

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO FIOCRUZ**

LAÍS HIGINIO DORO

**USO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO
IMUNOTOXICOLOGIA DE AMOSTRAS DE ROEDORES E HUMANOS**

RIO DE JANEIRO

2018

LAIS HIGINO DORO

**USO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO EM ESTUDOS DE
IMUNOTOXICOLOGIA EM ROEDORES E HUMANOS**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde da Fundação Oswaldo Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de especialista em Vigilância Sanitária.

Tutor: Dr. Fábio Coelho Amendoeira

Preceptor: Dr. Fausto Klabund Ferraris

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Doro, Laís Higinio

Uso da técnica de citometria de fluxo em estudos de imunotoxicologia em roedores e humanos. / Laís Higinio Doro. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2018.

51 f., il., tab.

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Tutor: Fábio Coelho Amendoeira

Preceptor: Fausto Klabund Ferraris

1. Citometria de Fluxo. 2. Linfócitos. 3. Imunofenotipagem. I. Título

Laís Higino Doro

**USO DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO EM ESTUDOS DE
IMUNOTOXICOLOGIA EM ROEDORES E HUMANOS**

Trabalho final de conclusão de curso, apresentado ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde da Fundação Oswaldo Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de especialista em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___/___/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Luiz Lima Brandão

Instituto Nacional de Controle de Qualidade

Dra. Renata Faria de Carvalho

Instituto Nacional de Controle de Qualidade

Dr. Fábio Coelho Amendoeira - Orientador

Instituto Nacional de Controle de Qualidade

As pessoas que conheci e com quem convivi no INCQS ao longo desses dois anos.

AGRADECIMENTOS

Nenhuma batalha é vencida por um soldado só. No decorrer desses anos tive a honra de conhecer e trabalhar com pessoas maravilhosas. Agradeço a todos pelo conhecimento e experiência adquiridos.

Obrigada aos meus orientadores, por toda paciência e tempo para ensinamentos. E a todos os demais colegas de laboratório que hoje posso chamar de amigos. Agradeço não só a experiência profissional, mas também cada risada compartilhada.

Agradeço aos profissionais do IJV. Foram três meses muito agradáveis os quais muito aprendi. Obrigada pelo carinho com o qual me receberam e toda a atenção. Obrigada a Vigilância Sanitária municipal pela oportunidade desse treinamento.

Agradeço a coordenação do curso pela dedicação e resolução dos nossos problemas. Obrigada pois esse curso existe graças a vocês.

Agradeço aos professores que pararam suas atividades para ministrar as disciplinas.

Obrigada a minha família por todo apoio durante toda minha trajetória acadêmica.

“Para um espírito científico todo conhecimento é uma resposta a uma pergunta. Se não existe pergunta não pode haver conhecimento científico. Nada vem sozinho, nada é dado. Tudo é construído. ”

Gaston Bachelard

RESUMO

O avanço nas áreas de toxicologia e imunologia associadas a novas descobertas sobre desordens sistêmicas vêm possibilitando estudos mais profundos relacionados a processos patológicos. A população está cada dia mais exposta a diversos tipos de produtos químicos de uso diário, seja pela alimentação, respiração, contato ambiental ou uso de cosméticos. A exposição diária a substâncias químicas com potencial tóxico pode gerar diversos prejuízos à saúde da população. Por isso, é necessário realizar pesquisas em torno de metodologias que são capazes de avaliar alterações nos indivíduos expostos, pois o diagnóstico precoce de doenças pode facilitar tratamentos e evitar agravos. A Citometria de Fluxo (CF) tem sido o método preferencial para a determinação do status de populações celulares, sendo largamente utilizada na análise de alterações em células sanguíneas. O objetivo desse trabalho foi implantar a metodologia de imunofenotipagem da análise de células (de murinos ou humanos) no Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) por CF, observando parâmetros das populações de linfócitos T CD3+ (linfócitos T totais) e subpopulações CD4+ (linfócitos T helper ativados ou não ativados) e CD8+ (linfócitos T citotóxicos) para avaliação imunofenotípica de exposição a agentes imunomoduladores. Foram analisadas amostras de dois projetos os quais visam avaliar influência de compostos tóxicos no sistema imune. O primeiro avaliou amostras de sangue periférico de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno comparados a trabalhadores não expostos. O segundo analisou células de triturado de baço retirado de grupos de camundongos expostos ao octil metoxinamato, propiltiouracil e ao óleo de milho. Ambos os experimentos mostraram razões LT CD4+/CD8+ menores em grupos expostos as substâncias estudadas que o grupo Controle (indivíduos não expostos). A Citometria de Fluxo se mostrou uma metodologia segura para o diagnóstico de alterações imunológicas e eficiente para os estudos realizados. O DFT encontra-se apto a disponibilizar o serviço para pedidos externos, o qual possui a expertise para execução da análise.

Palavras Chaves: Citometria de Fluxo. Linfócitos. Imunofenotipagem.

