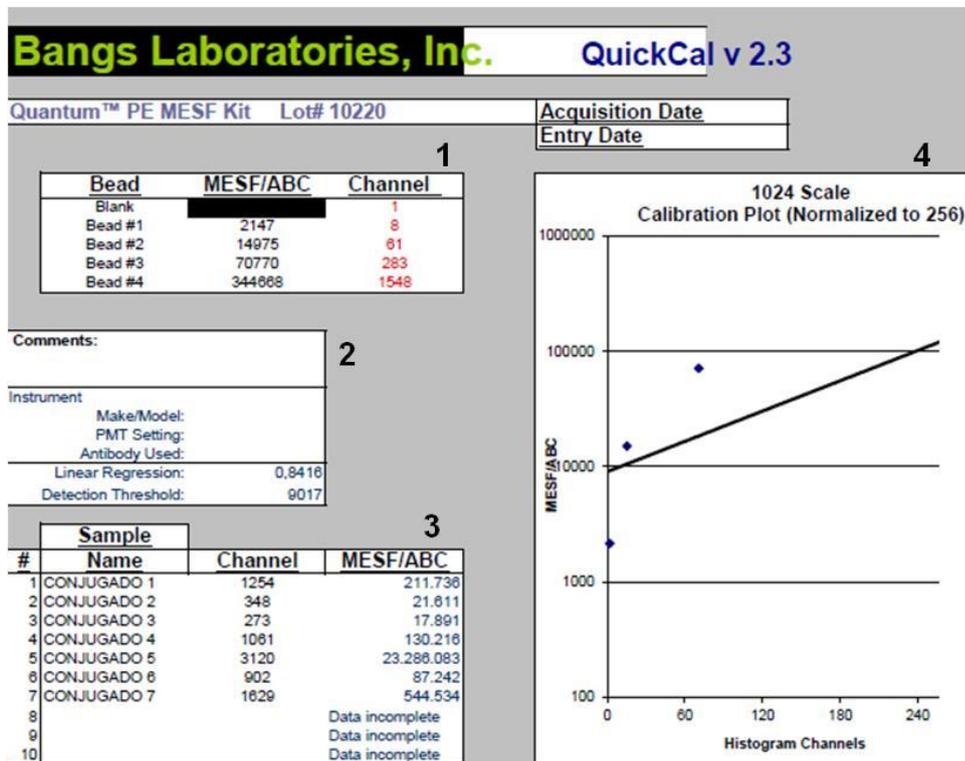
Figura 11 – Gráficos representativos da análise de MESF utilizando o kit Quantum R-PE MESF



Análise de MESF utilizando o kit Quantum R-PE MESF. Modificado das instruções de uso do kit fornecidas pelo fabricante Bangs Laboratories Inc. A: *Dot plot* das microesferas do kit (tamanho no eixo X e granularidade no eixo Y). B: Histogramas da fluorescência (PE) de cada população de microesfera. Figura C: Curva de calibração com a amostra inserida. Adaptado de www.bangslabs.com – QuantumTM R-PE MESF.

Após a aquisição e ajuste do equipamento, as amostras de microesferas acopladas com os conjugados (anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE) foram adquiridas. Os valores das médias geométricas obtidos nos histogramas de PE, para as cinco populações do kit e para cada amostra, foram inseridos no Programa QuickCal Template. Através da curva de calibração obtida com as cinco populações do kit, a quantidade de MESF para PE em cada amostra foi calculada, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Planilha para obtenção dos valores de MESF



Valores de MESF obtidos com o Programa QuickCal Template. 1: Quadro com a coluna *channel* onde devem ser inseridos os valores das médias geométricas das microesferas do kit. 2: Regressão linear feita pelo programa. 3: Quadro com a coluna *channel* onde devem ser inseridos os valores das médias geométricas das amostras identificadas na coluna *sample name*. Na coluna *MESF/ABC* estão os resultados das MESF de cada conjugado calculado pelo programa. 4: Curva de calibração das populações de microesferas do kit e inserção das amostras. Modificado do programa fornecido pela Bangs Laboratories Inc.

3.7 AVALIAÇÃO DOS CONJUGADOS ANTI-IgG-PE POR ESPECTROFOTOMETRIA

Os conjugados A1, A2, A3 e A4 utilizados para os acoplamentos foram avaliados por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro Shimadzu UVmini 1240 (Shimadzu), localizado no LATED, Bio-Manguinhos/ Fiocruz. Para a leitura dos conjugados, alíquotas foram diluídas 1:10 em PBS e as absorbâncias lidas a 280 nm para avaliação de IgG e a 565 nm para avaliação de PE no conjugado.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No item dos acoplamentos das microesferas aos anticorpos (4.1), os resultados de comparação entre as médias geométricas foram avaliados utilizando-se o teste t Student e teste ANOVA. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes. Como ferramenta de aplicação dos testes estatísticos necessários foi utilizado a software Prism 5 (GraphPad, Inc.).

No item dos acoplamentos dos antígenos às microesferas (4.2) e nos ensaios de avaliação de IgG-FITC e comparação entre as citometrias de fluxo quantitativa e tradicional (item 4.1), os resultados foram analisados estatisticamente através do software R 3.2.0, adotando um nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%, empregando os testes de Shapiro-Wilk (teste de normalidade), Mann-Whitney e Wilcoxon.

4 RESULTADOS

Nesta tese foi avaliada a estabilidade tanto de acoplamento quanto de intensidade de fluorescência de microesferas acopladas com conjugados (anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE) e com antígenos por um período de 18 meses através da citometria de fluxo. Para a avaliação das microesferas foi necessária primeiramente uma padronização do citômetro de fluxo, quanto aos parâmetros de voltagem e ganho. Como foram avaliados conjugados com diferenças acentuadas de intensidade de fluorescência, foi necessário ajustar o equipamento de modo que tanto os conjugados mais brilhantes quanto os mais fracos pudessem ser lidos na mesma voltagem. Esta padronização também foi utilizada para a avaliação das microesferas acopladas aos antígenos. Nos ensaios entre as microesferas acopladas com os antígenos e os soros, foi necessária também uma padronização dos soros. Foi realizada uma busca por soros que apresentassem pelo menos uma resposta semelhante em MFI nos ensaios de microarranjos líquidos para que, da mesma forma que os conjugados, todas as amostras pudessem ser avaliadas na mesma padronização do equipamento.

Os resultados estão apresentados em dois blocos distintos que representam a avaliação das microesferas acopladas aos anticorpos (item 4.1) e a avaliação das microesferas acopladas aos antígenos (item 4.2).

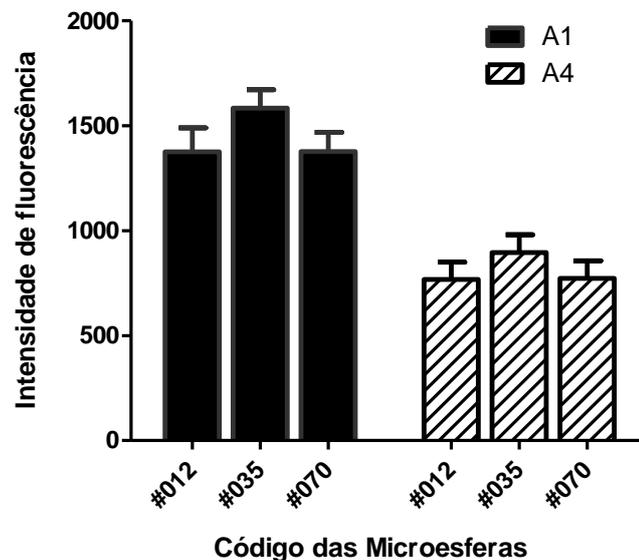
4.1 AVALIAÇÃO DAS MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTICORPOS

4.1.1 Avaliação de diferentes códigos de microesferas

Com o objetivo de avaliar se diferentes códigos de microesferas poderiam interferir na avaliação da intensidade de fluorescência da PE, microesferas dos códigos #012, #035 e #070 foram acopladas com 5µg/mL dos conjugados A1 e A4 e avaliadas pela citometria de fluxo. Estes conjugados foram selecionados para a realização desta etapa do estudo por serem os que tínhamos em maior concentração, sendo também representativos de conjugados que apresentavam

maior (A1) ou menor (A4) intensidades de fluorescência da PE. Os resultados das intensidades de fluorescência, representados pelas médias geométricas, foram semelhantes para A1 e A4 independente do código de microesfera avaliado ($p > 0,05$). Além disso, o conjugado A4 apresentou intensidades de fluorescência menores que as encontradas no conjugado A1, comprovando que, na mesma concentração e condições de acoplamento, o conjugado A1 era mais brilhante que o conjugado A4 (Figura 13). Como não houve diferença na detecção de PE utilizando-se diferentes códigos, nos ensaios subsequentes para avaliação de conjugados acoplados às microesferas, foi utilizado o código em que havia a quantidade suficiente para realização todo o ensaio.

Figura 13 – Avaliação da marcação de anti-IgG-PE em diferentes códigos de microesferas



Médias das intensidades de fluorescência (médias geométricas) \pm desvio padrão observadas nos histogramas de PE das microesferas acopladas com os conjugados anti-IgG-PE A1 e A4, na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Eixo X: código de microesferas. Eixo Y: intensidade de fluorescência. Médias de três avaliações no citômetro de fluxo ($p \leq 0,05$).

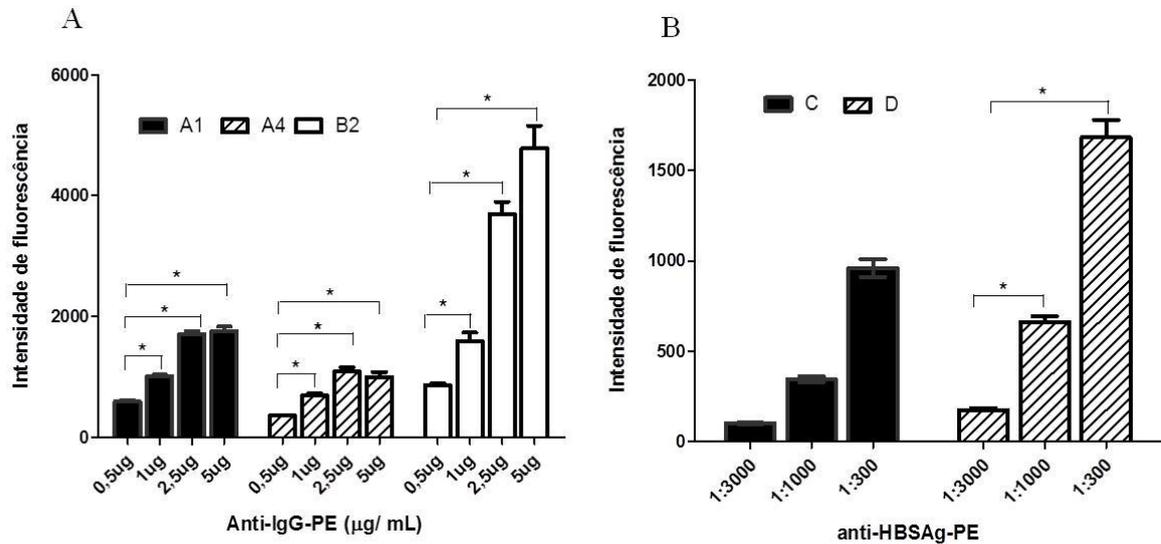
4.1.2 Avaliação de diferentes concentrações e diluições de acoplamento em relação à intensidade de fluorescência e perfil dos histogramas

Para avaliarmos as concentrações e diluições dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE ideais para o acoplamento, as microesferas foram acopladas com diferentes concentrações e diluições de conjugados e avaliadas no citômetro de fluxo. Para tal, os conjugados anti-IgG-PE A1, A4 e B2 foram testados nas concentrações 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5µg/mL enquanto os conjugados anti-HBSAg-PE C e D foram testados nas diluições 1:3000, 1:1000 e 1:300.

Com relação aos conjugados anti-IgG-PE, embora em todas as concentrações estudadas os conjugados tenham apresentado marcação, as médias geométricas das concentrações 1 µg/mL, 1,5 µg/mL e 5µg/mL apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação a menor concentração avaliada de 0,5µg/ mL (Figura 14A).

Com relação aos conjugados anti-HBSAg-PE, foi observado que a diluição 1:300 apresentou uma intensidade significativamente maior quando comparada às diluições 1:1000 e 1:3000 (Figura14B). Observamos, considerando as médias geométricas da intensidade de fluorescência, que as maiores diluições, 1:1000 e 1:3000, apresentaram uma diferença para a diluição de 1:300 de aproximadamente 500 e 1000 vezes menor, respectivamente.

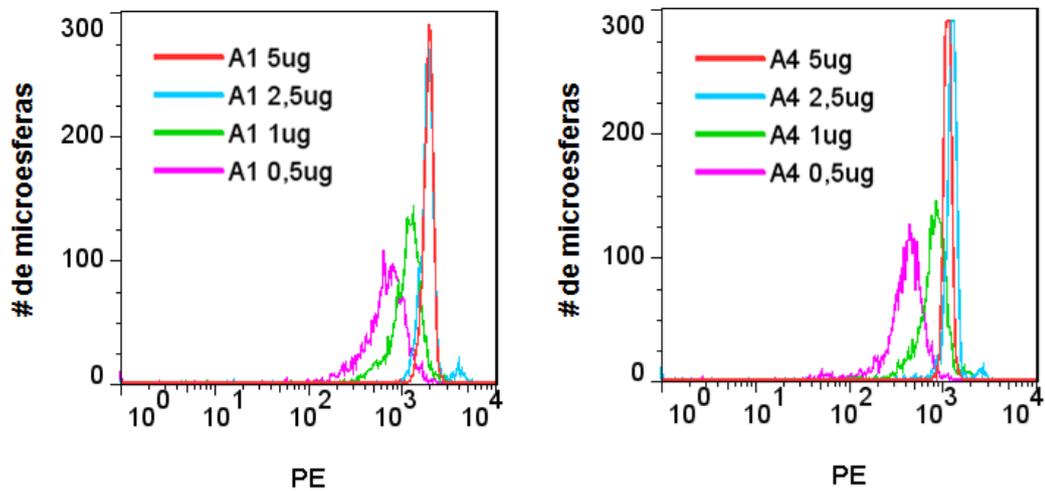
Figura 14 – Avaliação da melhor concentração e diluição de acoplamento dos conjugados às microesferas



Médias dos valores das intensidades de fluorescência (médias geométricas) \pm desvio padrão observadas nos histogramas de PE das microesferas acopladas com os conjugados anti-IgG-PE nas concentrações 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ e anti-HBSAg-PE nas diluições 1:3000, 1:1000 e 1:300. A- conjugados anti-IgG-PE A1, A4 e B2. B – conjugados anti-HBSAg-PE C e D. Médias de três avaliações no citômetro de fluxo (* = $p \leq 0,05$). Teste ANOVA aplicado na comparação entre 5 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para anti-IgG-PE e 1:300 e 1:3000 para anti-HBSAg-PE.

Além dos resultados observados nas intensidades de fluorescência, os perfis de marcação se apresentaram muito mais homogêneos nas concentrações maiores de acoplamento. Esta homogeneidade da intensidade de fluorescência dos conjugados nas maiores concentrações está demonstrada na Figura 15, através dos perfis de marcação dos conjugados A1 e A4, onde foram observados picos mais estreitos nas concentrações maiores de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ quando comparados aos picos encontrados nas concentrações 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$.

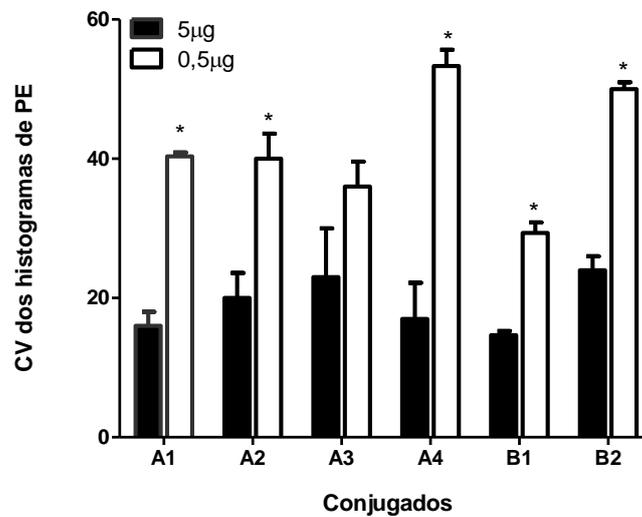
Figura 15 - Histogramas de PE dos conjugados A1 e A4 em diferentes concentrações de acoplamento



Histogramas de fluorescência dos conjugados A1 e A4 nas concentrações 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ obtidos na citometria de fluxo. Eixo X – intensidade de fluorescência de PE. Eixo Y – número de microesferas.

Essa homogeneidade da concentração maior de anti-IgG-PE acoplada, notada nos perfis de marcação, pode ser observada através dos coeficientes de variação (CVs) obtidos nos picos dos histogramas de PE. A Figura 16 mostra as médias dos CVs das marcações de anti-IgG-PE nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$, obtidas em três avaliações no citômetro de fluxo. CVs menores nas condições de acoplamento de 5 $\mu\text{g/mL}$ foram obtidos onde um pico mais estreito foi observado (Figura 15). Esses dados sugerem que a concentração 5 $\mu\text{g/mL}$ de todos conjugados anti-IgG-PE estudados gerou uma condição de acoplamento muito mais homogênea quando comparada às condições obtidas em outras concentrações.

Figura 16 – Coeficientes de variação dos picos de PE dos conjugados anti-IgG-PE

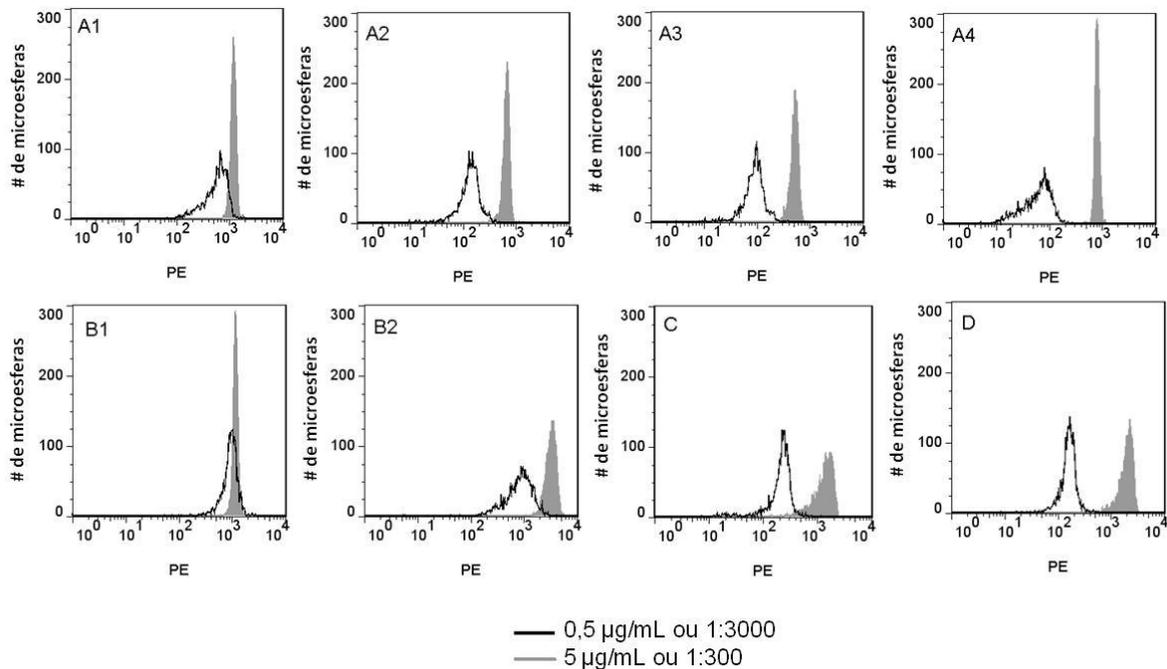


Médias dos coeficientes de variação \pm desvio padrão dos picos de PE observados nos histogramas dos conjugados anti-IgG-PE A1, A2, A3, A4, B1 e B2. Médias de três avaliações no citômetro de fluxo. Teste t Student empregado (*= $p \leq 0,05$).