ABSTRACT

The advances in areas such as toxicology and immunology associated with new findings about systemic disorders are enabling deeper studies related to pathological processes. The population is each day more exposed to several types of chemicals products, whether through food, breathing, environmental contact or the use of cosmetics. This exposure is potentially harmful the population's health. Therefore, it is necessary to conduct researches on methods which are able to evaluate on exposed individuals body alterations since the early diagnosis can facilitate treatments and prevent diseases. The preferred method for determining cell's populations' status has been Flow Cytometry; and it is very usefull on blood cell changes analysis. The objective of this work was to implement the immunophenotyping methodology of the cell analysis (of murine or human) in the Laboratory of Pharmacology of DFT by Flow Cytometry, observing parameters of T CD3+ lymphocytes (total T lymphocytes) and CD4+ subpopulations (activated helper T lymphocytes or non-activated) and CD8+ (cytotoxic T lymphocytes) to immunophenotypic evaluation of exposure to immunomodulatory agents. Two projects were analyzed to evaluate the influence of toxic compounds on the immune system. The first project, evaluated peripheral blood samples from workers exposed occupationally to benzene compared to non-exposed group. The second analyzed spleen cells from mice exposed to octyl methoxymate, propylthiouracil and non-exposed group. Both experiments showed lower CD4 + / CD8 + LT in groups exposed to substances studied than the Control group (note not exposed). The Flow Cytometry proved to be an safe auxiliary methodology and efficient on diagnosis of the studies performed. The DFT is able to provide the cytometry service for external applications to the pharmacology laboratory, which has the apparatus, execution capacity and the protocol for analysis.

Key Words: Flow Cytometry. Lymphocytes. Immunophenotyping.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema demonstrativo de funcionamento do citômetro	16
Figura 2 - Esquema demonstrativo dos receptores do citômetro	17
Figura 3 - Representação do Histograma	17
Figura 4 - Dot Plot mostrando localização das populações de Granulócitos e Mononucleares	18
Figura 5 - Dot Plot ilustrativo: Representação da distribuição das células contidas no gate selecionado	19
Figura 6 - Mapa representando os laboratórios que compõem a Rede Nacional de Laboratórios para contagem de linfócitos T CD4+	23
Figura 7 – Aparelho Citômetro modelo BD FACSCalibur Bench-top Analyzer utilizado para citometria	36
Figura 8 – Aparelho Citômetro modelo CyFlow® Space utilizado para citometria	37
Figura 9 - Gráfico com resultado das medidas das populações de linfócitos T CD3+	38
Figura 10 - Gráfico com resultado médio da razão de células T CD4+/T CD8+	40
Figura 11 - Gráfico Dot Plots representativos dos grupos estudados com marcações para T CD4+ e T CD8+	41
Figura 12 - Gráfico mostrando a relação LT CD4/LT CD8 nos diferentes grupos expostos ao OMC	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos utilizados na marcação de sangue periférico humano FACSCalibur™	35
Tabela 2- Anticorpos utilizados na marcação de triturado de baço murino CyFlow® Space	35

LISTA DE SIGLAS

APC	Células Apresentadoras de Antígenos
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BZF	Benzofenona
CD	Grupamento de diferenciação, do inglês, cluster of differentiation
CF	Citometria de Fluxo
DFT	Departamento de Farmacologia e Toxicologia
DPN	Dia Pós-natal
EPM	Erro padrão da média
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FSC	Forward Scatter
HCDM	Human Cell Differentiation Molecules
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês Human Immunodeficiency Virus
HLDA	Human Leucocyte Differentiation Antigens
HPV	Vírus do Papiloma Humano
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LB	Linfócitos B
LL	Low Left
LR	Low Right
LT	Linfócitos T
ml	Mililitro
MBC	Metilbenzilideno cânfora
mg	Miligrama
OMC	Octil Metoxinamato

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Fosfato-Salino (Phosphate-buffered saline)
PTU	Propiltiouracil
RPM	Rotações por minuto
SSC	Side Scatter
T3	Tri-iodotironina
T4	Tetra-iodotironina/ Tiroxina
TCR	Receptores de células T
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRH	Hormônio Tireotrófico/ Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio Tireoestimulante
UL	Up Left
UR	Up Right
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Imunofenotipagem.....	15
1.1.1	Citometria de fluxo.....	15
1.2	Sistema imune.....	20
1.2.1	Os linfócitos.....	20
1.2.2	Anticorpos monoclonais.....	23
1.3	O Benzeno.....	25
1.4	Octil Metoxinamato (OMC).....	28
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo geral.....	31
3.2	Objetivo específico.....	31
4	MÉTODO.....	32
4.1	Amostras humanas.....	32
4.2	Amostra Murina.....	33
4.3	Marcação de superfície.....	34
4.4	Análise por Citometria de Fluxo.....	36
4.5	Análise estatística dos dados.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1	Resultados das análises de sangue humano.....	38
5.2	Resultados das análises de triturado de baço.....	41
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O avanço nas áreas de toxicologia e imunologia junto com novas descobertas sobre desordens sistêmicas vêm possibilitando mais estudos relacionados a processos patológicos. A população está cada dia mais exposta a diversos tipos de produtos químicos potencialmente tóxicos de uso diário, seja pela alimentação, respiração, contato ambiental ou uso de cosméticos. A exposição a agentes tóxicos se tornou um tema importante no âmbito das políticas de saúde, pois nem sempre as pessoas expostas possuem o conhecimento do potencial danoso que esses agentes possuem (D'ALASCIO, 2014). A exposição diária as substâncias capazes de provocar alterações diversas no organismo podem gerar modificações no sistema imune (GIL, 2011). Por isso, é necessário realizar pesquisas em torno de metodologias capazes de detectar mudanças na imunidade dos indivíduos expostos e quanto aos tipos de alterações geradas nesse organismo.

1.1 Imunofenotipagem

Para a investigação de determinadas alterações patológicas no organismo, utilizam-se diferentes técnicas de imunofenotipagem (MARTINS E GAGLIANI, 2008). Uma técnica muito comum é o uso da Citometria de fluxo para identificação de células as quais emitem fluorescência artificial. Isso pode ocorrer por uso de substâncias fluorescentes ou fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais os quais se ligam a superfície ou ao interior das células (FEERAZ e BERTHO, 2005).

A Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo é uma ferramenta para o diagnóstico e monitorização de neoplasias hematológicas (BAPTISTA, 2012).

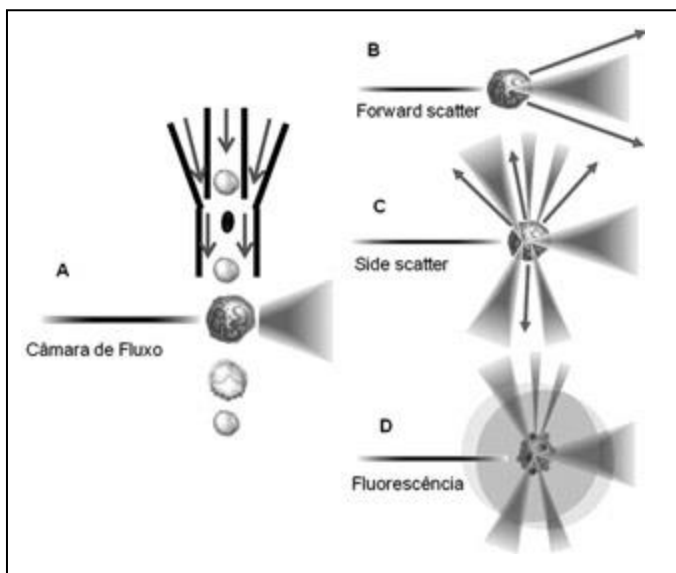
1.1.1 Citometria de fluxo

A Citometria de Fluxo (CF) é uma técnica que permite a determinação de diversos parâmetros simultaneamente baseados nas propriedades físicas de partículas microscópicas, as quais se encontram suspensas em um meio líquido isotônico e em fluxo, como células. A combinação de diferentes marcadores possibilita uma análise multiparamétrica rica que vem sendo aplicada nas mais diversas áreas de conhecimento. O Citômetro possibilita separar, contar, examinar e

classificar partículas microscópicas, como células (BRAGA, 2016). Para isso, o aparelho emite um feixe luminoso (laser) que ao incidir sobre a célula, reflete luz para os detectores que captam informações como tamanho, granulosidade e fluorescência (Figura 1). Através do uso de anticorpos monoclonais específicos ligados a um fluorocromo é possível realizar uma análise multiparamétrica, através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida e as respectivas características morfológicas das células (SILVA, 2009) (Figura 2). Essa ferramenta em estudos pré-clínicos e clínicos pode ser útil no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da evolução de doenças (BRAGA, 2016).

O citômetro possui um sistema eletrônico capta os sinais ópticos e os converte em sinais eletrônicos, intermediado do sistema analógico para o sistema digital, com a reprodução do FSC (indicador de tamanho), SSC (indicador de granulosidade) e sinais fluorescentes (BRAGA, 2016). Todos esses parâmetros (FSC, SSC e canais de fluorescência) são chamados de parâmetros brutos ou primários, que são plotados na forma de gráficos. Quando apenas um parâmetro é avaliado, a representação gráfica mais utilizada é um histograma (FIGURA 3) que expressa o número de células ou partículas para cada valor do parâmetro em questão. Quando dois parâmetros são analisados simultaneamente (FSC e SSC, por exemplo) uma representação alternativa é o gráfico de dispersão (FIGURA 4). (FRELINGER et al., 2010).

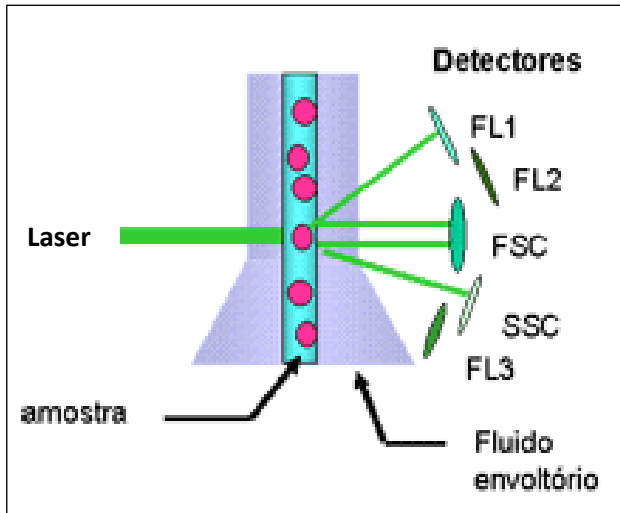
Figura 3 - Esquema demonstrativo de funcionamento do citômetro



Fonte: Carvalho et al, 2012.