Na Figura 17 estão ilustrados os perfis de marcação dos conjugados anti-IgG-PE (A1, A2, A3, A4, B1 e B2) nas concentrações 0,5 µg/mL e 5 µg/mL e dos conjugados anti-HBSAg-PE nas diluições 1:3000 e 1:300. Observamos um deslocamento para esquerda nos histogramas da concentração 0,5 µg/mL (A1, A2, A3, A4, B1 e B2) e diluição 1:3000 (C e D) que representou uma queda da intensidade de fluorescência e, conseqüentemente, uma menor marcação dos conjugados acoplados nessa condição em comparação aos conjugados mais concentrados. No caso dos conjugados anti-IgG-PE mais uma vez observamos picos mais estreitos e, conseqüentemente, uma marcação mais homogênea na concentração 5 µg/mL.

No caso dos conjugados anti-HBSAg-PE, o perfil de marcação nesses conjugados, em todas as diluições, se mostrou menos homogêneo que os conjugados anti-IgG-PE, não havendo diferença nos CVs encontrados nas diluições 1:3000, 1:1000 e 1:300 (dados não mostrados). Neste caso, a escolha da melhor concentração se baseou apenas na maior intensidade de marcação encontrada na condição de acoplamento de 1:300 quando comparadas às outras diluições.

Figura 17 – Histogramas dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE acoplados às microesferas



Marcação dos conjugados anti-IgG-PE A1, A2, A3, A4, B1 e B2 nas concentrações 0,5 µg/mL (contorno preto) e 5 µg/mL (em cinza) e dos conjugados anti-HBSAg-PE C e D nas diluições 1:3000 (contorno preto) e 1:300 (em cinza), obtidos na citometria de fluxo. Eixo X – intensidade de fluorescência de PE. Eixo Y – número de microesferas.

No Quadro 2 estão descritas as médias geométricas de PE das microesferas acopladas com as concentrações de 0,5 µg/mL e 5 µg/mL de anti-IgG-PE e com as diluições 1:3000 e 1:300 de anti-HBSAg-PE de um experimento e o percentual de queda dos valores das médias geométricas nessas condições de acoplamento. Todas as médias caíram nas concentrações mais baixas, não havendo qualquer tipo de padrão identificado nessa queda. Destarte, conjugados do mesmo fabricante, mas de lotes diferentes (A1, A2, A3 e A4) apresentaram percentuais de queda bastante variados. O conjugado que apresentou menor queda na intensidade de fluorescência foi o conjugado B1 (22%) com um discreto deslocamento para esquerda do pico de 0,5 µg/mL em relação ao pico de 5 µg/mL (Figura 17). Em contrapartida, o conjugado A4 mostrou o maior índice de queda na intensidade de fluorescência (93%) quando comparadas às condições de acoplamento de 5 µg/mL

e 0,5 µg/mL, demonstrado pelo maior deslocamento para a esquerda do pico do histograma (Figura 17) em relação aos outros conjugados.

Quadro 2 – Médias geométricas e percentuais de queda da intensidade de fluorescência dos conjugados nas condições máximas e mínimas de acoplamento

Conjugados	Concentrações/ diluições		% de queda
	5 µg/mL ou 1: 300	0,5 µg/mL ou 1:3000	
A1	1141	525	54
A2	633	126	81
A3	490	85	83
A4	777	56	93
B1	1105	863	22
B2	3064	772	75
C	1220	196	84
D	1815	152	92

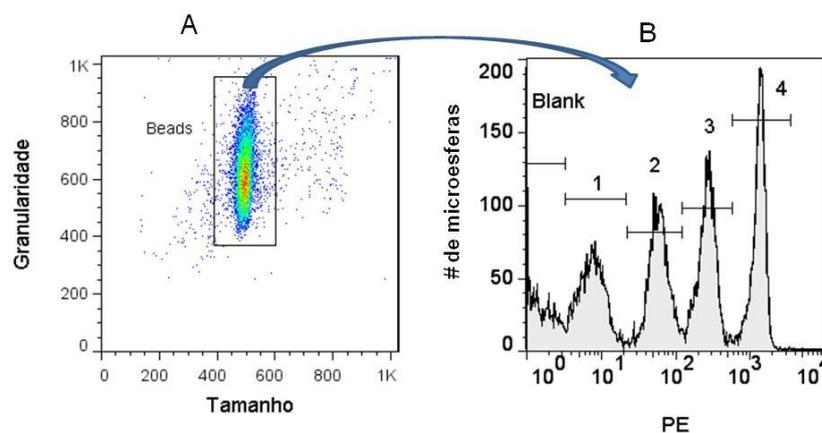
Médias geométricas de PE dos conjugados anti-IgG-PE nas concentrações 5 µg/mL e 0,5 µg/mL e anti-HBSAg-PE nas diluições 1:300 e 1:3000. Percentual de queda comparando os valores das médias geométricas de 5 µg/mL com 0,5 µg/mL e de 1:300 com 1:3000. Em negrito, conjugados com maior (A4) e menor queda (B1) da intensidade de fluorescência. Médias geométricas obtidas em um experimento.

Analisando-se as médias geométricas e os perfis dos histogramas de intensidade de fluorescência, e levando-se em consideração os dados prévios de padronização desses conjugados nos ensaios de microarranjos líquidos, foram escolhidas como melhores condições de acoplamento a concentração de 5 µg/mL para os conjugados anti-IgG-PE e a diluição 1:300 dos conjugados anti-HBSAg-PE. Embora a concentração de 2,5 µg/mL de anti-IgG-PE tenha apresentado resultado similar à concentração de 5 µg/mL, a última foi escolhida para que houvesse a possibilidade de uma aplicação direta dos resultados aqui obtidos com dados gerados no laboratório, utilizando kit diagnóstico que se encontra em desenvolvimento por Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ.

4.1.3 Citometria de fluxo quantitativa (CFQ)

Na Figura 18 está representada a avaliação pela CFQ do kit Quantum R-PE MESF. No *dot plot* (gráfico de pontos) de tamanho e granularidade (Figura 18A) foi identificada a população de microesferas e definido o *gate* (região) de microesferas. As microesferas apresentaram esse perfil de tamanho e granularidade em todo o período de análise, sendo o percentual de microesferas no *gate* sempre superior a 90%. A partir do *gate* de microesferas, foi construído um histograma de marcação de PE e os cursores *blank* (sem fluorescência de PE), 1, 2, 3 e 4 definidos de acordo com cada população de microesfera do kit. Como descrito anteriormente, os parâmetros de voltagem e ganho do equipamento foram estabelecidos de modo que as populações de microesferas apresentassem o perfil ilustrado na Figura 18B. Essa padronização foi mantida durante todo o período do estudo assim como os cursores. O cursor Blank compreende a população negativa e os cursores 1, 2, 3 e 4 as diferentes populações positivas, em ordem crescente de intensidade de fluorescência. As microesferas mantiveram este mesmo perfil durante todo o acompanhamento dos conjugados.

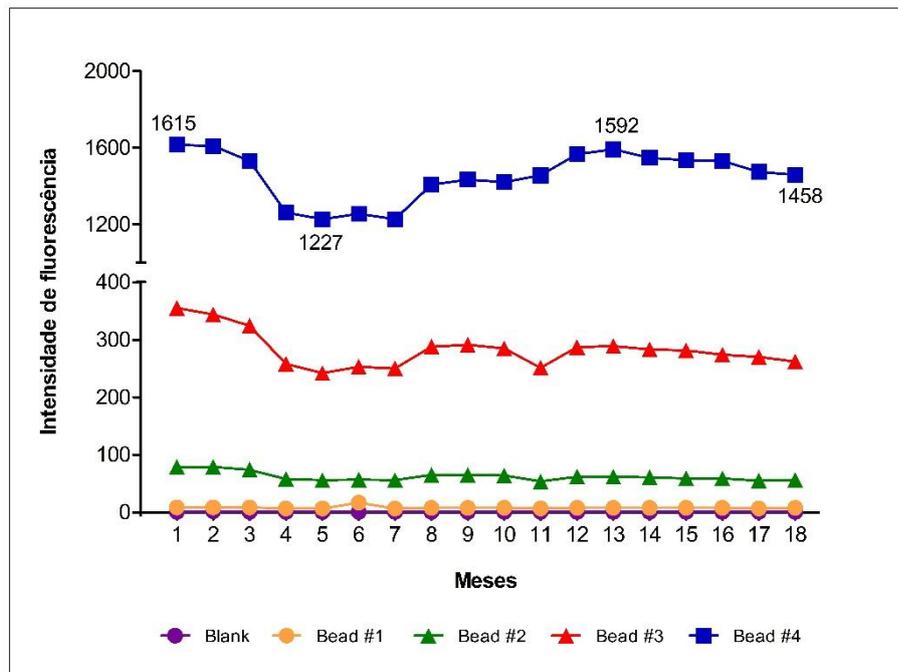
Figura 18 – *Dot plot* e histograma de PE das microesferas do kit Quantum R-PE MESF



Microesferas Quantum R-PE MESF. A- Gráfico de pontos de tamanho (eixo X) e granularidade (eixo Y) com o *gate* de microesferas. B - perfil de intensidade de fluorescência das microesferas. Eixo X - intensidade de fluorescência de PE. Eixo Y - número de microesferas. Cursor Blank – população negativa. Cursores 1, 2, 3 e 4 – populações positivas com diferentes intensidades de PE. Seta indica que os dados da Figura B foram obtidos dentro do *gate* microesferas da Figura A.

A cada ponto de avaliação das microesferas acopladas aos conjugados, o kit Quantum R-PE MESF também foi avaliado. Na Figura 19 estão representadas as médias geométricas encontradas para cada população do kit, em cada ponto de avaliação. Durante os 18 meses de estudo, foi observada uma queda na intensidade de fluorescência entre o quarto e o sétimo mês de avaliação nas populações de microesferas 2 (bead #2), 3 (bead #3) e 4 (bead #4). Na bead #4, que é a população de microesfera com maior quantidade de PE, a média geométrica do primeiro ponto de avaliação foi 1615, caindo para 1262, 1227, 1255 e 1226 nos meses 4, 5, 6 e 7, respectivamente, subindo novamente até 1458 (último ponto de análise).

Figura 19 – Avaliação das microesferas do kit Quantum R-PE MESF

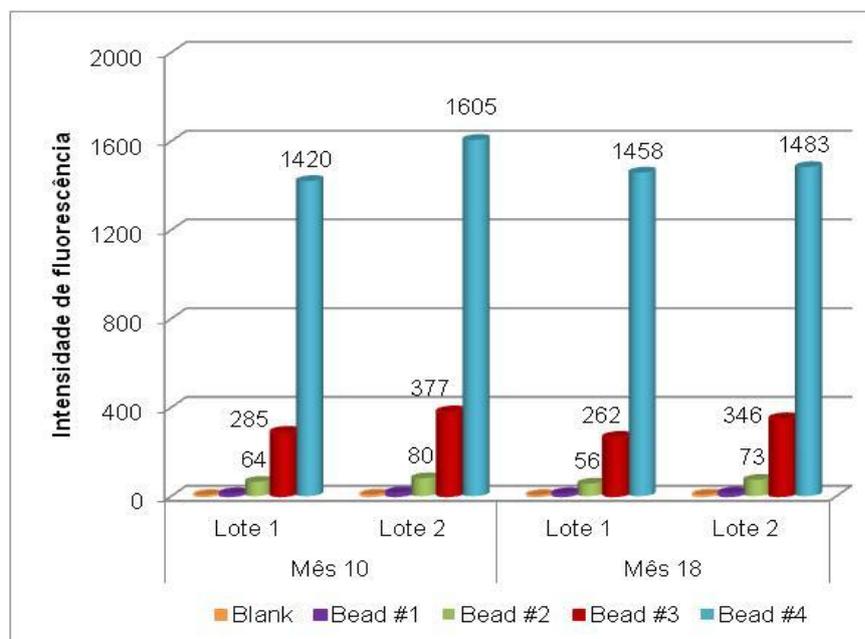


Intensidades de fluorescência das cinco populações de microesferas do kit Quantum R-PE MESF nos 18 meses de avaliação. Blank – população negativa. Bead #1, #2, #3 e #4 – populações positivas com diferentes intensidades de PE. Eixo X - meses de avaliação. Eixo Y: médias geométricas de PE. Valores da média geométrica das microesferas #4 demonstrados em quatro pontos de análise escolhidos aleatoriamente.

Com a chegada de um novo lote do kit Quantum R-PE MESF (lote 2), no 10º mês do estudo, foi realizado um experimento para compararmos as médias geométricas dos dois lotes. Foi verificada uma variação entre os lotes das médias

geométricas de todas as populações de microesferas, sendo os valores sempre maiores no lote 2. A população *blank* teve um aumento da média geométrica de 1 para 3 e a bead #1 que, na maiorias das análises, apresentava média geométrica 8 foi para 12. As populações de microesferas bead #2, bead #3 e bead #4 também apresentaram valores maiores para o lote 2 (Figura 20). Esse resultado é importante visto que os valores das médias geométricas do kit afetam diretamente o cálculo das MESF dos conjugados. Os resultados de MESF dos conjugados foram calculados a partir do lote 1, pois somente este lote estava disponível no início do estudo.

Figura 20 – Avaliação das microesferas do kit Quantum R-PE MESF de diferentes lotes



Intensidades de fluorescência de dois lotes diferentes (lote 1 e lote 2) das microesferas do kit Quantum R-P MESF, no 10^o e 18^o mês de avaliação. Eixo X: lotes 1 e 2, meses 10 e 18. Eixo Y: médias geométricas. Valores de bead #2, bead #3 e bead #4 demonstrados em cima das barras.

4.1.4 Avaliação dos conjugados pela CFQ

Com relação à aplicação da CFQ para avaliação de conjugados, pudemos observar uma grande variação nos valores absolutos de MESF dos conjugados. O Quadro 3 apresenta os valores absolutos de MESF nos meses 1, 5, 8, 11 e 18 de

avaliação (pontos escolhidos ao acaso) para todos os conjugados estudados. Com relação aos conjugados B2 e D os valores de MESF encontrados foram muito elevados porque as médias geométricas desses conjugados ultrapassaram o valor da média geométrica da população de maior intensidade do kit. Sendo assim, esses conjugados não puderam ser avaliados pela CFQ (Quadro 3) e, desta forma, foram retirados da análise de acompanhamento a seguir.

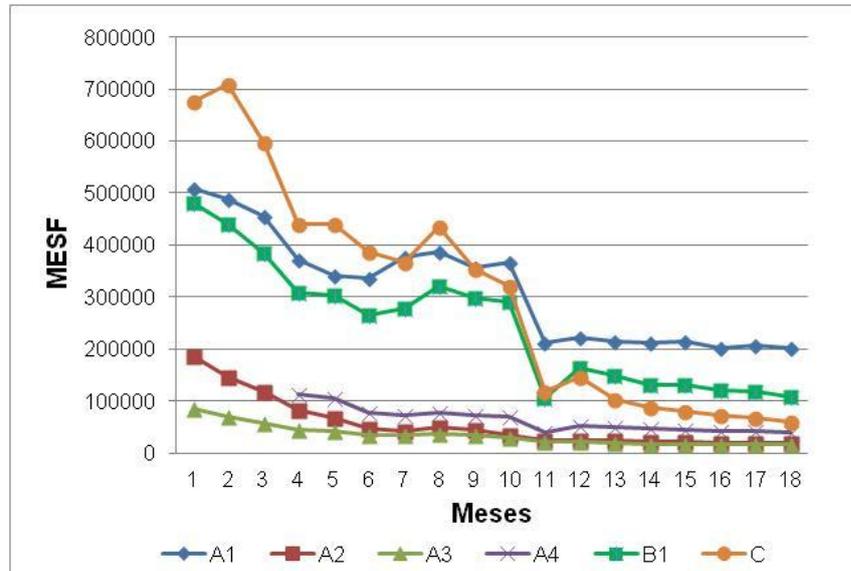
Quadro 3 - Valores absolutos de MESF dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE

Conjugados	Pontos de Avaliação (meses)				
	1	5	8	11	18
A1	509840	341945	387712	211651	203012
A2	187465	66578	49615	24001	18413
A3	84958	42004	37726	21355	16201
A4	112352	78620	40598	47543	39586
B1	480278	304507	320873	106701	108768
B2	708967498	167488749	189777029	11905649	14592451
C	677102	441029	434080	118654	59057
D	4946242	2997752	2912303	473102	320313

Valores de MESF dos conjugados A1, A2, A3, A4, B1, M2, F e C nos meses 1, 5, 8, 10 e 18 de avaliação. Negrito: conjugados com valor superior ao da MESF de maior intensidade

A avaliação de CFQ durante os 18 meses mostrou uma queda nos valores de MESF para todos os conjugados estudados. No caso dos conjugados anti-IgG-PE, os maiores valores de MESF foram observados no conjugado A1, sendo os menores observados no conjugado A3. Com relação à queda dos valores de MESF, dentro dos conjugados A, essa foi mais acentuada nos conjugados A2 (90%) e A3 (81%) quando comparada a queda observada nos conjugados A1 (60%) e A4 (65%). O conjugado B1 apresentou valores absolutos próximos ao conjugado A1, mas sua queda foi mais acentuada (77%). O conjugado anti-HBSAg-PE C apresentou a maior queda (91%) de todos os conjugados, no caso da avaliação de MESF (Figura 21).

Figura 21 – Avaliação de MESF dos conjugados durante 18 meses



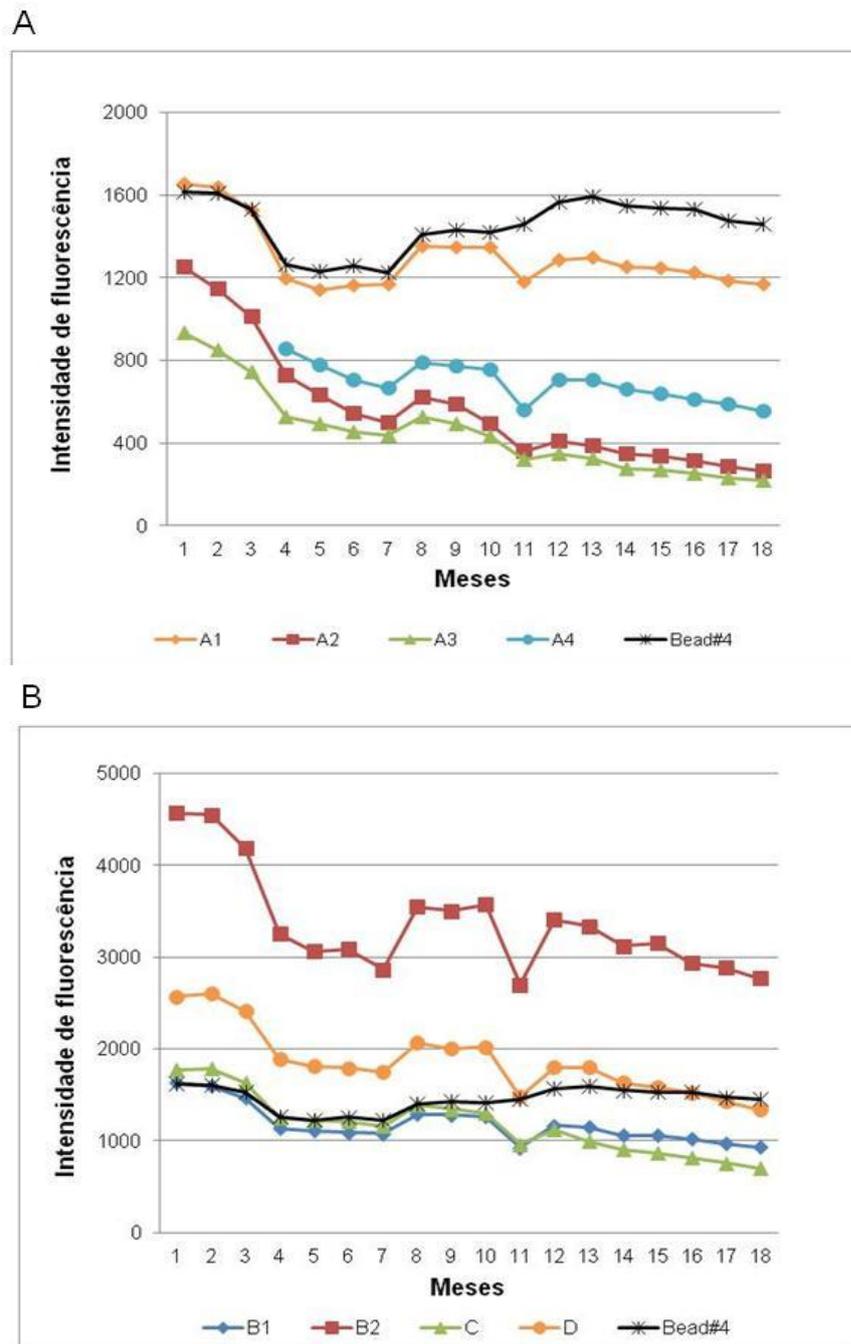
Valores de MESF dos conjugados A1, A2, A3, A4, B1 e C durante os 18 meses de avaliação. Eixo X - meses de avaliação. Eixo Y - valores de MESF. O primeiro ponto de avaliação do conjugado A4 foi no 4º mês.

4.1.5 Avaliação de brilho e estabilidade dos conjugados

O potencial de aplicação da técnica de citometria de fluxo no controle de qualidade do brilho e estabilidade de anticorpos foi investigado. Para tal fim, as intensidades de fluorescência de microesferas acopladas com 5 µg/mL de cada conjugado anti-IgG-PE e as acopladas com 1:300 de cada conjugado anti-HBSAg-PE foram avaliadas durante 18 meses.

Para a avaliação de brilho, as médias geométricas dos conjugados no primeiro ponto de avaliação foram comparadas. O conjugado A1 foi o mais brilhante dos conjugados A com média geométrica inicial de 1656 contra 1254, 936 e 858 dos conjugados A2, A3 e A4, respectivamente. Os conjugados B1 e B2 apresentaram médias geométricas de 1632 e 4564. Desta forma, B2 foi o mais brilhante entre os conjugados anti-IgG-PE. Os conjugados anti-HBSAg-PE apresentaram médias geométricas de 1770 e 2569. Esses dados são relativos ao primeiro ponto representado na Figura 22.

Figura 22 – Avaliação da intensidade de fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE durante 18 meses

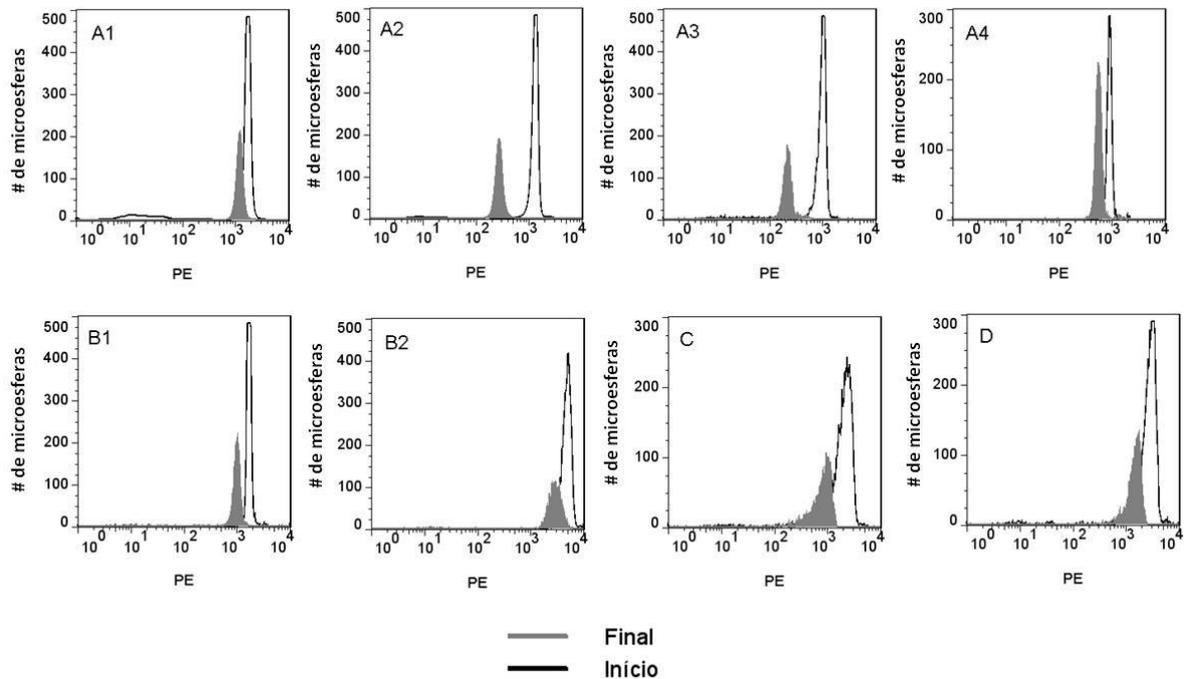


Intensidades de fluorescências dos conjugados e das microesferas #4 do kit Quantum R-PE MESF em cada ponto de avaliação. A- Conjugados A1, A2, A3, A4 e microesfera #4. B - Conjugados B1, B2, C, D e microesfera #4. Eixo X - meses de avaliação. Eixo Y – médias geométricas.

Em relação à avaliação da estabilidade dos conjugados pela citometria de fluxo tradicional, foi observada uma queda significativa na média geométrica de todos os conjugados durante o período de 18 meses (Figura 22). Além dessa queda na estabilidade desses insumos, foi observado também que, entre o 4^o e 7^o mês de avaliação, as médias geométricas dos conjugados apresentaram uma queda acentuada em seus valores, subindo novamente a partir do 8^o mês. No entanto, essa queda acentuada nesse período também foi acompanhada de uma queda na intensidade de fluorescência das microesferas do kit Quantum R-PE MESF, já demonstrada anteriormente na Figura 19. Para efeito comparativo, as microesferas #4 do kit foram incluídas na Figura 22, mostrando que a diminuição dos valores das médias geométricas ocorre tanto nas microesferas acopladas com os conjugados como nas microesferas do kit, no mesmo período, tornando a subir após o 8^o mês. Com relação ao conjugado A4, o primeiro ponto de análise deste conjugado foi no 4^o mês da avaliação dos outros conjugados e, mesmo tendo início justamente nos pontos de diminuição das médias geométricas, pudemos verificar que este conjugado também apresentou o mesmo comportamento dos demais (Figura 22).

O declínio da estabilidade desses conjugados pode ser verificado também pelo deslocamento dos picos de fluorescência nos histogramas de PE. Na Figura 23 estão ilustrados os histogramas das intensidades de fluorescência de PE no primeiro mês de avaliação (início) e no último (final). É possível verificar que os picos do último ponto de avaliação apresentam um deslocamento para esquerda em relação aos picos obtidos no início do estudo. Esse deslocamento representa a queda na intensidade de marcação desses insumos. Quanto maior o deslocamento, maior a queda. A partir dos histogramas da Figura 23 observamos que os conjugados A2 e A3 apresentaram o maior declínio em suas médias geométricas em comparação aos outros conjugados. Além disso, os conjugados anti-HBSAg-PE (C e D) apresentaram picos mais largos que os conjugados anti-IgG-PE, mostrando novamente que seu acoplamento foi mais heterogêneo.

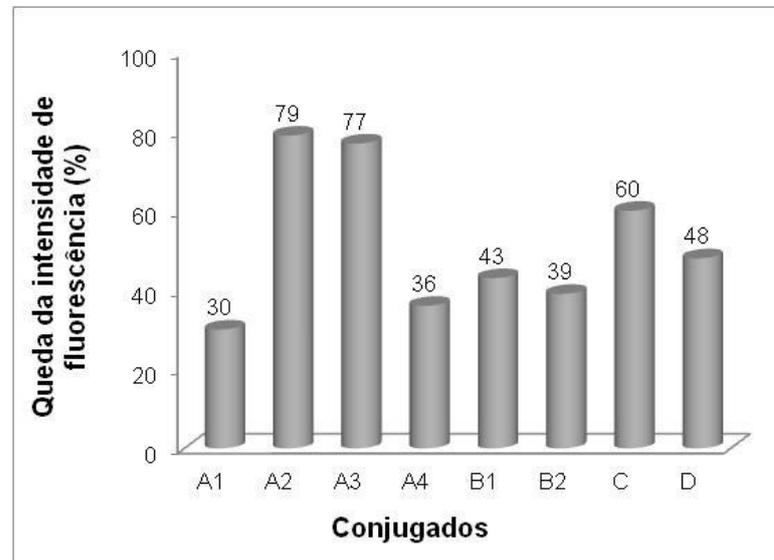
Figura 23 – Comparação dos histogramas de PE dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE nos pontos inicial e final da avaliação



Marcação dos conjugados A1, A2, A3, A4, B1, B2, C e D no mês 1 (início) e mês 18 (final) de avaliação. Eixo X - intensidade de fluorescência da PE. Eixo Y - número de microesferas. Pico preenchido em cinza – ultimo ponto de avaliação. Pico com contorno preto – primeiro ponto de avaliação.

A partir dos dados das médias geométricas de PE, calculamos o percentual de queda das intensidades de fluorescência dos conjugados, do ponto 1 até o ponto 18 de avaliação (Figura 24). Foi verificado, durante o período de estudo, que conjugados do mesmo fabricante, mas de diferentes lotes, tiveram um percentual de decaimento bem diferente, ou seja, apresentaram estabilidades diferentes. Dentro dos conjugados anti-IgG-PE, os conjugados A2 e A3 apresentaram o pior resultado com relação à estabilidade, apresentando quedas de 79% e 75%, respectivamente. O conjugado A1 apresentou uma maior estabilidade em relação aos outros tendo sido evidenciada queda de 30% nos 18 meses de estudo, acompanhado pelo conjugado A4 com 36%. Os conjugados B1 e B2 apresentaram resultados semelhantes com 43% e 39% de queda, respectivamente. Em relação aos conjugados anti-HBSAg-PE, o conjugado C apresentou 60% de queda e os conjugado D 48%. (Figura 24).

Figura 24 – Avaliação do percentual de queda das intensidades de fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE após 18 meses



Percentual de queda das intensidades de fluorescência dos conjugados A1, A2, A3, A4, B1, B2, C e D entre a 1^o e o 18^o mês de avaliação. Eixo X - conjugados anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE. Eixo Y - percentual de queda das médias geométricas.

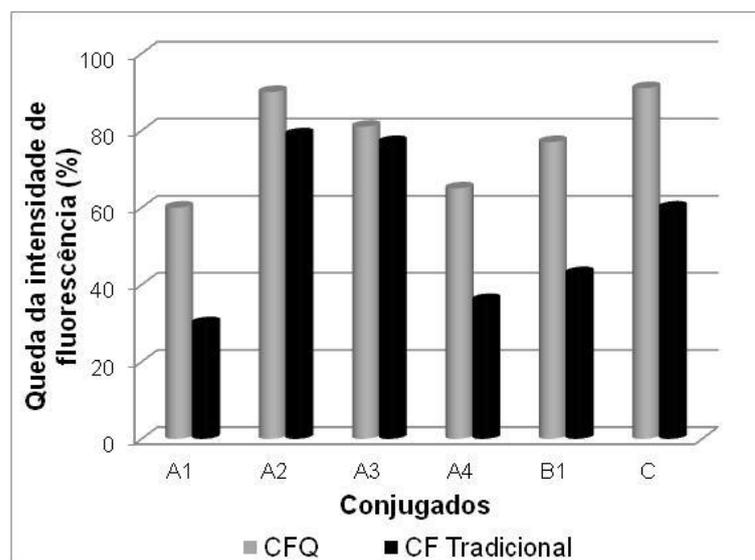
4.1.6 Comparativo entre a citometria de fluxo quantitativa (CFQ) e a tradicional (CFT)

Para compararmos os percentuais de queda observados entre os dois tipos de análise realizados durante o estudo, os valores de MESF, no caso da CFQ, e os valores das médias geométricas, no caso da CFT, foram avaliados e o cálculo do percentual de queda obtido entre o primeiro ponto de avaliação e o ponto final foi analisado (18^o mês).

Quando comparamos as análises dos percentuais de queda entre a CFQ e a CFT, observamos uma discrepância muito grande entre os valores de queda das intensidades de fluorescência dos conjugados (Figura 25). Essa diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,002$). Com exceção dos conjugados A2 e A3 que tiveram os percentuais de queda mais próximos entre os dois tipos de análise, com A2 apresentando 90% e 79% e A3 81% e 77% de queda para a CFQ e CFT, respectivamente, todos os outros conjugados tiveram valores muito maiores nas avaliações feitas pela CFQ. Os conjugados B2 e D, que tiveram valores de MESF muito elevados, tendo as médias geométricas das análises desses conjugados

extrapolado o último ponto da curva de MESF, não foram avaliados. Como já mencionado anteriormente, o valor MESF é um cálculo combinado entre as médias geométricas dos conjugados e as médias geométricas das microesferas do kit de MESF. Qualquer variação em um desses parâmetros ou em ambos pode acarretar em valores de MESF acima ou abaixo do esperado e desta forma inserir uma variação no resultado final.

Figura 25 – Comparação entre a citometria de fluxo quantitativa e a tradicional



Percentual de queda das intensidades de fluorescência dos conjugados A1, A2, A3, A4 B1 e C. CF Tradicional: valores de queda obtidos pela diferença das médias geométricas entre o 1º e o 18º mês. CFQ: valores de queda obtidos pela diferença entre as MESF do 1º e do 18º mês. Eixo X - conjugados. Eixo Y – percentual de queda das intensidades de fluorescência. Diferença entre CFQ e CF tradicional estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

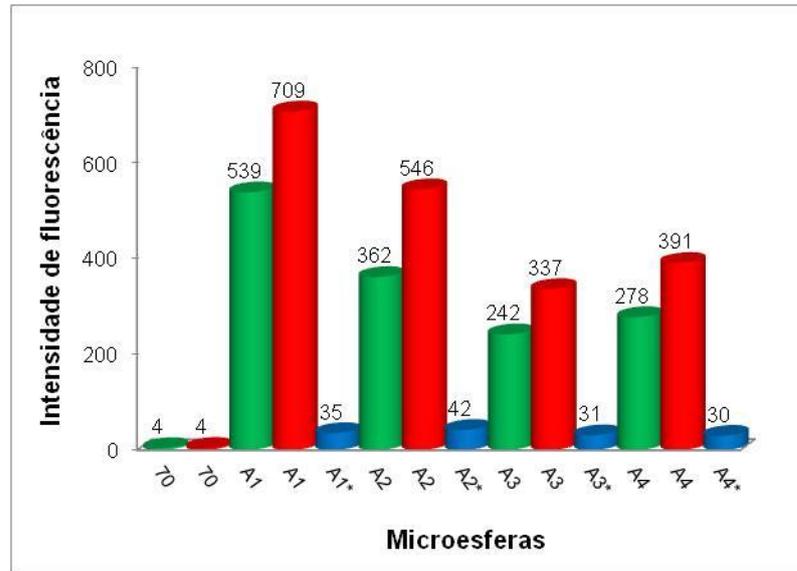
4.1.7 Avaliação da marcação dos conjugados anti-IgG-PE com anti-IgG-FITC

Para avaliarmos se a queda na intensidade de fluorescência dos conjugados acoplados às microesferas poderia não ser uma diminuição da fluorescência do fluorocromo PE, mas sim o desligamento desses conjugados das microesferas, experimentos foram realizados para marcação dos conjugados anti-IgG-PE acoplados com anticorpos anti-IgG-FITC e as fluorescências de PE e FITC detectadas nos seus respectivos canais. O objetivo desta marcação foi verificar a

ligação do anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a FITC (anti-IgG-FITC) aos anticorpos de cabra anti-IgG humana conjugados a PE (anti-IgG-PE), ligação esta que comprovaria a existência de anti-IgG-PE ligada às microesferas. Para descartar uma possível adsorção passiva do conjugado anti-IgG-FITC às microesferas, foram utilizadas microesferas sem acoplamento. Além disso, para verificarmos se seria possível garantir que a queda de fluorescência da PE não era acompanhada do desligamento do conjugado, microesferas foram expostas à luz e à temperatura ambiente com o objetivo de provocar um decaimento da fluorescência de PE, sem alterar o acoplamento do conjugado às microesferas.

A Figura 26 ilustra a detecção da fluorescência de PE nas microesferas sem acoplamento (070), nas acopladas com os conjugados A1, A2, A3 ou A4 incubadas com tampão de lavagem ou com anti-IgG-FITC, estocadas de 2 a 8 °C ou expostas à luz e à temperatura ambiente por, pelo menos, 2 semanas antes da marcação com anti-IgG-FITC. As microesferas sem acoplamento não marcaram para PE já que não apresentavam anti-IgG-PE ligada a sua superfície (070 + TL e 070 + IgG-FITC). Houve um aumento das médias de PE com a presença de FITC, mas não foi possível compensar essa interferência de FITC na detecção de PE durante a aquisição no citômetro de fluxo. O objetivo esperado com esse experimento, no entanto, foi demonstrar que as microesferas acopladas que foram expostas à luz e à temperatura ambiente (A1*, A2*, A3* e A4*) apresentaram uma queda acentuada da fluorescência de PE em comparação às microesferas estocadas normalmente (A1, A2, A3 e A4). Essa diferença foi estatisticamente significativa para todos os conjugados ($p \leq 0,05$).