FIGURA 1: A imagem "A" Mostra o laser que ao incidir sobre a célula, reflete de acordo com o tamanho "B", granulosidade "C" e fluorescência "D" da amostra.

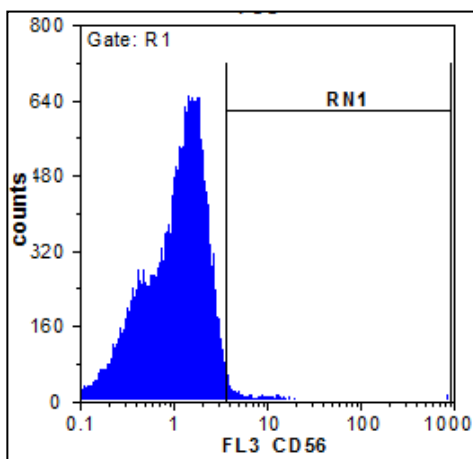
Figura 4 - Esquema demonstrativo dos receptores do citômetro



Fonte: www.fleury.com.br

FIGURA 2: As células passam uma a uma pelo fluxo contínuo. O laser envia um feixe que colide com a célula e é focado por lentes na câmara de fluxo laminar. Depois de passar pela câmara, o feixe é captado por diferentes receptores que analisam informações como dispersão da luz (FSC Forward Scatter), comprimento de onda (Scatter Detector - SSC) e a detecção de diferentes fluoróforos (fluorocromos - FL).

Figura 3 - Representação do Histograma



Fonte: (Do autor, 2017).

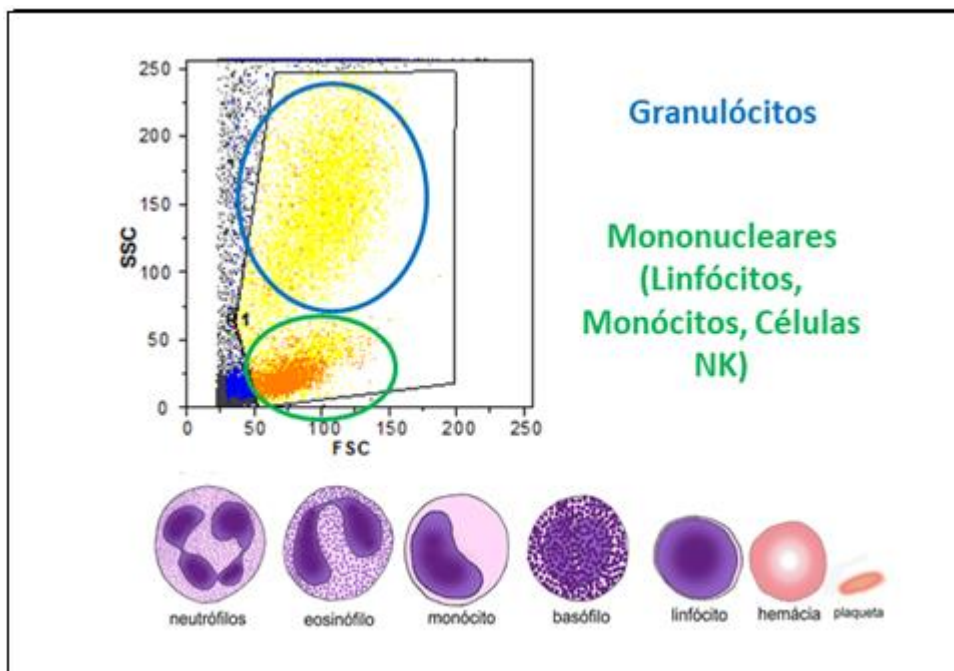
FIGURA 3: Histograma representando as células marcadas que emitem fluorescência recebida pelo detector FL3.

O histograma (FIGURA 3) é um gráfico monoparamétrico que mostra as ondas emitidas pela fluorescência. Cada tipo de fluorocromo absorve a luz emitida pelo laser e emite um comprimento de onda (cor) que é absorvido pelo detector e transcrito pelo aparelho. Formando os histogramas. Cada fluorescência que aparece representada gráfico de barras cujo a altura representa a intensidade das

ondas e a posição da barra a frequência da fluorescência (FRELINGER, et al., 2010).