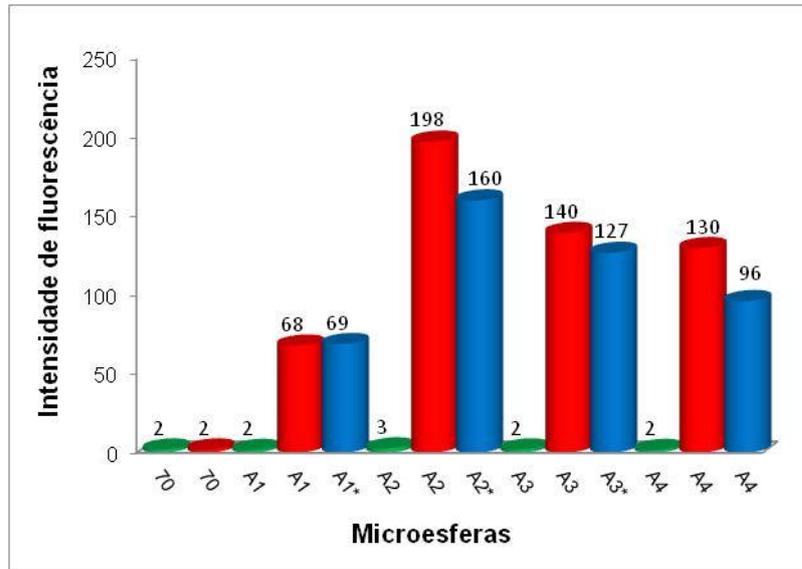
Figura 26 – Detecção da fluorescência dos conjugados anti-IgG-PE



Médias dos valores das intensidades de fluorescência de PE nas microesferas sem acoplamento (70) e acopladas com A1, A2, A3 e A4. Verde - incubadas com tampão de lavagem. Vermelho - incubadas com anti-IgG-FITC. Azul - incubadas com anti-IgG-FITC, expostas à luz e à temperatura ambiente. Eixo X - microesferas. Eixo Y - médias geométricas. Médias de três avaliações no citômetro de fluxo. A1- A4: microesferas acopladas estocadas de 2 a 8 °C no escuro. A1*- A4*: microesferas acopladas expostas à luz e à temperatura ambiente

A detecção da fluorescência de FITC nas mesmas microesferas utilizadas anteriormente está ilustrada na Figura 27. A detecção aqui significa a marcação do conjugado anti-IgG-FITC. Além disso, todas as microesferas incubadas com tampão de lavagem não apresentaram detecção para FITC e não houve adsorção passiva do conjugado anti-IgG-FITC, visto que as microesferas sem acoplamento (070 + IgGFITC) não apresentaram fluorescência significativa para FITC após incubação com esse conjugado. No entanto, as microesferas acopladas com os conjugados PE apresentaram sinal para FITC (A1, A2, A3 e A4), o que demonstrou que houve ligação do conjugado anti-IgG-FITC ao conjugado anti-IgG-PE acoplado às microesferas. Embora graficamente seja observada uma queda nas médias da marcação de FITC nas microesferas acopladas expostas à luz e à temperatura ambiente previamente à marcação com anti-IgG-FITC, essa queda não foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) exceto para o conjugado A4 ($p = 0,02$).

Figura 27 – Detecção da fluorescência do conjugado anti-IgG-FITC



Médias dos valores das intensidades de fluorescência de FITC nas microesferas sem acoplamento (70) e acopladas com A1, A2, A3 e A4. Verde - incubadas com tampão de lavagem. Vermelho - incubadas com anti-IgG-FITC. Azul - incubadas com anti-IgG-FITC, expostas à luz e à temperatura ambiente. Eixo X - microesferas. Eixo Y - médias geométricas. Médias de três avaliações no citômetro de fluxo.

As Figuras 26 e 27 demonstram que foi possível avaliar a estabilidade de conjugados acoplados a microesferas pela citometria de fluxo, entretanto a inclusão de uma marcação com anti-IgG-FITC foi fundamental para assegurar que a queda observada no acompanhamento dos conjugados estaria relacionada à diminuição da fluorescência do fluorocromo e não ao desacoplamento do conjugado da microesfera.

4.1.8 Avaliação pela espectrofotometria dos conjugados anti-IgG-PE

A avaliação dos conjugados A1, A2, A3 e A4 pela espectrofotometria foi realizada no final do estudo. Na avaliação em 565nm, o conjugado A1 apresentou DO de 0,209, A2 de 0,113, A3 de 0,091 e A4 de 0,126. Desta forma, o conjugado A1 foi o mais brilhante também pela espectrofotometria. Este fato apontou para uma semelhança dos resultados desses conjugados obtidos pelas técnicas de

espectrofotometria e de citometria de fluxo. Não foram realizadas leituras para os outros conjugados estudados.

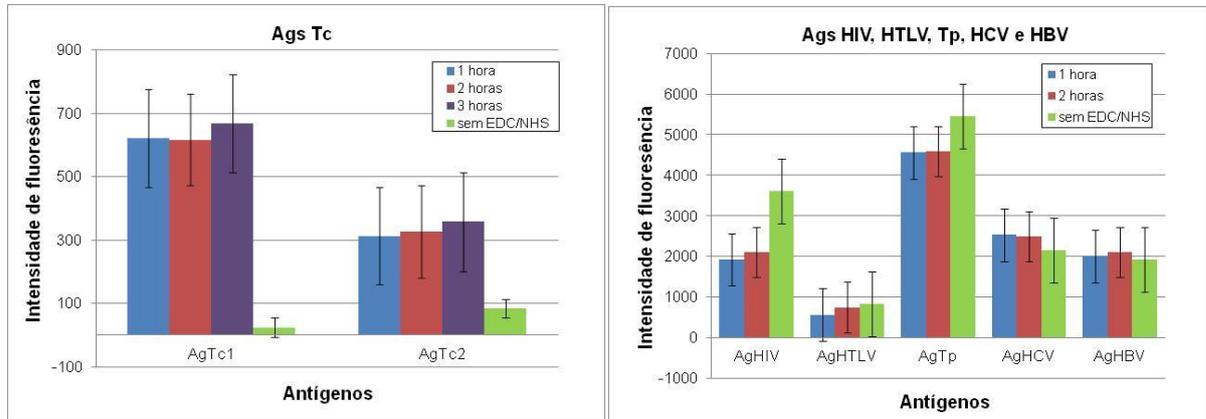
4.2 AVALIAÇÃO DAS MICROESFERAS ACOPLADAS AOS ANTÍGENOS

4.2.1 Avaliação dos acoplamentos no citômetro FACSCalibur

Com o objetivo de avaliar se diferentes condições de acoplamento poderiam interferir na eficiência da marcação, ou melhor, poderiam prejudicar a detecção da reação antígeno-anticorpo, as microesferas foram acopladas por diferentes tempos de incubação (1 hora, 2 horas e 3 horas) e por 2 horas na ausência de compostos importantes para estabilização da reação de acoplamento como EDC e NHS (sem EDC/NHS).

Os resultados de cada antígeno em relação às condições de acoplamento estão descritos na Figura 28. Para avaliação estatística, os resultados dos acoplamentos de 1 hora, 3 horas e 2 horas sem EDC/NHS foram comparados aos resultados 2 horas (considerado como padrão ouro, já que é a condição de acoplamento dos antígenos às microesferas do ensaio da plataforma de microarranjos líquidos). Os antígenos Tc1, AgTp e AgHBV apresentaram resultados semelhantes entre 1 hora e 2 horas enquanto os outros antígenos apresentaram diferença estatística pelo teste Wilcoxon entre os dois acoplamentos. Para os antígenos Tc, que foram testados também com o tempo de acoplamento de 3 horas, o AgTc1 apresentou resultado diferente para 3 horas enquanto Tc2 apresentou resultado semelhante entre 3 horas e 2 horas. Com relação à ausência de EDC/NHS todos os resultados apresentaram-se estatisticamente diferentes do acoplamento de 2 horas, sendo observados três tipos de resposta de acordo com a intensidade de marcação: comprometimento acentuado (AgsTc), mínima alteração (AgHTLV, AgHCV e AgHBV) e aumento nítido da marcação (antígenos AgHIV e AgTp).

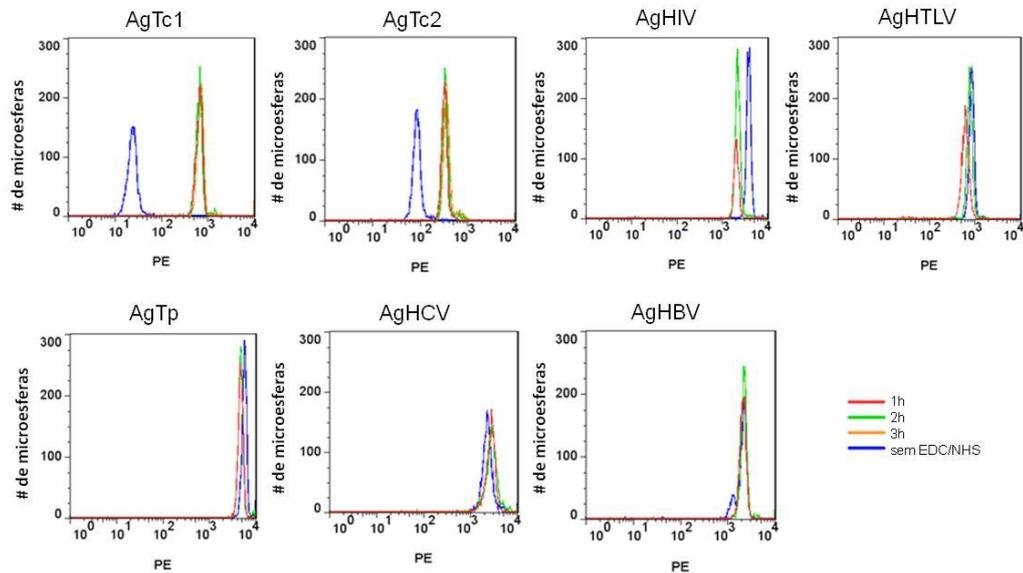
Figura 28 – Avaliação no FACSCalibur das diferentes condições acoplamento



Avaliação no FACSCalibur dos efeitos de diferentes condições de acoplamento dos antígenos de Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV às microesferas. Médias das intensidades de fluorescência (médias geométricas) obtidas nos 18 meses de avaliação \pm desvio padrão.

Em relação aos histogramas obtidos no primeiro mês de avaliação de todas as condições de acoplamento testadas, o acoplamento de 2h sem EDC/NHS resultou em diferentes reações dos antígenos testados (Figura 29). Constatamos que no caso dos AgsTc, os picos apresentaram deslocamentos acentuados para esquerda na condição sem EDC/NHS em comparação aos picos das outras condições de acoplamento, significando um comprometimento acentuado nessa condição. Nos antígenos Tp e, principalmente, HIV houve um deslocamento para a direita do pico, mostrando um aumento da marcação nessa condição de acoplamento para esses dois antígenos. Já os antígenos HTLV, HCV e HBV não apresentaram grandes deslocamentos de seus picos no acoplamento de 2 horas sem EDC/NHS (Figura 29). Não houve diferença nos picos dos histogramas dos acoplamentos exceto para o AgHIV, que apresentou um deslocamento para esquerda no acoplamento de 1 hora (Figura 29).

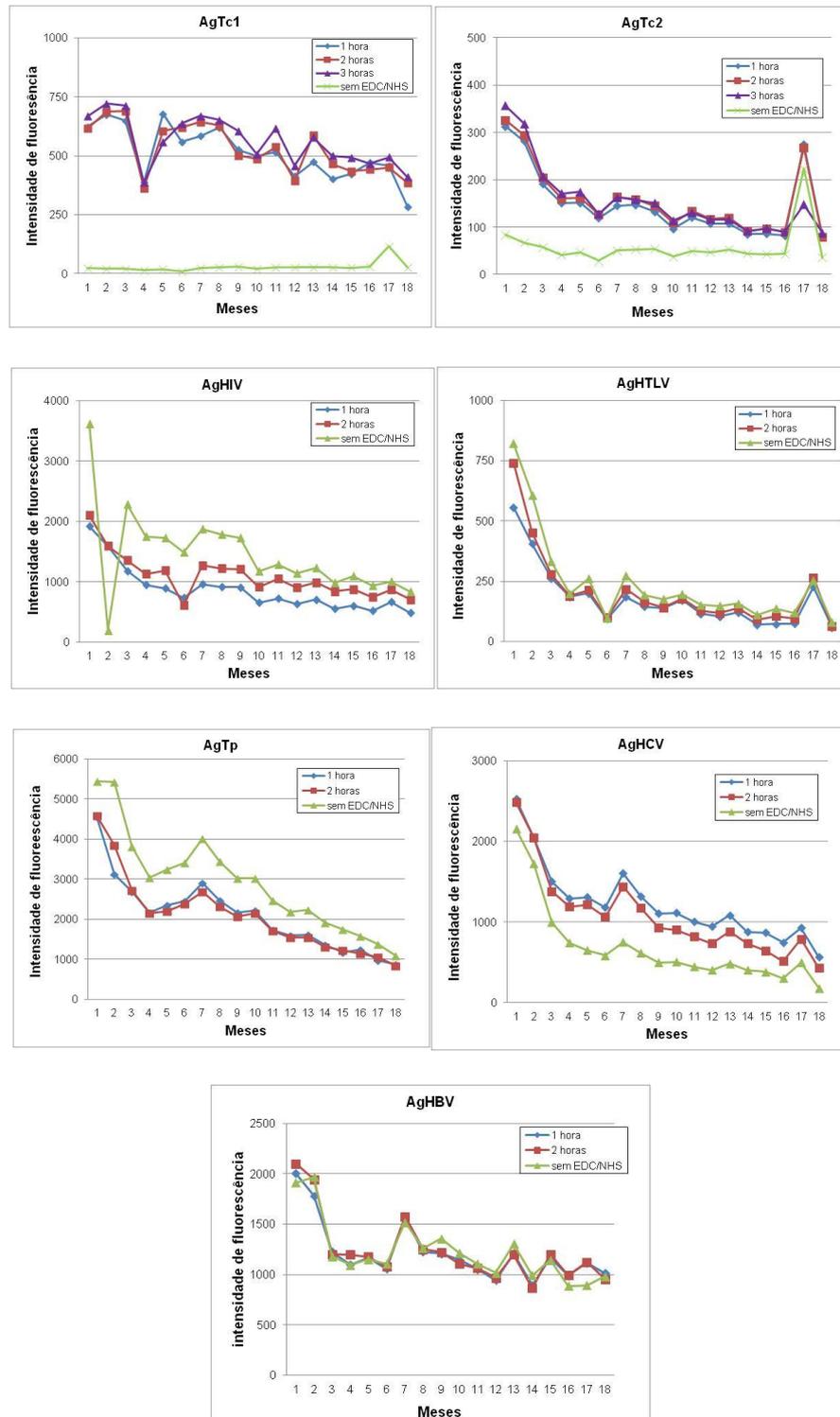
Figura 29 – Histogramas do primeiro mês de avaliação das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas



Histogramas de marcação de PE, obtidos na citometria de fluxo, após a reação de microarranjos líquidos. Microesferas acopladas aos antígenos Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV, no primeiro mês de avaliação. Condições de acoplamento: 1 hora (vermelho), 2 horas (verde), 3 horas (laranja) e 2 horas sem EDC/NHS (azul). Eixo X – intensidade de fluorescência. Eixo Y – número de microesferas.

A avaliação das microesferas acopladas aos antígenos em diferentes condições de acoplamento mostrou que em todas as condições houve uma diminuição da marcação durante os 18 meses de estudo. Não houve, portanto, nenhuma condição capaz de modificar o decaimento da marcação. Algumas variações em pontos específicos foram observadas provavelmente devido a problemas na realização da técnica e/ ou aquisição no citômetro de fluxo. Neste sentido, o ponto 17 apresentou uma elevação das marcações em quase todos os antígenos e condições de acoplamento estudadas. O AgTc1 apresentou respostas bastante variadas durante o estudo. Todas as condições de acoplamento de cada antígeno apresentaram as mesmas características durante todo o estudo, por exemplo, antígenos que apresentaram elevação ou decaimento da marcação no acoplamento de 2 horas sem EDC/NHS apresentaram esse perfil durante todo o estudo. Houve um aumento nas marcações dos antígenos, com exceção de AgTp e AgHBV 2 horas sem EDC/NHS, em todas as condições de acoplamento no 17^o mês de avaliação (Figura 30).

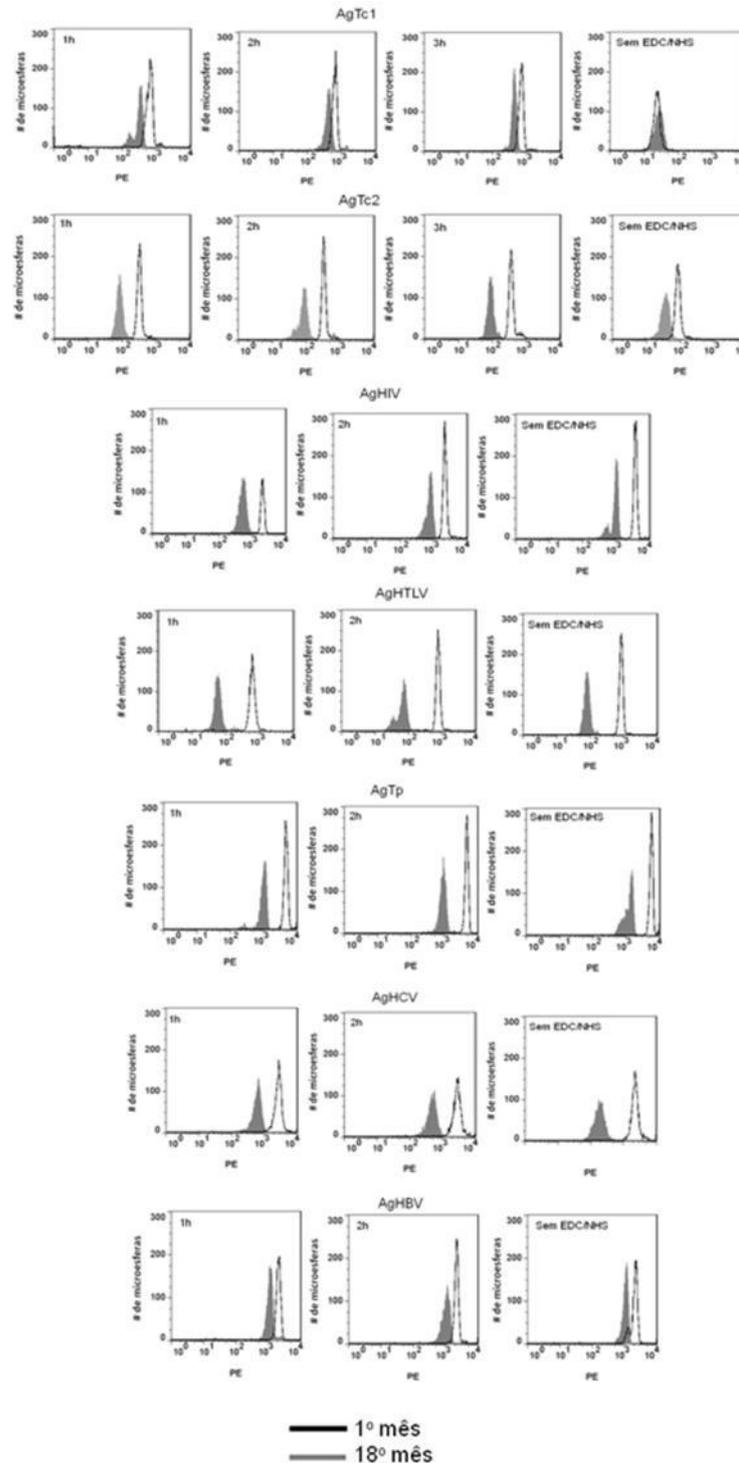
Figura 30 - Avaliação no FACSCalibur das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas durante 18 meses



Avaliação pela citometria de fluxo da intensidade de fluorescência de PE após a reação de microarranjos líquidos. Microesferas acopladas aos antígenos Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV avaliadas durante 18 meses. Condições de acoplamento: 1 hora (azul), 2 horas (vermelho), 3 horas (roxo), 2 horas sem EDC/NHS (verde). Eixo X- meses de avaliação. Eixo Y - médias geométricas de PE.