O Dot Plot (FIGURA 4) é o gráfico utilizado quando se deseja avaliar dois parâmetros físicos. A partir desse gráfico, é possível selecionar uma região (gate) a qual permite formar outros Dot Plot (FIGURA 5) com dados exclusivos. Esses novos gráficos podem ser divididos em quatro quadrantes menores, onde cada um representa um tipo de marcação: O quadrante superior da esquerda (UL – Up Left) mostra a porcentagem de células positivas apenas para o primeiro parâmetro; o quadrante inferior direita (LR – Low Right) as células positivas apenas para o segundo parâmetro; o superior da direita (UR - Up Right) a porcentagem equivalente as células positivas para os ambos os parâmetros. As células não marcadas, também são interceptadas pelo laser e também aparecem nos gráficos de análise daquela amostra. Estas células aparecem como 'negativas' no quadrante inferior esquerdo (LL – Low Left) (FERRAZ e BERTHO, 2005).

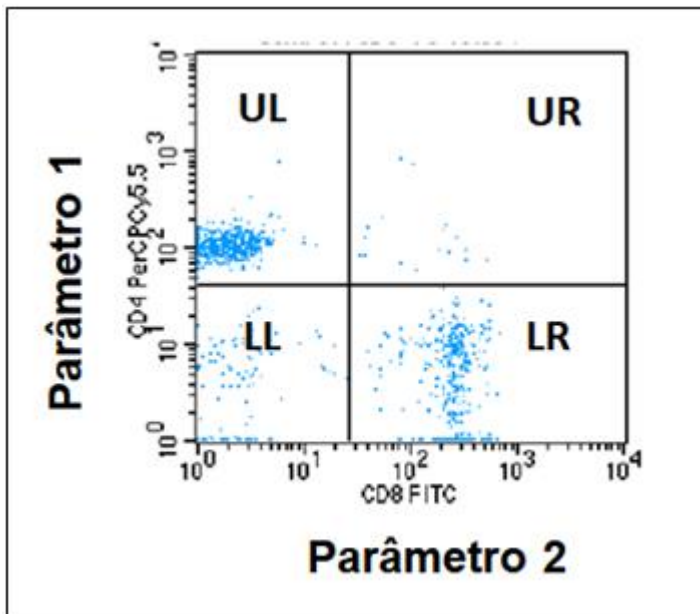
Figura 4 - Dot Plot mostrando localização das populações de Granulócitos e Mononucleares



Fonte: (Do autor, 2018).

FIGURA 4: Imagem mostra um gráfico tamanho (FSC) x Complexidade (SSC). No gráfico estão circunscritas em azul a população de granulócitos e em verde a população de mononucleares. Abaixo está representado diferentes células sanguíneas e suas diferenças morfológicas.

Figura 5 - Dot Plot ilustrativo: Representação da distribuição das células contidas no gate selecionado



Fonte: (Do autor, 2017).

FIGURA 5: Exemplo de dot plot onde utilizou-se como parâmetro 1, a quantidade de células positivas para CD4+ marcadas com fluorocromo PerCOCy 5.5 (vermelho); e como parâmetro 2 as células positivas para CD8+ marcadas com fluorocromo FITC (verde). UL se refere ao quadrante superior da esquerda (Up Left), UR ao quadrante superior da direita (Up Right), LR ao quadrante inferior direita (Low Right) e LL ao quadrante inferior esquerda (Low Left).

Para realizar as análises, as amostras devem estar em uma suspensão aquosa. As amostras podem ser por exemplo: sangue periférico, cultura celular, medula óssea, tecido, líquido, entre outras. As células precisam estar dissociadas e de forma a evitar a formação de grumos na suspensão. Deve-se escolher as moléculas celulares de interesse para que recebam a marcação (FERRAZ e BERTHO, 2005). Neste trabalho, foram utilizados fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais. Para a escolha dos fluorocromos e das combinações a serem utilizadas, é necessário combinar os marcadores celulares de acordo com a configuração ótica do citômetro de fluxo a ser utilizado, em relação aos filtros que direcionam as cores a cada sensor. Caso a marcação seja realizada com mais de um anticorpo monoclonal, deve haver cuidado para não combinar fluorocromos os quais o comprimentos de onda se sobreponham (FERRAZ e BERTHO, 2005).

A citometria de fluxo analisa os dados multiparamétricos, mas a informação necessária pode estar escondida na alta dimensionalidade. Isto leva a necessidade do especialista a realizar seleções manuais de determinados parâmetros

citométricos para melhor visualização e separação adequada de populações de células até que ele possa chegar ao conjunto de dados desejado (ALVES, 2015). Essa etapa pós-analítica demanda um elevado grau de especialização profissional para que o correto diagnóstico possa ser feito, já que é o especialista quem determinará através de seus próprios conhecimentos as anormalidades detectadas na amostra e fará a distinção entre células normais e patológicas. Dessa forma, esse trabalho é exaustivo, suscetível a erros e pouco reprodutível, por se tratar de um procedimento puramente manual e visual, o qual depende exclusivamente da experiência do usuário (ALVES, 2015).

1.2 Sistema imune

A resposta imune a diversos estímulos antigênicos é didaticamente dividida em resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune inata representa as barreiras presentes que são independentes de um contato prévio com um agente agressor, ou seja, é uma resposta imediata. Enquanto isso, a resposta imune adaptativa depende de ativação de células mais especializadas, células ativadoras e células com memória de um contato anterior com o imunógeno. As células mais ligadas a imunidade inata são macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e natural killer, enquanto a resposta imune adquirida pode ser representada pelos linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC). A resposta imune adquirida possui características como memória, autolimitação, diversidade de reconhecimento sendo um antígeno do próprio organismo ou não (MESQUITA JUNIOR et al, 2010).

1.2.1 Os linfócitos

Os linfócitos são as células especializadas em reconhecer e distinguir diferentes partículas antigênicas, os quais fazem parte da imunidade adaptativa. Na resposta imune adaptativa, essas células possuem um papel importante no controle da viremia (como no caso do vírus da imunodeficiência humana - HIV) e de células mutagênicas, para isso, usam vários mecanismos efetores no controle de células identificadas como infectadas ou alteradas (ABBAS & LICHTMAN, 2007). Essas células são divididas em diferentes populações celulares com diferentes marcadores

de superfície ou grupamentos de diferenciação, para diferenciá-las usamos siglas de acordo com marcadores específicos do grupo. Estes marcadores são denominados “CD”, do inglês *cluster of differentiation*, e refere-se a uma molécula em comum de um grupo ou coleção de anticorpos monoclonais (NAOUM, 2001).

De acordo com os diferentes “CDs” podemos identificar linfócitos B (CD19+), Linfócitos T (CD3+), células T auxiliares (CD4+), as células T citotóxicas (CD8+), entre outras. A expressão do fenótipo CD3 positivo ocorre durante o processo de maturação dos linfócitos T (LT), no timo, onde as células imaturas são chamadas de timócitos. Os linfócitos passam por diversos processos de seleção durante sua maturação para que apenas as células eficientes em cumprir sua função de reconhecer os antígenos próprios ou não próprios alcancem a circulação (ABBAS & LICHTMAN, 2007).

Assim, com a identificação de algumas populações celulares podemos entender um perfil do estado imunológico de pacientes, partindo do conhecimento das porcentagens normais de cada tipo celular em pacientes saudáveis. A CF ajuda no diagnóstico das doenças autoimunes e na síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), contabilizando as mudanças nas porcentagens de grupos de linfócitos T circulantes na corrente sanguínea. Para isso utilizam-se marcadores para determinar as populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ (CARVALHO et al, 2012). A imunofenotipagem das células neoplásicas hematopoiéticas por CF é um dos principais métodos para auxiliar no diagnóstico diferencial e direcionar a terapia a ser aplicada em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda, e com essa técnica foram descobertos subtipos dessa doença (MARTINS E GAGLIANI, 2008). Dessa forma a citometria tem auxiliado o diagnóstico de várias alterações imunológicas e deve continuar a ser aplicada, combinada a outros métodos, no estudo a substâncias tóxicas as quais a população está exposta (STEERENBERG et al, 2008; LAMM et al, 2006).

Os LT CD4+, também chamados de auxiliares, são ligados às respostas contra patógenos e ativação de linfócitos B (LB), macrófagos e LT CD8+. LT CD8+ estão envolvidos principalmente nas respostas contra vírus e antineoplásicas. Essas células fazem uma conexão entre a resposta imune inata e adaptativa, e sua contagem pode ser utilizada para traçar um perfil do sistema imunológico de um indivíduo (MESQUITA-JUNIOR et al, 2010).

Células infectadas por vírus e células tumorais geralmente são reconhecidas pelos LT CD8+. Uma vez que ocorre alteração celular, há estímulo para o aumento no número de LT CD8+, pois essas células induzem a via de morte celular por apoptose na célula alvo. Já os LT CD4+ são subdivididos de acordo com as citocinas que produzem. Essas células estão associadas a ativação de macrófagos, aumento da capacidade de ação dos CD8+, indução da proliferação de LT totais, produção e ativação de eosinófilos e liberação IgE pelos LB. Outros subtipos de LT existentes estão envolvidos com controle da automunidade e inflamação (MESQUITA JUNIOR et al, 2010). A percentagem de CD4+ e a relação CD4+/CD8+ são usadas para analisar estado imunológico do indivíduo. Junto a outros parâmetros, é possível avaliar até mesmo o progresso da doença. Com as informações quantificadas e classificadas pelo citômetro, é possível obter uma visão ainda mais apurada da amostra, como a quantidade e diferenciação de células T ativadas e não ativadas.

A Rede Nacional de Laboratórios para Contagem de Linfócitos T CD4+/CD8+ é formada por 92 laboratórios (BRASIL, 2007). Os testes para a contagem de linfócitos T CD4+ /CD8+ são em sua maioria dedicados ao monitoramento da evolução clínica de pacientes infectados pelo HIV (vírus causador da Aids). Esse monitoramento contribui para terapias preventivas às infecções oportunistas contribuindo para a efetividade do tratamento (SILVA, 2009). A avaliação dos LT CD4 também é muito utilizada no diagnóstico de neoplasias linfóides e mielóides, sendo considerada padrão ouro nas leucemias (CARVALHO et al, 2012).