Com relação aos histogramas de marcação da PE de todos os antígenos estudados, considerando apenas o primeiro e o último ponto de avaliação, foi possível observar um deslocamento dos picos para a esquerda no último ponto, demonstrando o decaimento da intensidade de fluorescência já demonstrado na Figura 30. Além disso, foi possível observar também a diferença de intensidades de PE entre os antígenos estudados, já que cada antígeno foi acoplado em uma concentração diferente (definida previamente) e cada soro reagente a cada antígeno apresentava um grau de reatividade ao seu antígeno específico (Figura 31).

Figura 31 - Comparação dos histogramas do primeiro e último mês de avaliação das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas



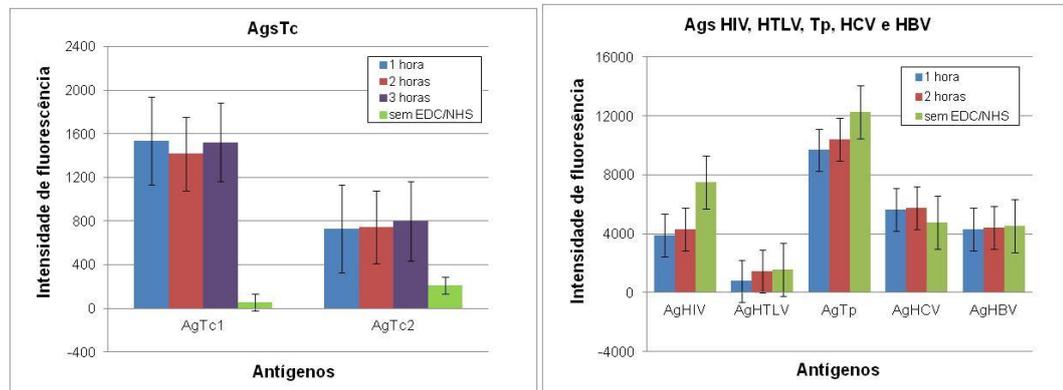
Intensidade de fluorescência de PE após a reação de microarranjos líquidos. Microesferas acopladas aos antígenos Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV avaliadas no 1^o (contorno preto) e 18^o mês (em cinza). Condições de acoplamento: 1 hora (1h), 2 horas (2h), 3 horas (3h), 2 horas sem EDC/NHS (sem EDC/NHS). Eixo X- intensidade de fluorescência. Eixo Y – número de microesferas.

4.2.2 Avaliação dos acoplamentos no LX200

Assim como foi realizado no citômetro de fluxo, as mesmas amostras de microesferas acopladas com os antígenos por diferentes tempos de incubação e com a ausência de compostos importantes para estabilização da reação de acoplamento como EDC e NHS foram analisadas no equipamento LX200.

A Figura 32 ilustra os resultados obtidos para as avaliações de cada antígeno em relação às condições de acoplamento realizadas nos 18 meses de estudo. Assim como na citometria de fluxo, para avaliação estatística, os resultados dos acoplamentos de 1 hora, 3 horas e 2 horas sem EDC/NHS foram comparados aos resultados de 2 horas (considerado como padrão ouro). Os AgsTc1, AgTc2, AgTp e AgHBV não apresentaram diferença entre os resultados de 1 hora e 2 horas de acoplamento. Para os antígenos Tc, que foram testados também com o tempo de acoplamento de 3 horas, o AgTc1 apresentou resultado estatisticamente diferente para 3 horas enquanto Tc2 apresentou resultado de 3 horas semelhante aos resultados de 2 horas. Em relação à ausência de EDC/NHS, todos os antígenos apresentaram diferença nesse acoplamento em relação ao acoplamento de 2 horas, mas também em relação aos outros tempos de avaliação demonstrando uma queda acentuada da intensidade de fluorescência quando na ausência deste tampão. Mais uma vez, foram observados quatro tipos de resposta nos acoplamentos sem EDC/NHS: comprometimento acentuado (AgsTc), mínima alteração (AgHTLV, AgHCV, AgHBV) e aumento nítido da marcação (AgHTLV e AgTp).

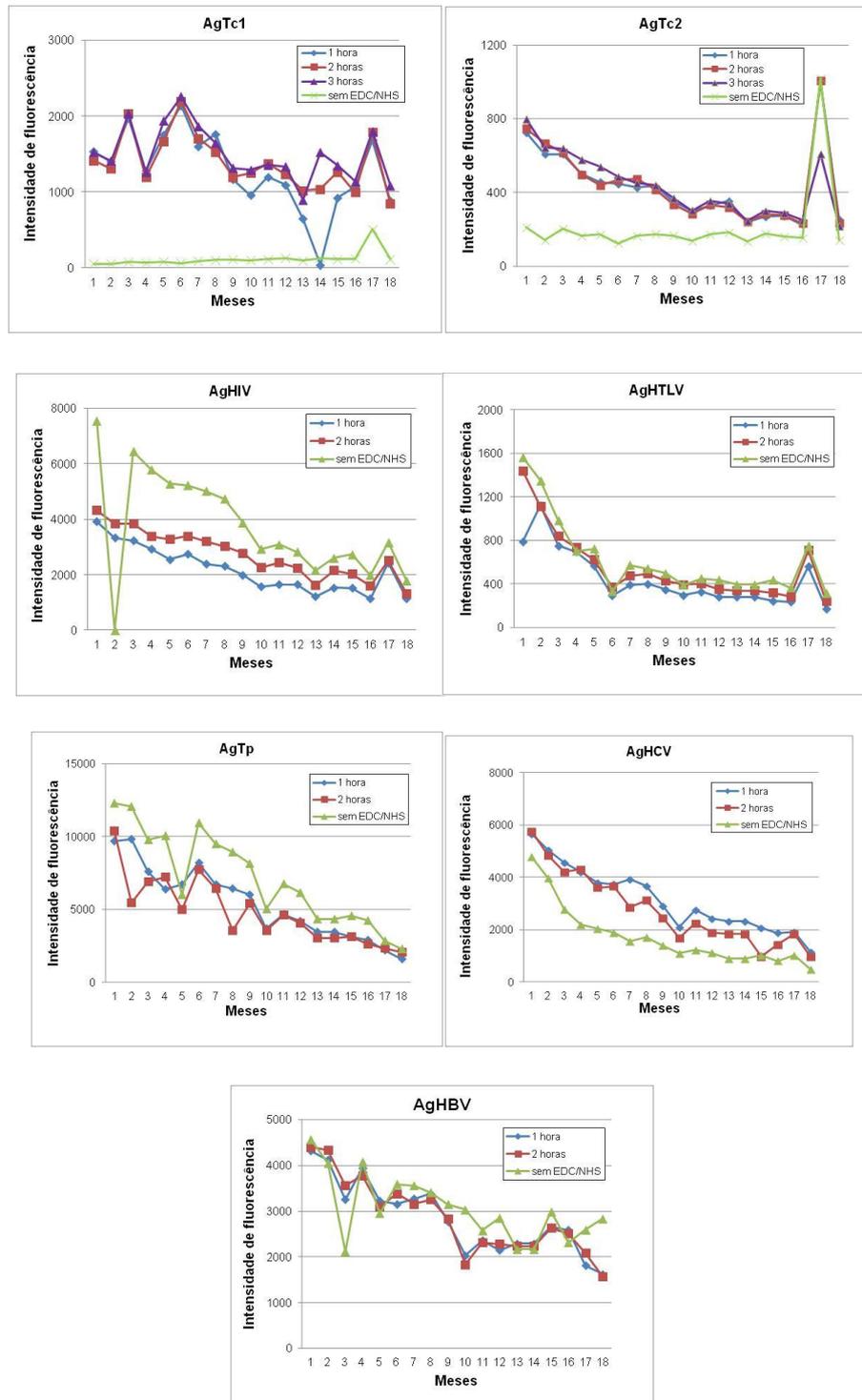
Figura 32 – Avaliação no LX200 das diferentes condições acoplamento



Avaliação no equipamento LX200 dos efeitos de diferentes condições de acoplamento dos antígenos de Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV às microesferas. Médias das intensidades de fluorescência (MFI) obtidas nos 18 meses de avaliação \pm desvio padrão.

A Figura 33 ilustra os resultados obtidos para cada antígeno nas diferentes condições e pontos de avaliação. Assim como na avaliação pela citometria de fluxo, a avaliação das microesferas acopladas aos antígenos em diferentes condições de acoplamento mostrou que em todas as condições houve uma diminuição da marcação durante os 18 meses de estudo. Não houve, portanto, nenhuma condição capaz de modificar o decaimento da marcação. Algumas variações foram novamente observadas em pontos específicos. No caso do LX200, essas variações foram muito maiores do que as observadas no FACSCalibur. Mais uma vez, o ponto 17 apresentou uma elevação das marcações em quase todos os antígenos e condições de acoplamento estudadas. Não foi possível realizar a avaliação do AgHIV na condição de acoplamento de 2h sem EDC/NHS no segundo mês por problemas técnicos. Os AgTC1, AgTp e AgHBV foram os antígenos que apresentaram maiores variações nas respostas durante o estudo. Todas as condições de acoplamento de cada antígeno apresentaram as mesmas características durante todo o estudo, por exemplo, antígenos que apresentaram elevação ou decaimento da marcação no acoplamento de 2 horas sem EDC/NHS apresentaram esse perfil durante todo o estudo, apesar de variações terem sido observadas em alguns pontos. Houve um aumento nas marcações dos antígenos, com exceção de AgTp e AgHBV, em todas as condições de acoplamento no 17^o mês de avaliação (Figura 33).

Figura 33 - Avaliação no LX200 das diferentes condições de acoplamento dos antígenos às microesferas durante 18 meses



Avaliação no equipamento LX200 da intensidade de fluorescência de PE após a reação de microarranjos líquidos. Microesferas acopladas aos antígenos Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV avaliadas durante 18 meses. Condições de acoplamento: 1 hora (azul), 2 horas (vermelho), 3 horas (roxo), 2 horas sem EDC/NHS (verde). Eixo X- meses de avaliação. Eixo Y MFI de PE

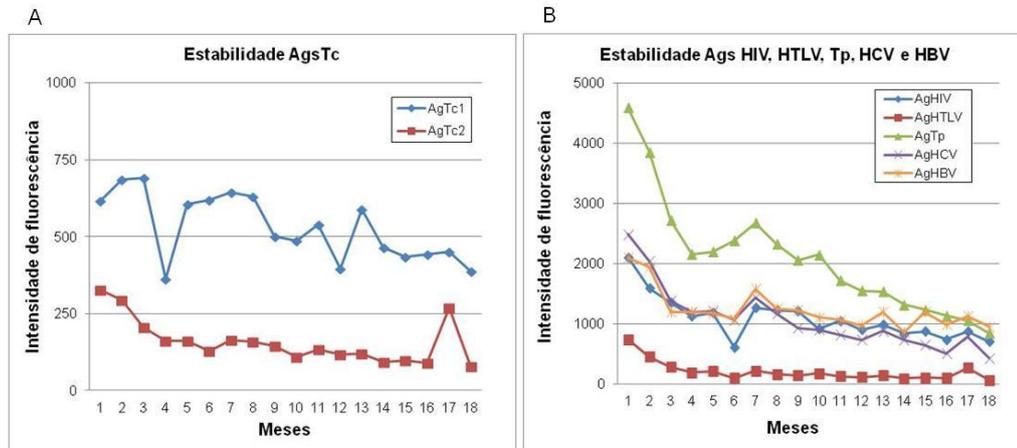
4.2.3 Avaliação da estabilidade dos acoplamentos no FACSCalibur

Como a condição de acoplamento dos antígenos às microesferas do ensaio padrão da plataforma de microarranjos líquidos é 2 horas, os resultados dos acoplamentos de 2 horas foram considerados como resultado padrão para fornecer informações sobre a estabilidade desses antígenos e acoplamentos.

Foi observado que todos os antígenos estudados apresentaram queda nas médias geométricas durante os 18 meses de avaliação (Figura 34). No Quadro 4, verificamos que todos os valores finais de média geométrica foram bem menores que os valores iniciais. O cálculo do percentual de queda demonstrou que o AgTc1 foi o antígeno que teve um menor decaimento enquanto o AgHTLV foi o que apresentou maior queda na sua intensidade de fluorescência. Mais uma vez foi possível verificar, conforme demonstrado tanto na Figura 33 quanto no Quadro 4, uma diferença entre as médias geométricas das marcações entre os diferentes antígenos. Novamente observamos um aumento das marcações dos antígenos no 17º mês de avaliação, exceto para o AgTp.

A partir desses resultados, determinamos que a estabilidade dos antígenos, em ordem crescente, foi: AgHTLV, AgHCV, AgTp, AgTc2, AgHIV, AgHBV, AgTc1. Nesse estudo, portanto, com exceção do AgTc1, os conjugados apresentaram uma baixa estabilidade no período de 18 meses de avaliação.

Figura 34 – Estabilidade dos antígenos nos 18 meses de avaliação no FACSCalibur



Avaliação no equipamento FACSCalibur da estabilidade dos acoplamentos dos antígenos Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV às microesferas. Médias geométricas obtidas em cada ponto de avaliação das microesferas acopladas por 2 horas, durante 18 meses.

Quadro 4 – Médias geométricas e percentual de queda dos conjugados após 18 meses de avaliação no FACSCalibur

Antígenos	Mês de avaliação		Queda (%)
	1	18	
AgTc1	616	386	37
AgTc2	326	79	76
AgHIV	2103	705	66
AgHTLV	741	62	92
AgTp	4585	845	82
AgHCV	2485	429	83
AgHBV	2099	981	55

Valores das médias geométricas e dos percentuais de queda obtidos no FACSCalibur durante 18 meses de avaliação dos antígenos de Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV acoplados às microesferas. Médias geométricas obtidas no ponto 1 e ponto 18 de avaliação.

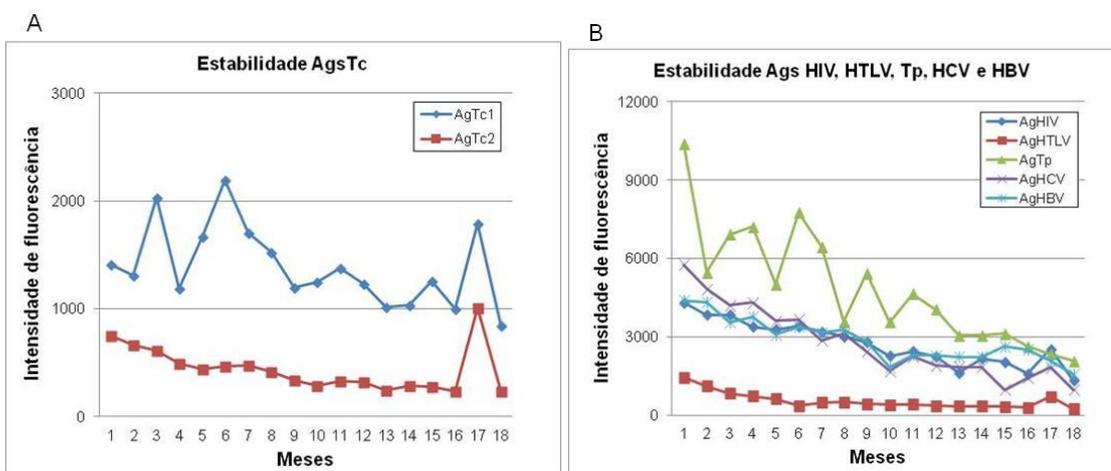
4.2.4 Avaliação da estabilidade dos acoplamentos no LX200

Da mesma forma que a avaliação do FACSCalibur, os resultados dos acoplamentos de 2 horas foram considerados como resultado padrão para fornecer informações sobre a estabilidade dos antígenos e seus acoplamentos analisada no LX200.

A Figura 35 mostra que todos os antígenos estudados apresentaram queda nas MFIs durante os 18 meses de avaliação. No Quadro 5, podemos verificar, através dos resultados em MFI, que todos os valores finais foram bem menores que os iniciais. Assim como na citometria de fluxo, o cálculo do percentual de queda mostrou que o AgTc1 teve um menor decaimento (41%) em relação aos outros antígenos avaliados. No entanto, no LX200, os Ags HTLV e HCV apresentaram o mesmo percentual de queda (83%) e a maior queda em relação aos outros antígenos. Mais uma vez foi possível verificar, conforme demonstrado tanto na Figura 30 quanto no Quadro 5, a diferença entre as MFIs das marcações entre os diferentes antígenos. Assim como na figura 33, novamente observamos um aumento das marcações dos antígenos no 17º mês de avaliação, com exceção do AgTp e AgHBV.

Embora com valores de queda diferentes dos observados nos ensaios da citometria, não houve alteração na ordem de estabilidade dos antígenos. Desta forma, em ordem crescente de estabilidade encontramos AgHTLV e AgHCV, AgTp, AgTc2 e AgHIV, AgHBV e AgTc1. Mais uma vez, com exceção do AgTc1, os dados apontaram para uma baixa estabilidade desses acoplamentos após 18 meses de avaliação.

Figura 35 – Estabilidade dos antígenos nos 18 meses de avaliação no LX200



Avaliação no equipamento LX200 da estabilidade dos acoplamentos dos antígenos Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV às microsferas. Intensidades de fluorescência (MFIs) das marcações obtidas em cada ponto de avaliação das microsferas acopladas aos antígenos, durante 18 meses.