Figura 6 - Mapa representando os laboratórios que compõem a Rede Nacional de Laboratórios para contagem de linfócitos T CD4+.



Fonte: Bertho, 2005.

FIGURA 6: Mapa representando os locais onde estão localizados os Laboratórios para contagem de linfócitos T CD4+ e TCD8+.

1.2.2 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais são os componentes que permitem a identificação de proteínas específicas na superfície celular, como os “CDs”. Com o advento da imunotecnologia, há produção de um número crescente de anticorpos monoclonais para citometria direcionados contra a superfície celular de leucócitos. Inevitavelmente, vários anticorpos monoclonais são produzidos por diferentes laboratórios, que podem gerar nomes diferentes para aqueles anticorpos que reconhecem a mesma molécula. Para evitar essa desorganização, o conselho da “Human Cell Differentiation Molecules” (HCDM) elabora workshops com objetivo de organizar uma nomenclatura que facilite uma melhor comunicação entre a comunidade científica. Assim, a nomenclatura dos “CDs” foi universalmente adotada pela comunidade científica, oficialmente aprovada pela União Internacional de Sociedades de Imunologia e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os dados gerados pelos Workshops levaram a formalizar 408 moléculas de antígenos de

diferenciação de leucócitos humanos (Human Leucocyte Differentiation Antigens - HLDA) que foram revisados recentemente (CLARK et al, 2016). Além dos anticorpos monoclonais humanos, também são produzidos marcadores específicos para leucócitos de outras espécies, como murinos, que são mais de 350 “CDs” identificadas (DAVIS et al, 2003). Ainda podemos classificar os leucócitos pela expressão dessas moléculas a nível membranar e citoplasmático.

Quanto mais anticorpos diferentes utilizados, mais informações sobre uma população celular específica ou mais populações são obtidas. No entanto, existem limitações na obtenção desses resultados, como quantidade de fluorocromos diferentes disponíveis, velocidade de leitura e número de lasers e detectores disponíveis no aparelho a ser utilizado.

As manifestações imunológicas provocadas por substâncias tóxicas, das quais a população está exposta de forma crônica, estão relacionadas diretamente às alterações na produção de leucócitos, principalmente de linfócitos T (ligados a imunidade adquirida), e aos efeitos que provocam sobre o organismo do indivíduo. Por isso, um parâmetro utilizado para avaliar as alterações no sistema imunológico, são as proporções dos subtipos de linfócitos presentes nas amostras de células sanguíneas coletadas de indivíduos expostos. Dentre eles, avalia-se o número e a relação percentual de linfócitos T (LT) CD4+ e CD8+ (CARVALHO et al, 2012).

Vários estudos relataram as mudanças na frequência de células T CD4 + e CD8 + e a relação CD4+ / CD8+ em tecidos de pacientes com diferentes tipos de neoplasias. A maioria dos estudos são realizados por imunohistoquímica, técnica menos precisa que a CF (SATO, 2005; SILVA, 2009; SHAH, 2011; RIAZI RAD, 2014).

Um estudo realizado em São Paulo, pela técnica de imunohistoquímica, avaliou a correlação de células CD4+/CD8+ em pacientes positivos para presença do vírus do Papiloma Humano (HPV). As populações celulares foram avaliadas segundo a carga viral e presença de lesões provocadas pelo vírus nas pacientes. Nesse estudo, observou-se predomínio de linfócitos T CD4+, poucos LT CD8+ nas amostras de pacientes negativos para HPV e de pacientes sem lesões provocadas pelo vírus, quando analisadas isoladamente. No entanto, houve predomínio (68,7%) de LT CD8+ em grande quantidade nas amostras de pacientes com lesões de alto grau (ALVES et al, 2010). Um outro estudo, na China, também avaliou por imunohistoquímica, biópsias de pacientes com tumores de colo de útero.

Esse segundo estudo associou as relações de LT CD4+/CD8+ e taxa de sobrevivência global. Quando consideradas os grupos (mortos e sobreviventes), nota-se a relação CD4+ / CD8+ foram significativamente menores ($0,60 \pm 0,25$) em pacientes que morreram em comparação com aqueles que sobreviveram ($1,17 \pm 1,02$) (SHAH et al, 2011).

Resultados de análises em tecido de tumores de mama, como os obtidos por LAGUENS e colaboradores (2012), na Argentina, relatam encontrar por imunohistoquímica menores proporções de CD4+/CD8+ nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos normais; também foi relatado nesse estudo aumentos nas células CD4+ e CD8+ nos tecidos tumorais da mama em comparação com os tecidos normais. No entanto, RIAZI RAD e colaboradores, no Irã, relatam não encontrar, por CF, alterações significativas em amostras de sangue de grupos de pacientes com câncer de mama e grupos sadios, apesar de haver diferenças nas mesmas quando analisados os tecidos tumorais e seus equivalentes normais. RIAZI RAD e seus colaboradores (2014) também encontraram correlação significativa entre a frequência de células T CD4+ e CD8+ nos tecidos tumorais e o tamanho dos tumores: quanto maior a quantidade de células T, menor o tamanho do tumor. O mesmo ocorreu com as amostras drenadas de linfonodos.