Quadro 5 - MFIs e percentuais de queda dos conjugados após 8 meses de avaliação no FACSCalibur

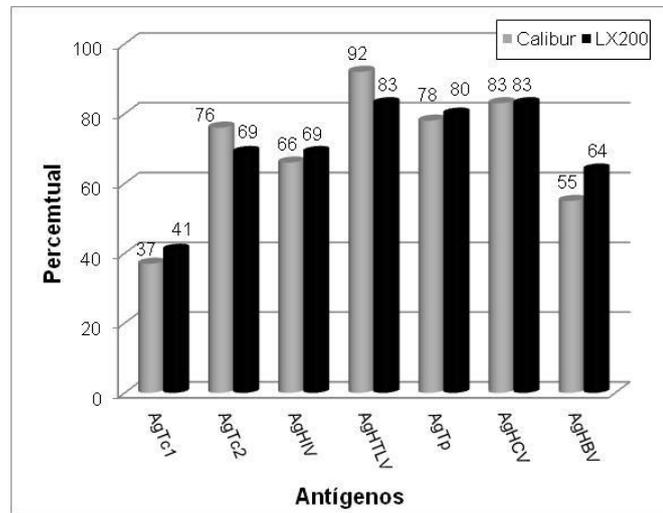
Antígenos	Mês de avaliação		Queda (%)
	1	18	
AgTc1	1416	842	41
AgTc2	747	232	69
AgHIV	4319	1324	69
AgHTLV	1441	242	83
AgTp	10396	2069	80
AgHCV	5770	966	83
AgHBV	4402	1570	64

Valores das MFIs e dos percentuais de queda obtidos no LX200 durante 18 meses de avaliação dos antígenos de Tc1 e Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV acoplados às microesferas. MFIs obtidas no ponto 1 e ponto 18 de avaliação.

4.2.5 Comparação dos resultados de estabilidade dos acoplamentos obtidos no FACSCalibur e no LX200

A Figura 36, mostra a comparação entre resultados dos percentuais de queda de cada antígeno observados no FACSCalibur e no LX200. Como já descrito anteriormente, em ambos os resultados uma maior estabilidade do AgTc1 foi encontrada, enquanto o AgHTLV foi o menos estável, sendo acompanhado do AgHCV no caso do LX200.

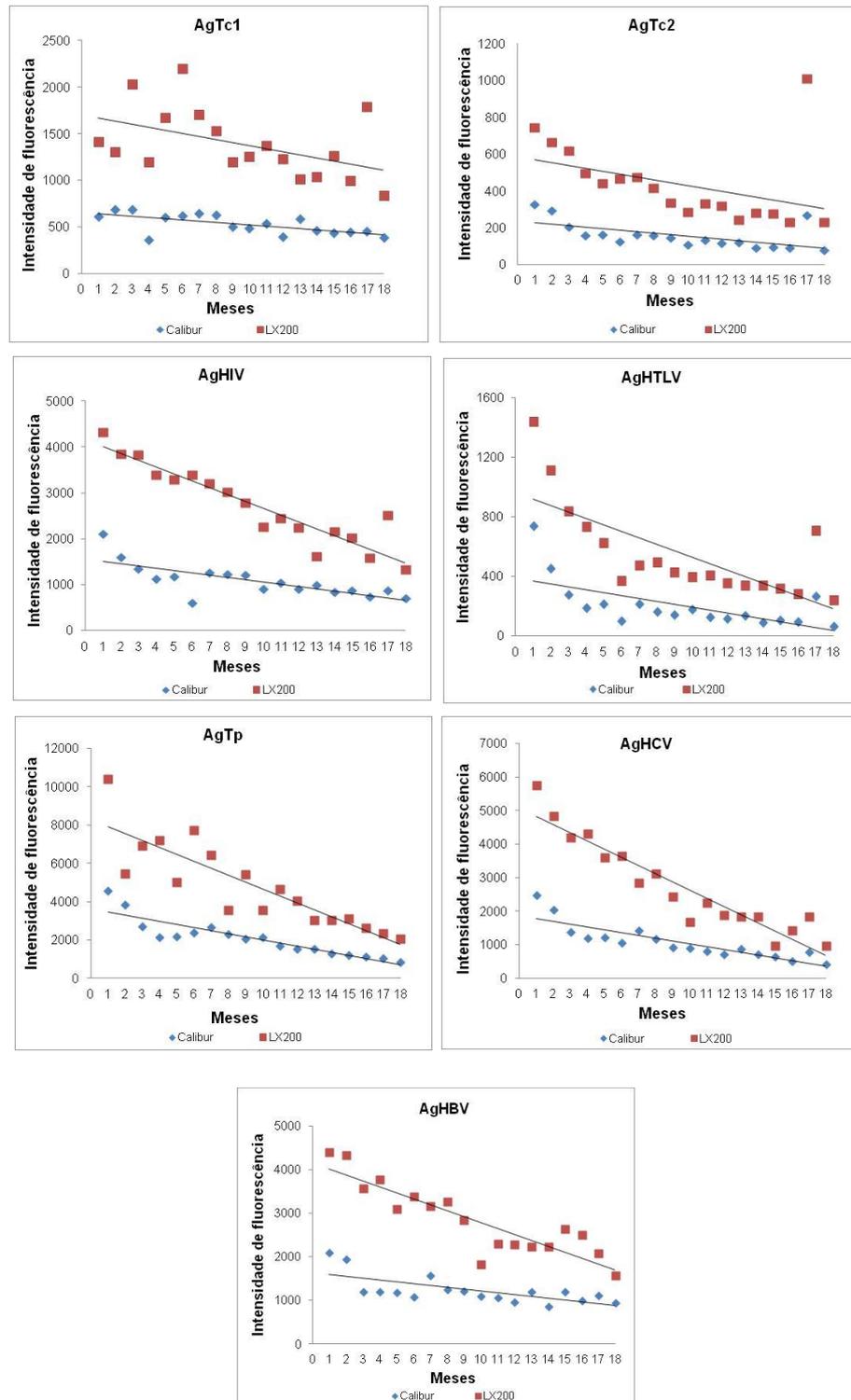
Figura 36 – Comparação dos percentuais de queda das marcações obtidos no FACSCalibur e no LX200



Percentuais de queda das intensidades de fluorescência calculados a partir das médias geométricas (FACSCalibur) e das MFIs (LX200) do último e do primeiro ponto de avaliação dos antígenos Tc1, Tc2, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV.

A análise da tendência de queda das duas metodologias durante os 18 meses de avaliação foi realizada e mostrou que as duas metodologias apresentaram tendências de queda diferentes ($p \leq 0,05$) com exceção dos antígenos Tc1 e Tc2. Ou seja, apesar dos percentuais de queda não apresentarem grandes diferenças (Figura 36), a avaliação de todos os pontos de cada antígeno sugere que o decaimento das marcações foi diferente entre as amostras avaliadas no FACSCalibur e no LX200 para a maioria dos antígenos estudados. Quanto mais paralelas as linhas de tendência entre si, mais semelhante é a tendência de queda das marcações. No caso, apenas o AgTc1 e AgTc2 apresentaram linhas de tendência semelhantes. Os dados obtidos nas avaliações no LX200 foram mais dispersos em relação aos dados obtidos nas avaliações realizadas no FACSCalibur (muito mais pontos vermelhos distantes da linha de tendência que os pontos azuis). O AgTc1 no LX200 apresentou os resultados mais variados entre os pontos de avaliação em comparação a todos os antígenos estudados. (Figura 37).

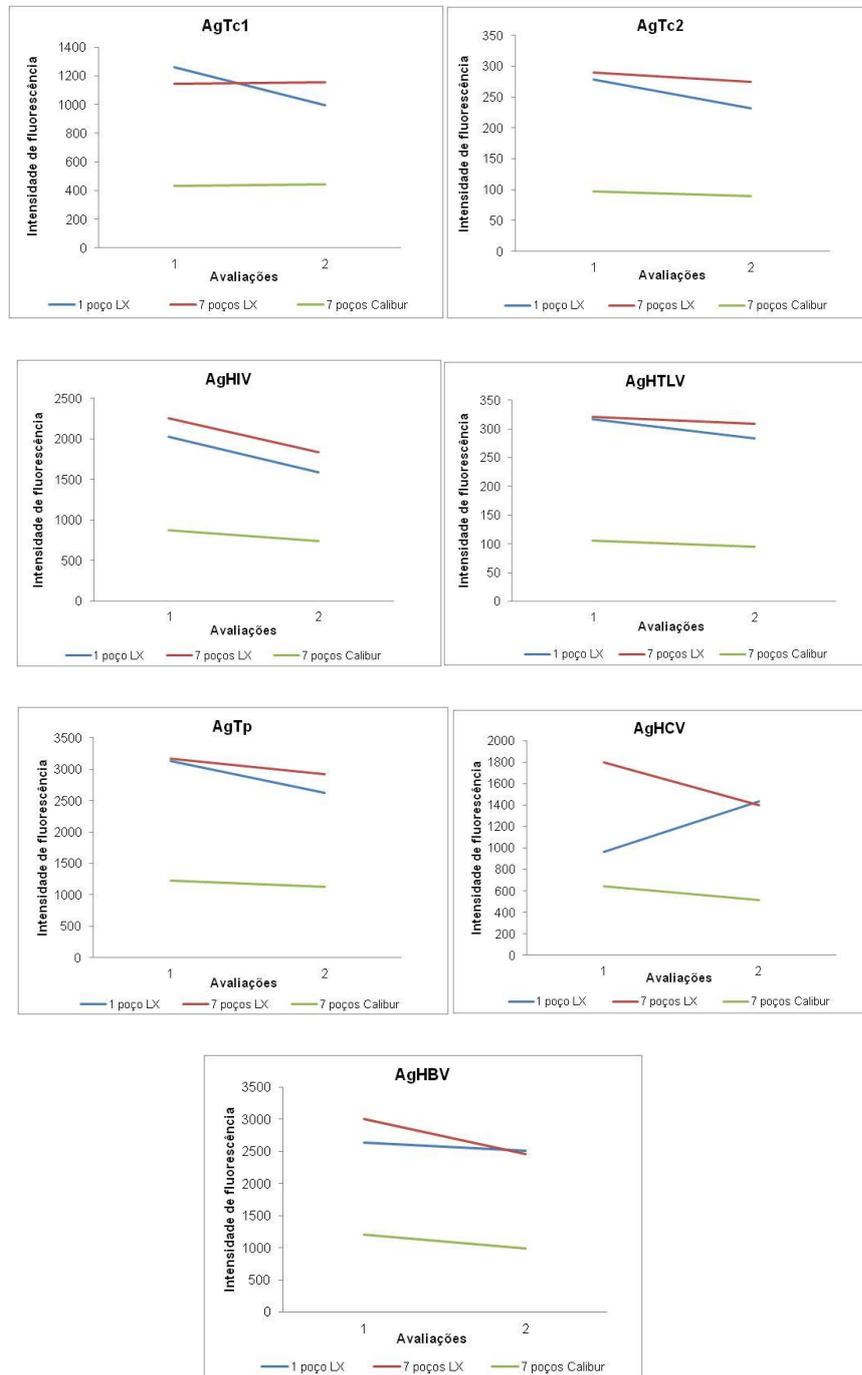
Figura 37 – Comparação entre a dispersão das intensidades de fluorescência e a tendência de queda entre os dados do FACSCalibur e do LX200



Comparação entre as intensidades de fluorescência das microesferas acopladas aos antígenos de Tc, HIV, HTLV, Tp, HCV e HBV em cada ponto de avaliação, durante 18 meses. Calibur– médias geométricas obtidas no FACSCalibur. LX200– MFIs obtidas no LX200. Eixo X- meses de avaliação. Eixo Y – intensidades de fluorescência.

Até o momento, os resultados observados no LX200 foram obtidos a partir de reações feitas em um único poço para cada antígeno, de forma a reproduzir as reações já realizadas na metodologia de microarranjos líquidos. No entanto, devido aos resultados do LX200 apresentarem uma maior variabilidade quando comparados aos resultados do FACSCalibur, foram realizadas duas avaliações das mesmas amostras obtidas nas reações de 7 poços, primeiramente no FACSCalibur e depois no LX200. Como foram realizadas apenas duas avaliações, não foi possível aplicar qualquer teste estatístico a esses dados, mas a visualização gráfica dos resultados indicou que as mesmas amostras lidas no FACSCalibur e no LX200 (7 poços LX e 7 poços Calibur) apresentaram o mesmo perfil de resposta em todos os antígenos, enquanto os dados de 1 poço lido no LX200 (1 poço LX) apresentaram perfis diferentes em alguns casos (Figura 38).

Figura 38 – Comparação das intensidades de fluorescência de amostras de provenientes de um poço ou sete poços de reação



Intensidades de fluorescência do FACSCalibur (média geométrica) e LX200 (MFI) em duas avaliações (meses 15 e 16). 1 poço LX - amostra proveniente de um poço de reação lida no LX200. 7 poços Calibur - amostra proveniente da mistura de 7 poços de reação lida no Calibur. 7 poços LX – amostra proveniente da mistura de 7 poços de reação lida no Calibur e depois no LX200.

5 DISCUSSÃO

Os ensaios multiteste foram desenvolvidos inicialmente para avaliação de múltiplas citocinas em uma mesma amostra simultaneamente, apresentando diferentes formatos e utilizando como tecnologias a citometria de fluxo, a quimiluminescência ou a eletroquimioluminescência. Os ensaios multiteste por citometria de fluxo se baseiam na utilização de microesferas que apresentam características capazes de serem identificadas no citômetro de fluxo através de sistemas como CBA da BD e a tecnologia xMAP da Luminex (LENG et al, 2008). A utilização de microesferas como suporte sólido já está bem descrita e existe uma tendência para que métodos diagnósticos multiteste sejam empregados na detecção, por exemplo, de antígenos HLA para transplantes, de alergias e vírus da Hepatite C (HSU; JOOS; KOGA, 2009; ISHIDA et al, 2010; FONSECA et al, 2011). Além do diagnóstico em humanos, um método sorológico foi proposto recentemente para o diagnóstico da leishmaniose canina, utilizando microesferas acopladas a antígenos de *Leishmania*. (SOUSA et al, 2013). Como já mencionado anteriormente, essa tecnologia se baseia no acoplamento de antígenos e anticorpos às microesferas, processo esse que é extremamente suscetível a variações relacionadas a fatores intrínsecos à proteína a ser acoplada, assim como condições e reagentes utilizados durante o processo de acoplamento (ELSHAL; MCOY, 2006). As microesferas apresentam características únicas de faixas de tamanho, estabilidade, uniformidade e capacidade de absorver e reter corantes fluorescentes que favorecem sua utilização na citometria de fluxo. Embora a utilização da citometria de fluxo para análise de microesferas já tenha sido estabelecida (VIGNALI 2000; JANI et al, 2002; KELLAR; IANNONE, 2002), sua aplicação em estudos de controle de qualidade de conjugados fluorescentes e de acoplamento de proteínas a microesferas é uma nova abordagem.

Nos ensaios múltiplos, os anticorpos fluorescentes, essenciais para a reação multiteste, os acoplamentos das proteínas às microesferas e as próprias reações durante o ensaio necessitam de técnicas aprimoradas de controle de qualidade para assegurar a detecção eficaz das moléculas alvo do teste diagnóstico.

Neste contexto, o presente trabalho pretendeu desenvolver uma avaliação citofluorimétrica para o estudo de insumos e processos utilizados na metodologia de microarranjos líquidos de modo que tal avaliação pudesse ser utilizada como uma ferramenta de controle de qualidade de kits para diagnóstico.

No primeiro experimento deste estudo foi avaliado se diferentes códigos de microesferas, apresentando diferentes intensidades dos fluorocromos de classificação, poderiam interferir na detecção do fluorocromo PE dos anticorpos anti-IgG-PE e anti-HBSAg-PE, já que na citometria de fluxo, existe uma sobreposição de espectros (cores) durante a emissão dos fluorocromos, ocasionando uma interferência de uma cor no canal de outra cor, que geralmente deve ser subtraída matematicamente pelo equipamento (BERTHO; FERRAZ, 2013). Nossos resultados corroboraram dados de outros autores (KELLAR; IANNONE, 2002) que demonstraram que os fluorocromos de classificação das microesferas, de comprimentos de onda no espectro do vermelho e infravermelho, não interferiram na detecção da PE. No nosso caso, nem a diferença de intensidades dos dois corantes internos nos códigos de microesferas #012, #035 e #070, nem a diferença de intensidades de PE nos conjugados A1 e A4 foram capazes de interferir no canal da leitura da PE no citômetro de fluxo, visto que todos os resultados das médias geométricas foram semelhantes em todas as condições acima.

Estudos têm mostrado que a determinação da concentração ideal no anticorpo revelador das reações de microarranjos líquidos é um fator crucial para protocolos que visam o desenvolvimento de kits para diagnóstico (ELSHAL; MCOY, 2006; ELLINGTON et al, 2010). Desta forma, verificamos a possibilidade de avaliar a concentração ideal de acoplamento através da citometria de fluxo. Geralmente essa determinação é feita através de um imunoenensaio com diluições seriadas de soros negativos e positivos e de conjugado (FONSECA et al, 2011; SOUZA et al, 2013). Nossos resultados mostraram que a concentração de 5 µg/mL de anti-IgG-PE e a diluição de 1:300 de anti-HBSAg-PE apresentaram as melhores intensidades de marcação. Vale a pena ressaltar que os conjugados A1 e A4 apresentaram resultados semelhantes para 2,5 µg/mL e 5 µg/mL, mas como a proposta do ensaio era desenvolver um método de controle de qualidade dos insumos e processos já utilizados em um kit de diagnóstico em desenvolvimento em Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, a concentração de 5 µg/mL foi escolhida visto que esta é a concentração

padronizada nos ensaios realizados com o kit mencionado acima. Em alguns casos o percentual de queda entre a mínima e a máxima concentração de acoplamento testada foi de 93% (conjugado A4) enquanto outro o conjugado B1 apresentou uma queda de apenas 22% da fluorescência (Quadro 2), mostrando o comportamento diferenciado de cada conjugado estudado. Quando nos concentramos na análise dos conjugados A, essa diferença de queda, intimamente relacionada com o brilho, demonstra nitidamente como existem diferenças entre lotes de um mesmo fabricante. Tais observações apontam para a necessidade de um controle rigoroso na escolha e padronização de conjugados utilizados em imunoenaios (VIGNALLI, 2000; ELSHAL; MACOY, 2006). Além disso, na citometria de fluxo pudemos observar parâmetros que não são considerados nas reações de imunoenaios, como perfis de marcação obtidos nos histogramas de PE e CVs dos picos de marcação. A avaliação desses parâmetros mostrou que, nas concentrações e diluições escolhidas para uso, os picos dos histogramas de PE apresentaram-se mais estreitos e os CVs foram menores em comparação às outras concentrações, demonstrando que tais condições propiciaram acoplamentos mais homogêneos, ou seja, microesferas com a mesma quantidade de conjugado acoplada. Tais observações apontam para a necessidade de um controle rigoroso desses anticorpos, que são considerados reagentes essenciais para o sucesso de kits multitestes em desenvolvimento (TIGHE et al, 2013).

Além da citometria de fluxo tradicional, muito tem se falado sobre a utilização de técnicas de quantificação de antígenos pela chamada citometria de fluxo quantitativa. A possibilidade de quantificar moléculas pela citometria de fluxo tem sido considerada um método promissor tanto na avaliação precisa de antígenos na imunoterapia (CHAN et al, 2007; RANDLEV et al, 2010), em HIV (LIU et al, 1997), leucemias (KAY et al, 2006; WANG et al, 2006, ROSSMAN et al, 2007), e transplantes (ISHIDA et al, 2010), assim como no estudo de variações de dados entre equipamentos e laboratórios (PANNU; JOE, IYER, 2001). No entanto, com exceção da utilização da CFQ para controlar a qualidade de equipamentos através da medição de calibração e linearidade dos citômetros (MITTAG; TÁRNOK, 2009) e a proposta de sua utilização na área de imunoterapia como ensaio imunológico de controle de qualidade para caracterização e liberação de terapias baseadas em células (RANDLEV et al, 2010), pouco tem sido proposto para essa técnica no

campo do controle de qualidade de insumos e processos. A partir das perspectivas levantadas, nos pareceu relevante e promissor avaliar se a CFQ poderia ser uma ferramenta para o controle de qualidade e monitoramento de conjugados fluorescentes utilizados em imunoenaios.

Para tal, o primeiro passo foi estabelecer os parâmetros de sensibilidade do equipamento (*settings*), etapa esta considerada fundamental para avaliações adequadas por CFQ (VOGT et al, 2000). Neste contexto, as voltagens dos fotomultiplicadores foram ajustadas no primeiro ponto de modo a obtermos os perfis indicados pelo fabricante. De fato, observamos uma queda das intensidades de fluorescência das populações de microesferas do kit de MESF entre o quarto e o sétimo mês das avaliações, o que foi apontado como uma variação na sensibilidade do canal de leitura de PE durante esse período, já que houve um restabelecimento dos valores após o oitavo mês. Vale a pena ressaltar que o equipamento utilizado durante o estudo sofreu uma manutenção preventiva justamente no final do sétimo mês, o que pode ter corrigido essa queda de sensibilidade observada no período acima. O restabelecimento das intensidades de fluorescência no oitavo mês apoia essa teoria, pois caso houvesse uma queda real da intensidade da PE das microesferas do kit, não teríamos observado novamente médias geométricas similares às encontradas antes desse período. Além disso, essa verificação corrobora resultados anteriores que mostram que qualquer variação durante a aquisição, a qual no nosso caso foi sistemática, pode interferir na avaliação pela CFQ (VOGT et al, 2000). Os dados acima também contribuem para enfatizar a importância da utilização da CFQ para avaliação de calibração e linearidade de equipamentos (GRATAMA et al, 1998; KELLAR; IANNONE, 2002; MITTAG; TÁRNOK, 2009). Nossos resultados mostraram também que não só a variação na sensibilidade do equipamento, mas a variação de lotes de kits de MESF podem provocar variações nas análises pela CFQ. As variações lote a lote de reagentes já têm sido descritas e apontadas como fator importante a ser considerado no desenvolvimento de protocolos para imunoenaios (GRATAMA et al, 1998; VOSKUIL 2014). No caso da CFQ, essa variação nas médias geométricas das microesferas do kit leva a um comprometimento ainda maior, pois o cálculo das MESF dos conjugados se baseia nas médias geométricas do kit e das médias dos próprios conjugados, fazendo com que essa variação se torne ainda maior quando

os dados são transformados em MESF. Por exemplo, avaliando-se os valores das microesferas do kit de diferentes lotes apresentado para o mês 10, a variação das médias geométricas provocou diferenças nos valores de MESF de um conjugado de 191.612 para 133.863 mostrando que mesmo uma variação na média geométrica de 64 para 80, 285 para 377 e 1420 para 1605 das microesferas #2, #3 e #4, respectivamente, podem alterar além do esperado o resultado do valor de MESF. Esses resultados demonstram que, para qualquer estudo de acompanhamento de valores de MESF, torna-se necessária a utilização de um mesmo lote do kit de MESF durante todo o período de estudo.

A avaliação das MESF dos conjugados durante os 18 meses de estudo mostrou o mesmo perfil do kit MESF PE com um declínio entre o quarto e o sétimo mês de avaliação, como já discutido anteriormente. No entanto, além dessa queda, os conjugados apresentaram um declínio progressivo durante os 18 meses, diferente do kit MESF PE. Isso mostrou que esse decaimento observado nos conjugados de fato representou uma queda na intensidade de fluorescência desses reagentes. Por serem muito brilhantes, os conjugados B2 e D não puderam ser avaliados pela CFQ, pois suas médias geométricas extrapolaram o último ponto da curva obtida com as microesferas do kit MESF e produziram resultados discrepantes. Para solucionar esse problema, uma alteração na sensibilidade do equipamento, com uma diminuição das voltagens dos fotomultiplicadores, poderia diminuir as médias geométricas desses conjugados. No entanto, como a nossa intenção era um estudo comparativo e de acompanhamento entre os conjugados, e sabendo que qualquer variação nos parâmetros de sensibilidade do aparelho alterariam as análises da CFQ (VOGT et al, 2000), não foi realizada qualquer tipo de alteração em tais parâmetros. Além disso, uma diminuição na sensibilidade do fotodetector da PE poderia acarretar em uma alteração no perfil dos picos das microesferas blank, #1, #2, #3 e #4, fazendo com que esses perfis ficassem diferentes das orientações descritas pelo fabricante. Outra possibilidade seria testar diferentes concentrações de acoplamento para esses conjugados, mas nossos resultados demonstraram que a diminuição da concentração também influencia o desempenho do acoplamento. Sendo assim, esses conjugados extremamente brilhantes foram avaliados e acompanhados durante o período determinado através da citometria de fluxo tradicional.

Com relação à avaliação do brilho e da estabilidade dos conjugados anti-IgG-PE, foi observada uma grande variação nas intensidades de fluorescência entre os fabricantes A e B. O conjugado B2 foi mais brilhante que todos os conjugados A, mas A1 foi o mais estável. Essa diferença entre conjugados é um fator importante a ser considerado, visto que tais diferenças podem provocar alterações nos resultados. Neste contexto, por exemplo, já foi descrito que a utilização de diferentes anticorpos de captura e revelação, entre estudos, pode levar a resultados distintos (ELSHAL; MCCOY, 2006). Disparidades entre brilho e estabilidade também foram observadas nos conjugados anti-HBSAg-PE onde o conjugado D se apresentou mais brilhante e estável que o conjugado C. Até conjugados de mesmo fabricante apresentaram grande variabilidade entre lotes. Alguns conjugados como A1 apresentaram bons resultados tanto de intensidade de fluorescência como de estabilidade. Outros conjugados, como A4, apresentaram boa estabilidade, mas intensidades de fluorescência menores. Todos esses resultados demonstram mais uma vez a grande variabilidade desses reagentes, e corroboram resultados anteriores que apontam para a necessidade de um cuidado rigoroso no desenvolvimento de métodos de controle de qualidade para imunoenaios (GRATAMA et al, 1998; VOSKUIL, 2014).

A sensibilidade em detectar moléculas alvo em imunoenaios está associada não só a especificidade da ligação antígeno-anticorpo, mas também a sensibilidade de detecção pela fluorescência. Diferente dos radioimunoenaios, os imunoenaios são mais simples, mais sensíveis, mais baratos e menos perigosos porque utilizam compostos fluorescentes e não radioisótopos (HEMPEN; KARST, 2006). Estabilidade e brilho são características importantes a serem levadas em consideração na escolha de anticorpos fluorescentes para imunoenaios, já que essas características afetam diretamente o potencial de detecção desses reagentes. Corantes fotoestáveis e mais brilhantes são ferramentas importantes para utilização em técnicas de marcação. Desta forma, estudos que visam avaliar características como fotoestabilidade e brilho são importantes para identificar o melhor conjugado a ser utilizado em imunoenaios (MAHMOUDIAN et al, 2011). Nossos resultados demonstraram que o estudo dessas características pode revelar não só o melhor conjugado a ser utilizado em termos de brilho e estabilidade, mas também as possíveis diferenças encontradas lote a lote de um mesmo fabricante.

Tanto na citometria de fluxo como em outras metodologias há estudos com o objetivo de aprimorar a detecção de partículas-alvo através da utilização de componentes fluorescentes mais brilhantes ou mais estáveis. Em estudos de imagem, por exemplo, foi demonstrado que corantes fluorescentes verdes têm menos efeito na afinidade do anticorpo, mas são menos estáveis que corantes vermelhos (HAYASHI-TAKANAKA et al, 2014). Em outro estudo, foi demonstrado que a utilização de determinadas substâncias em conjugados (no caso ciclodextrinas), pode aumentar a fluorescência desses reagentes em até 2,5 vezes (GURVEY et al, 2011) e que este aumento é dependente não só do tipo de corante, como da razão fluorocromo/proteína (razão F/P). A razão F/P é a medida proposta para avaliação da eficiência do processo de conjugação (HOLMES; LANTZ; RUSS, 1997, ROEDERER, 2004; MAHMOUDIAN et al, 2011; HAYASHI-TAKANAKA et al, 2014), apesar de sua aplicação como fator preditivo para escolha de conjugados para citometria de fluxo ser questionada. Segundo VOGT e colaboradores (2000), embora essa razão possa determinar o número de fluorocromos ligados à proteína, ela não necessariamente representa a emissão de fluorescência. Um fato importante a ser considerado é que não necessariamente conjugados com maiores razões F/P apresentam maiores intensidades de fluorescência. Pelo contrário. Altas razões F/P podem causar decréscimos acentuados na eficiência da fluorescência de conjugados, pois a proximidade das moléculas provoca uma transferência de energia entre elas (BRINKLEY, 1992). No presente estudo não foram realizadas avaliações pela espectrofotometria, pois em um primeiro momento não pretendíamos comparar tais técnicas, visto que os resultados não seriam comparáveis a partir do pressuposto de que a espectrofotometria não representa a emissão de fluorescência. Nem seria possível avaliar a razão F/P dos conjugados em questão para tentarmos fazer alguma correlação entre os dados de citometria e a razão F/P, pois para tal teríamos que ter a leitura da PE sozinha antes da conjugação, informação não fornecida pelo fabricante. A única comparação que pôde ser feita foi a de que o conjugado mais brilhante na citometria de fluxo (A1) também apresentou a maior DO na espectrofotometria. No entanto, os conhecimentos adquiridos durante esse estudo, indicam que em processos de conjugação realizados em nosso laboratório talvez a associação entre os resultados da espectrofotometria e da citometria de fluxo possam ser importantes para a padronização e estabelecimento de protocolos de controle de qualidade para

insumos e processos de conjugação. De fato, em ensaios prévios de conjugação de anticorpos a fluorocromos no nosso laboratório observamos que nem sempre a maior razão F/P ou a obtenção de uma razão F/P esperada nos protocolos de conjugação corresponderam a conjugados mais brilhantes na citometria de fluxo. Esses dados, mais uma vez demonstram que a inclusão de um método de controle de qualidade utilizando a citometria de fluxo pode ser fundamental para padronização de processos de conjugação e avaliação da eficiência desses processos bem como do grau de marcação dos anticorpos a fluorocromos.

A escolha de conjugados com corantes mais brilhantes e estáveis é uma ferramenta fundamental para o sucesso da detecção. É sabido que antígenos pouco expressos devem ser avaliados com conjugados ligados a corantes mais brilhantes para melhorar o grau de detecção (SHAPIRO, 2003; BERTHO; FERRAZ, 2013). Em relação às metodologias utilizadas nesse estudo, visando à utilização da citometria de fluxo como controle de qualidade de reações da metodologia de microarranjos líquidos, utilizando o equipamento LX200, apenas os fluorocromos PE, Alexa 532 ou cianina 3 (Cy3) já foram mencionados, não havendo maiores possibilidades de troca por corantes mais brilhantes ou mais fotoestáveis (PREMIER BIOSOFT, 2015). No entanto, pelos resultados apresentados aqui pudemos verificar que a avaliação de um mesmo corante, ou seja, a avaliação dos diferentes conjugados de PE, pode apresentar grande variabilidade e que a escolha do melhor conjugado pode melhorar a detecção da proteína alvo no ensaio.

A possibilidade de acoplarmos os conjugados diretamente às microesferas forneceu uma avaliação direta do comportamento desses reagentes sem possíveis interferências inerentes a uma reação de imunoensaio que pudesse comprometer a avaliação do conjugado (ELLINGTON et al, 2010). Além das características de estabilidade e brilho, essa metodologia possibilitou a visualização também dos acoplamentos. Parâmetros como perfis de histogramas, CVs, médias geométricas e MESF puderam ser utilizados para caracterizar a eficiência dos acoplamentos e as intensidades de fluorescência. A avaliação desses parâmetros forneceu dados novos antes não avaliados durante as técnicas normalmente empregadas. Os resultados mostraram que a citometria de fluxo através desses parâmetros pode fornecer dados importantes para o controle de insumos e de processos envolvidos em imunoensaios, sendo as características como intensidade de fluorescência, perfil

dos histogramas e coeficiente de variação dos picos de PE parâmetros fundamentais para a determinação do protocolo a ser utilizado. A marcação com anti-IgG-FITC, ainda não descrita em trabalhos, demonstrou que a queda de fluorescência pode ser diferenciada do desacoplamento das proteínas da superfície das microesferas. A manutenção da marcação de FITC nas amostras expostas à luz e a temperatura ambiente mostrou que os conjugados anti-IgG-PE ainda estavam acoplados as microesferas enquanto a redução da marcação de PE mostrou nitidamente que o fluorocromo PE sofreu uma queda da sua intensidade de fluorescência, fato este esperado visto que essas moléculas são fotossensíveis. Como um dos objetivos da tese era a avaliação da estabilidade dos conjugados, a comprovação da manutenção dos conjugados acoplados às microesferas era de fundamental importância para assegurar que a queda das intensidades de fluorescência de PE era relacionada ao fluorocromo, sendo essencial para validação dos estudos de estabilidade dos conjugados. Consideramos que esses resultados apontam para uma forte necessidade de adoção desta ferramenta na avaliação de estabilidade de conjugados, sendo necessária a adoção desta etapa no controle de qualidade de acoplamentos de conjugados a microesferas. A utilização das microesferas como suporte sólido propiciou a avaliação desses insumos tanto pela citometria de fluxo tradicional quanto pela CFQ. As diferenças observadas na comparação dos percentuais de queda da CFQ e da citometria tradicional mostraram mais uma vez que a avaliação contínua pela citometria tradicional neste caso ainda forneceu resultados mais claros e coerentes, apesar da CFQ ter se mostrado essencial e obrigatória para validação dos resultados da citometria de fluxo tradicional. Além disso, como ambas as metodologias fornecem dados diferentes em relação aos conjugados, e podem ser efetuadas simultaneamente sem inserção de etapas e processos que prejudiquem o andamento dos ensaios de controle, sugerimos a avaliação simultânea pela citometria de fluxo tradicional e a CFQ no que diz respeito aos estudos de brilho e estabilidade de conjugados fluorescentes.

Após os estudos dos conjugados acoplados às microesferas, realizamos o acoplamento de antígenos a essa partículas. Com relação aos resultados obtidos nesses estudos, nossos dados corroboraram observações anteriores que demonstraram a capacidade da citometria de fluxo em avaliar antígenos acoplados a

microesferas (VIGNALI, 2000; JANI et al, 2002; KELLAR; IANNONE, 2002; HSU; JOOS; KOGA, 2009; TAIT et al, 2009). Apesar de inúmeras aplicações, nenhum desses estudos teve como proposta a utilização da citometria como controle de qualidade de insumos e processos de imunoenaios.

As metodologias utilizando microesferas como suporte sólido para detecção de citocinas, antígenos e anticorpos tem despertado profundo interesse visto que fornecem a possibilidade de avaliar múltiplos analitos em uma única reação. Essa capacidade multiteste associada às características como alta capacidade de processamento, alta reprodutibilidade e sensibilidade e necessidade de pequeno volume de amostra tornaram esses ensaios uma das técnicas mais promissoras para avaliação de imunoenaios (JANI et al. 2002), tanto pela citometria fluxo como pela metodologia de microarranjos líquidos. No entanto, segundo Ellington e colaboradores (2010) ainda existe uma necessidade de materiais para o controle de qualidade de imunoenaios multiteste. Além disso, as microesferas utilizadas, geralmente funcionalizadas, com sua superfície revestida por carboxilas ou amins, potencialmente requerem um considerável controle de qualidade antes do uso assim como os anticorpos que devem ser altamente específicos e sensíveis (TIGHE et al, 2013).

Apesar da capacidade multiteste desses ensaios, todos os estudos foram realizados em ensaios únicos, pois o objetivo do trabalho foi avaliar os antígenos, seu comportamento e os possíveis controles passíveis de serem desenvolvidos pela citometria de fluxo. Mesmo apresentando essa capacidade multiteste toda a padronização da reação é feita primeiramente em ensaios únicos e depois em multitestes para associação das condições de todos os antígenos para um ensaio com múltiplos analitos (ELLINGTON et al, 2010).

A avaliação das diferentes condições de acoplamento mostrou que, tanto no FACSCalibur quanto no LX200, a ausência de NHS/EDC modificou o resultado dos acoplamentos de todos os antígenos. No caso de AgTc1 e AgTc2, tal ausência provocou uma acentuada queda da marcação, mostrando mais uma vez que esses reagentes são fundamentais para a manutenção das condições de acoplamento nesses antígenos (LUMINEX, 2008; DUNBAR; HOFFMEYER, 2013). Todos os resultados comparados ao acoplamento de 2 horas (padrão ouro) mostraram que o

aumento para 3 horas no caso dos antígenos Tc só foi capaz de aumentar a detecção no caso do AgTc1 e que a redução para ao acoplamento de 1 hora afeta alguns antígenos para mais ou para menos. Nos antígenos que apresentaram marcações maiores na ausência de EDC/NHS, o acompanhamento durante os 18 meses mostrou que a ausência desses reagentes não foi capaz de provocar uma resposta diferente em termos de estabilidade, ou seja, a resposta se apresentou a mesma por todo o tempo de estudo. Então, a interferência desses reagentes no acoplamento pode ser avaliada no ponto inicial, não influenciando na estabilidade no decorrer do tempo. Não só nos acoplamentos sem EDC/NHS, mas o acompanhamento de todas as condições mostrou que nenhuma delas teve seu comportamento alterado durante o período de avaliação indicando que todas apresentaram o mesmo perfil de estabilidade. Isso é importante, pois caso uma condição fosse mais estável que a outra, talvez para um kit diagnóstico a estabilidade fosse uma característica mais importante do que os valores de fluorescência observados, desde que isso não resultasse no comprometimento da sensibilidade e especificidade do teste. Como o intuito da padronização é atingir as melhores condições para todos os antígenos (YIGITBASY, 2012) para unificação e redução de possíveis erros, nossos resultados mostraram mais uma vez que o acoplamento de 2 horas na presença de EDC/NNHS é a melhor escolha para um ensaio múltiplo com todos os antígenos (LUMINEX, 2008; DUNBAR; HOFFMEYER, 2013). Com exceção do AgTc2, que não apresentou diferença estatisticamente significativa na leitura do acoplamento de 1 hora no Luminex, todos os resultados encontrados no FACSCalibur foram iguais aos obtidos no LX200. Desta forma, os resultados demonstraram que a citometria foi capaz de detectar reações utilizando microesferas magnéticas utilizadas no equipamento LX200 como suporte para imunoenaios, fato esse questionado anteriormente e apontado, inclusive, como desvantagem, já que a necessidade de leitores específicos como o LX200, por exemplo, poderia limitar os custos e a utilidade e disponibilidade da tecnologia (TIGHE et al, 2013).

Os resultados também demonstraram como a técnica de avaliação de antígenos acoplados às microesferas é sensível e como fatores durante a reação podem influenciar o resultado obtido, já descrito anteriormente em relação aos imunoenaios em geral (Ellington et al, 2010). Durante os 18 meses de avaliação,

alguns resultados discrepantes foram observados em alguns pontos. Nesses casos as reações diferiram totalmente dos perfis apresentados no ponto anterior retomando a tendência novamente no ponto seguinte. Por exemplo: na avaliação do 2º mês, o AgHIV não apresentou resposta tanto no FACSCalibur quanto para o LX200. Essa ausência de resposta para todos os poços pode significar a não adição do soro ou de conjugado nessa coluna visto que nenhum dos equipamentos detectou reação. Na avaliação do 17º mês, vários antígenos apresentaram alteração nos resultados obtidos tanto no FACSCalibur quanto no LX200. Provavelmente nesse caso algum fator como conjugado, diluição de amostra, lavagem, ou outro podem ter influenciado a reação. Além disso, alguns antígenos apresentaram resultados discrepantes apenas nos resultados obtidos no LX200. Nesse caso, vale a pena ressaltar que a reação lida no LX200 representa a reação de um único poço, a qual pode sofrer muito mais discrepâncias do que as leituras realizadas no FACSCalibur que representam o somatório de 7 reações. Quando as duas técnicas foram comparadas, foi verificada uma tendência a resultados mais homogêneos quando a mesma amostra foi lida no citômetro e no LX200. Portanto, as discordâncias observadas entre as avaliações no FACSCalibur e no LX200 apontam muito mais para variações inerentes às técnicas aplicadas do que diferenças significativas entre os equipamentos. O desenvolvimento de uma técnica para controle da qualidade de acoplamento e estabilidade de antígenos e/ ou conjugados alcançada nesta tese e a comparação estatística dos equipamentos denota a importância deste controle realizado no citômetro de fluxo. A falta de correlatos científicos neste tema indica, por um lado, a forte necessidade de dados como os aqui apresentados, e por outro, dificulta a discussão de outras possíveis abordagens.

Em relação aos estudos de estabilidade, não houve diferença entre os dados obtidos no FACSCalibur e no LX200. O AgTc1 foi o mais estável nas duas metodologias enquanto AgHTLV e AgHCV foram os menos estáveis. O AgTc1 apresentou os resultados mais oscilatórios nos dois equipamentos, sendo que, no caso do LX200, também foi observada grande oscilação nas respostas do AgTp. Para entender as possíveis causas para essas variações, talvez estudos comparativos com diferentes soros possam avaliar se essas alterações são inerentes às respostas antígeno-anticorpo de cada reação ou a um fator inerente as

próprias condições da reação. Talvez a presença de algum componente nos soros escolhidos possa ter induzido essa variação nas respostas (KELLAR; IANNONE, 2002). Em geral, a estabilidade das reações não apresentou resultados satisfatórios, mas estudos complementares são necessários para avaliar se essa queda nas reações para os antígenos são capazes de alterar os resultados do teste como diagnóstico. O presente trabalho não teve como objetivo avaliar o potencial diagnóstico nas metodologias, mas sim avaliar se a citometria de fluxo poderia ser utilizada como ferramenta para o controle de qualidade das reações de microarranjos líquidos visto que esta, até o momento, tem como controle de qualidade as próprias reações lidas no LX200. Como a citometria de fluxo pode fornecer elementos diferentes dos observados nos ensaios utilizando o LX200, como por exemplo histogramas de marcação e CVs, a inserção dela pode prover dados importantes para a padronização da avaliação de acoplamento de antígenos às microesferas assim como o acompanhamento da estabilidade desses acoplamentos e de suas reações.

Embora todos os antígenos tenham mostrado uma estabilidade fraca para as duas metodologias com percentuais de queda acima de 37% para FACSCalibur e 41% para o LX200 após 18 meses de avaliação e quedas semelhantes em cada antígeno, o estudo comparativo entre todos os resultados obtidos em cada metodologia mostrou que as tendências de queda dos antígenos, com exceção dos antígenos Tc1 e Tc2, foram estatisticamente diferentes entre as duas metodologias. De fato, a análise dos dados numéricos mostrou que cada metodologia apresentou uma resposta em cada ponto, sendo a queda não linear tanto entre os antígenos quanto entre metodologias. Nos gráficos de dispersão observamos, não só a tendência de queda entre metodologias, mas novamente pudemos observar que os resultados obtidos no LX200 se apresentaram muito mais dispersos que os resultados obtidos no FACSCalibur.

Em resumo, podemos concluir, através dos resultados apresentados nesse trabalho, que a citometria de fluxo utilizando microesferas como suporte sólido demonstrou ser uma ferramenta importante para avaliação de anticorpos ligados a fluorocromos, bem como o estudo de antígenos e suas reações com seus anticorpos específicos. Além disso, esta técnica permitiu a avaliação de processos como conjugações de fluorocromos a anticopos e acoplamentos de proteínas a

microesferas. Em suma, o método citofluorimétrico apresentado neste trabalho pode ser utilizado para o desenvolvimento e padronização de protocolos de controle de qualidade para insumos e processos que utilizem conjugados fluorescentes e imunoenaios.

6 CONCLUSÕES

- Os diferentes códigos de microesferas não influenciaram na detecção da PE dos conjugados e a concentração 5 µg/mL de anti-IgG-PE e a diluição de 1:300 para anti-HBSAg-PE foram as condições mais homogêneas de acoplamento;
- A variabilidade na intensidade de fluorescência e na estabilidade dos conjugados entre os diferentes fabricantes e entre lotes de mesmo fabricante demonstraram a importância de um controle mais rigoroso desses insumos;
- A marcação com anti-IgG-FITC, ainda não descrita, mostrou ser eficiente na diferenciação entre queda de acoplamento e a queda de fluorescência do conjugado acoplado;
- A CFQ se mostrou necessária para avaliação de linearidade do equipamento e dos resultados obtidos durante o acompanhamento dos insumos, sendo sua utilização para avaliação de conjugados recomendada em fluorocromos cujo brilho não ultrapasse a curva da MESF utilizada;
- A citometria de fluxo se mostrou eficiente na detecção dos ensaios da metodologia de microarranjos líquidos, os quais são comumente desenvolvidos para leitura em equipamentos fechados como o LX200;
- A avaliação das diferentes condições de acoplamento corroborou resultados anteriores mostrando que o acoplamento de 2 horas na presença de EDC/NHS foi a condição que forneceu resultados satisfatórios para todos os antígenos estudados;
- Houve uma diferença considerável na estabilidade das marcações dos diferentes antígenos, existindo uma diferença entre as tendências de queda dos antígenos, assim como nos perfis de resposta, entre as avaliações realizadas no FACSCalibur e no LX200. Devido a maior homogeneidade dos resultados obtidos no FACSCalibur, concluímos que a metodologia de controle de qualidade deve ser desenhada de acordo com os ensaios feitos no citômetro de fluxo.
- Em resumo, a citometria de fluxo mostrou ser uma ferramenta bastante importante para a avaliação e controle de qualidade de conjugados, antígenos, acoplamentos e reações de microarranjos líquidos, podendo ser aplicada em outros estudos que visem a avaliação e controle de qualidade desses insumos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. et al. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

ABDSEROTEC HOME PAGE. Desenho esquemático do citômetro de fluxo. Disponível em <<http://www.abdserotec.com>>. Acesso em maio 2015

ALKAN, S.S. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. **Nature Reviews**, v. 4, n. 2, p. 153-156, 2004.

ALMEIDA, A. **Antígenos**. Disciplina de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal. Disponível em <http://www.medicina.fba.br/imuno/roteiros_imuno/Roteiro%20de%20ant%C3%ADgenos%2002-1.pdf>. Acesso em julho de 2015.

BANGS LABORATORIES INC. HOME PAGE. Gráficos representativos da análise de MESF utilizando o kit Quantum R-PE MESF. Disponível em <http://www.bangslabs.com>. Acesso em setembro de 2014.

BARTH, T. et al. Validation of the normocythemmic mice bioassay for the potency evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical formulations. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 2, p. 285-291, 2008.

BERTHO, A.L.; FERRAZ, R. Citometria de Fluxo: princípios metodológicos de funcionamento. In: SALES, M.M.; MORAES-VASCONCELOS, D. **Citometria de Fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p 3-19.

BLOPIG HOME PAGE. Estrutura Esquematizada de uma molécula de anticorpo. Disponível em <<http://www.blopig.com>>. Acesso em maio 2015

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 set. 1976.

BRINKLEY, M. A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. **Bioconjugate Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 2-13, 1992.

CAREY, J.L.; OLDAKER, T.A. More than Just Quality Control. **Clinics Laboratory Medicine**, v. 27, n. 3, p. 687-707, 2007.

CHAN, H.E.H. et al. Quantification of Surface Antigens and Quantitative Flow Cytometry. **Methods in Molecular Biology**, v. 378, p. 65-69, 2007.

COMAS-RIU, J.; RIUS, N. Flow cytometry applications in the food industry. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 999–1011, 2009.

D'HAUTCOURT, J.-L. Quality control procedures for flow cytometric applications in hematology laboratory. **Hematology Cell Therapy**, v. 38, n. 6, p. 467-470, 1996.

DOS SANTOS et al. Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 29, n. 2, p. 77-85, 2006.

DOJINDO HOME PAGE. Esquema de ligação da R-PE ao anticorpo. Disponível em <<http://www.dojindo.com>>. Acesso em maio 2015

DUNBAR A.S.; HOFFMEYER, M.R. Microsphere-based multiplex immunoassays: development and applications using Luminex® xMAP® technology. In: JOHN, R.; SHEEHAN, C.; BINDER, S.; HE, J. (Ed). **The Immunoassay Handbook**. Oxford: Ed. Elsevier; 2013. p. 157-174.

EBIOSCIENCE HOME PAGE. Etapas da reação microarranjos líquidos. Disponível em <<http://www.ebioscience.com>>. Acesso em maio 2015

ELLINGTON, A.A. et al. Antibody-Based Protein Multiplex Platforms: Technical and Operational Challenges. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 186-193, 2010.

ELSHAL, M.F.; MCCOY, J.P. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 317-323, 2006.

FONSECA, B.P.F. et al. Development of a Multiplex Bead-Based Assay for Detection of Hepatitis C Virus. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 5, p. 802-806, 2011.

GALFRE, G. et al. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. **Nature**, v. 266, n. 5602, p. 550-552, 1977.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, E. et al, Thermal and pH Stability of the B-Phycoerythrin from the Red Algae *Porphyridium cruentum*. **Food Biophysics**, v. 9, n. 2, p. 184-192, 2014.

GRATAMA, J.W. et al. Flow Cytometric Quantitation of Immunofluorescence Intensity: Problems and Perspectives. **Cytometry Part A**, v. 33, n. 3, p. 166-178, 1998.

GRITZAPIS A.D. et al. Quantitative fluorescence cytometric measurement of estrogen and progesterone receptors: correlation with hormone binding assay. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, n. 1, p.1-13, 2003.

GURVEY, O. et al. Control of the Fluorescence of Dye-Antibody Conjugates by (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin in Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 18, p. 7109-7114, 2011.

HAYASHI-TAKANAK et al. Evaluation of Chemical Fluorescent Dyes as a Protein Conjugation Partner of Live Cell Imaging. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, e106271, 2014.

HEMPEN, C.; KARST, U. Labeling strategies for bioassays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 3, p. 572-583, 2006.

HENDERSON. L.O. et al. Terminology and Nomenclature for Standardization in Quantitative Fluorescence Cytometry. **Cytometry Part A**, v. 33, n. 2, p. 97-105, 1998.

HOLMES, K.L.; LANTZ, L.M.; RUSS, W. Conjugation of Fluorochromes to Monoclonal Antibodies. **Current Protocols in Cytometry**, Chapter 4 (Unit 4..2). doi: 10.1002/0471142956.cy0402s00, 1997.

HSU, H-Y; JOOS, T.O.; KOGA, H. Multiplex microsphere-based flow cytometric platforms for protein analysis and their application in clinical proteomics – from assays to results. **Electrophoresis**, v. 30, n. 23, p. 4008-4019, 2009.

ISHIDA, H. et al. Significance of qualitative and quantitative evaluations of anti-HLA antibodies in kidney transplantation. **Transplant International**, v. 24, n. 2, p. 150-157, 2010.

JANI I.V. et al. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resources-poor settings. **The Lancet Infectious Disease**, v. 2, n. 4, p. 243-250, 2002.

JUNG, K.M. et al. Comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in non-radioisotopic murine lymph node assay using bromodeoxyuridine. **Toxicology Letters** v. 192, n. 2, p. 229-237, 2010.

KAY, S. et al. Quantitative Flow Cytometry of ZAP-70 Levels in Chronic Lymphocytic Leukemia Using Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome. **Cytometry Part B**, v. 70B, n. 4, p. 218-226, 2006.

KELLAR, K.L.; IANNONE, M.A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 11 p. 1227-1237, 2002.

KINGSMORE, S.F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 4, p. 310–320, 2006.

KÖHLER, G; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

LENG S.X. et al. ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. **The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medicine Sciences**, v. 63, n. 8, p. 879-884, 2008.

Li, F. et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production. **Monoclonal Antibodies**, v. 2, n. 5, p. 466-477, 2010.

LIFE TECHNOLOGIES HOME PAGE. Estrutura Esquemática de uma molécula de anticorpo. Disponível em <<https://www.lifetechnologies.com>>. Acesso em maio 2015

LIU, Z. et al. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology**, v. 16, n. 2, p. 83-92, 1997.

LO, M.M.S. et al. Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. **Nature**, v. 310, n. 5980, p. 792 – 794, 1984.

LYSÁK, D. Interlaboratory variability of CD34+ stem cell enumeration. A pilot study to national external quality assessment within the Czech Republic. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 32, n. 6p1, p. e229-e236, 2010.

LUMINEX CORPORATION. **Luminex advanced applications training**. Austin, 2008. 65p.

MAHMOUDIAN, J. et al. Comparison of the Photobleaching and Photostability Traits of Alexa Fluor 568- and Fluorescein Isothiocyanate- conjugated Antibody. **Cell Journal**, v. 13, n. 3, p. 169-172, 2011.

MAYR, T.; MOSER, C.; KLIMANT, I. Performance of Fluorescent Labels in Sedimentation Bead Arrays – A Comparison Study. **Journal of Fluorescence**, v. 19, n. 2, p. 303-310, 2009.

MITTAG, A.; TÁRNOK, A. Basics of standardization and calibration in cytometry – a review. **Journal of Biophotonics**, v. 2, n. 8-9, p. 470-481, 2009.

MOBARREZ, F. et al. A multicolor flow cytometric assay for measurement of platelet-derived microparticles. **Thrombosis Research**, v. 125, n. 3, p. 110-116, 2010.

MUNIER, M. Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*. **Food Chemistry**, v. 150, n. 1, p. 400-407, 2014.

PANNU, K.K.; JOE, E.T.; IYER, S.B. Performance Evaluation of QuantiBRITE Phycoerythrin Beads. **Cytometry**, v. 45, n. 4, p. 250-258, 2001.

PATSENKER, L. et al. Fluorescent Probes and Labels for biomedical Applications. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1130, p. 179-187, 2008.

PREMIER BIOSOFT HOME PAGE. **PrimerPlex**. Disponível em <<http://premierbiosoft.com/primerplex/xTAG.html>>. Acesso em junho de 2015.

RANDLEV, B. et al. Validation of a quantitative flow cytometer assay for monitoring HER-2/neu expression level in cell-based cancer immunotherapy products. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p 249-259, 2010.

REILLY, J.T. Use and evaluation of leukocyte monoclonal antibodies in the diagnostic laboratory: a review. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 1996.

RIGATO, P.O.; BRITO, C.A. Quantificação de antígenos de superfície celular e ensaios multiplex. In: SALES, D.M.; MORAES-VASCONCELOS, D. **Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 35-42.

ROEDERER, M. **Conjugation of monoclonal antibodies**. 2004. Disponível em <http://www.drmmr.com/abcon>.

ROSSMAN, E.D. et al. Performance of Calibration Standards for Antigen Quantitation with Flow Cytometry in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cytometry Part B**, v. 72B, n. 6, p. 450-457, 2007.

SALES, D.M.; MORAES-VASCONCELOS, D. **Citometria de fluxo: aplicações no laboratório clínico e de pesquisa**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

SCHWARTZ, A. et al. Quantitating Fluorescence Intensity from Fluorophore: The Definition of MESF Assignment. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 107, n. 1, p. 83-91, 2002.

SHAPIRO, H.M. **Practical flow cytometry**. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 2003.

SOHIER D. et al. Evolution of microbiological analytical methods for dairy industry needs. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. 16, doi: 10.3389/fmicb.2014.00016, 2014.

SCHMIDT, C. The purification of large amounts of monoclonal antibodies. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2-3, p. 235-252, 1989.

SHUKLA et al. Downstream processing of monoclonal antibodies – Application of platform approaches. **Journal of Chromatography**, v.848, n. 1, p. 28-39, 2007.

SOUSA, S. et al. Development of a Fluorescent Based Immunosensor for the Serodiagnosis of Canine Leishmaniasis Combining Immunomagnetic Separation and Flow Cytometry. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2371, 2013.

SOUZA, P.S.V. Padronização de uma metodologia de ensaio na plataforma de microarranjos líquidos utilizando sífilis como modelo. In: Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos, 3., 2015, Rio de Janeiro. **Anais do III Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos**. Rio de Janeiro, 2015. p. 132-133.

TAIT, B.D. et al. Review article: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. **Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 247-254, 2009.

TETIN, S.Y; STROUPE, S.D. Antibodies in diagnostic applications. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 9-16, 2004.

TIGHE, P. et al. Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits. **Methods**, v. 61, n. 1, p. 23-29, 2013.

VIGNALI, D.A.A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 243-255, 2000.

VOGT Jr R.F. et al. Fluorescence Intensity Calibration for Immunophenotyping by Flow Cytometry. **Methods**, v. 21, n. 3, p. 289-296, 2000.

VOSKUIL, J.L.A. **Commercial antibodies and their validation**. F1000Research, v. 3, p. 232, 2014. Disponível em <http://f1000r.es/43b> (doi: 10.12688/f1000research.4966.1).

WANG, L. et al. Quantitating Fluorescence Intensity From Fluorophores: Practical Use of MESF Values. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 107, n. 4, p. 339-353, 2002.

WANG, L. et al. Comparison of Fluorescein and Phycoerythrin Conjugates for Quantifying CD20 Expression on Normal and Leukemic B-Cells. **Cytometry Part B**, v. 70B, n. 6, p. 410-415, 2006.

WANG, L. Toward Quantitative Fluorescence Measurements with Multicolor Flow Cytometry. **Cytometry Part A**, v. 73A, n. 4, p. 279-288, 2008.

WEI, X. Development and validation of a quantitative cell-based bioassay for comparing the pharmacokinetic profiles of two recombinant erythropoietic proteins in serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 666-676, 2007

WEINER, L.M.; SURANA, R.; WANG, S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 317-327, 2010.

WICZLING, P.; AIT-LOUDHIA, S.; KRZYZANSKI, W. Flow cytometric analysis of reticulocyte maturation after erythropoietin administration in rats. **Cytometry Part A**, v. 75, n. 7, p. 584-592, 2009

YIGITBASI, T. **Multiplex Immunoassay and Bead Based Multiplex**. **Trends in Immunolabelled and Related Techniques**, p. 351-360, 2012. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/trends-in-immunolabelled-and-related-techniques/beam-based-multiplex>.