As análises dos perfis de LT CD4+ e CD8+ foram avaliadas em colaboração para dois projetos: “Estudo sobre efeitos mutagênicos e imunotóxicos do benzeno na saúde dos trabalhadores de posto de combustíveis do Rio de Janeiro” e no “Estudo da exposição pós-natal ao filtro solar Octil Metoxi Cinamato e seus efeitos sobre parâmetros de desenvolvimento do sistema neuro-imune-endócrino em roedores”.

1.3 O Benzeno

Uma consequência do processo de modernização é a contaminação ambiental. O processo de industrialização gera cada vez mais novos compostos e uso de novos métodos tecnológicos os quais trazem para a sociedade riscos oriundos de fatores ambientais, como: fatores psicológicos, fatores acidentais, fatores biológicos, fatores físicos e fatores químicos. Por isso, é necessário a identificação e quantificação dos riscos através da avaliação biológica da exposição humana (AMORIM, 2003).

O benzeno é um composto químico conhecido por apresentar diversos efeitos nocivos a saúde. Considerada a quinta substância de maior risco, dada a sua característica de contaminante universal (OLIVEIRA, 2016). Ao mesmo tempo que é comprovadamente tóxica, tem uma importância de enorme importância no meio industrial e por isso desperta tanto interesse nos estudos. Essa substância está presente em produtos como petróleo e derivados, sendo matéria-prima importante na indústria química para fabricação de vários produtos como combustíveis, plásticos, tintas, resinas, fibras, detergentes, corantes, pesticidas, entre outros (BRASIL, 2006). Está presente também nas siderúrgicas, envolvido na produção do aço além de estar presente na fumaça do cigarro (INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). O benzeno possui comprovadamente grande potencial carcinogênico pois causa diversas alterações no organismo, que em conjunto são chamadas de benzenismo (BRASIL, 2006).

Avaliada como uma substância cancerígena, a intoxicação por benzeno pode ser letal quando exposto de forma aguda a altos níveis, sendo sua forma crônica comprovadamente relacionada a ocorrência de leucemia. A absorção do benzeno pelo corpo pode ocorrer através da inalação, do contato dérmico e da ingestão. Após a absorção, o benzeno é metabolizado e os metabólitos produzidos ao final desse processo são excretados pela urina (OLIVEIRA, 2016). Intoxicações agudas, dependendo da quantidade absorvida, pode gerar períodos de sonolência e excitação, vertigem, cefaleia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, perda da consciência e até mesmo morte (BRASIL, 2006). A exposição durante longo período de tempo (crônica) ao benzeno pode provocar alteração nas células sanguíneas produzidas na medula óssea (BRASIL, 2006).

Em um estudo nos Estados Unidos, com 250 trabalhadores expostos ao benzeno, a contagem de glóbulos brancos e plaquetas foi significativamente menor do que em 140 controles, mesmo para exposição abaixo de 1 ppm no ar (LAMM et al, 2004). Estudos epidemiológicos sobre o benzeno confirmaram sua carcinogenicidade, com evidência suficiente para leucemia não linfocítica aguda e evidência limitada para leucemia linfocítica aguda e crônica, mieloma múltiplo e linfoma não-Hodgkin (INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012).

Estudos mostraram que o benzeno é ativado metabolicamente, que é genotóxico, imunossupressor e induz estresse oxidativo, o que causa danos ao DNA

como aberrações cromossômicas e micronúcleos em populações expostas (INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2017). Portanto, a exposição a esse composto apresenta risco. Segundo a portaria nº 775, de 28 de abril de 2004, não existe limite seguro de exposição a essa substância, sendo apenas segura, a exposição zero (BRASIL, 2004).

O Brasil começou a se mobilizar contra o benzenismo na década de 30, quando surgiram as primeiras legislações que consideraram o contato com o benzeno insalubre para os trabalhadores. Evidências científicas apontam a exposição ocupacional ao benzeno possível causa do aparecimento de alterações hematológicas, carcinogênicas e genotóxicas (MOURA-CORREIA e LARENTIS, 2017).

A exposição ocupacional é aquela acima de níveis padrões da população, resultado das atividades relacionadas ao trabalho (BRASIL, 2006). O diagnóstico de intoxicação por benzeno de natureza laboral é uma abordagem clínica e epidemiológica a qual deve ser observada pelos órgãos de saúde do trabalhador. Pessoas expostas a substâncias potencialmente tóxicas, como é o caso do benzeno, devem considerar todas as alterações hematológicas, investiga-las e justificá-las (MESQUITA-JUNIOR et al, 2010).

Desde 1994, o Ministério do Trabalho reconhece o benzeno como substância cancerígena e desde então há proibição da utilização do benzeno em muitos setores industriais. O benzeno pode provocar alterações hematológicas periféricas, pode predispor a infecções recorrentes e distúrbios de coagulação. A exposição a tal substância está associada a diversos tipos de doenças onco-hematológicas, sendo a mais comum relacionada à intoxicação por benzeno, a leucemia mielóide aguda (BRASIL, 2004).

A exposição ocupacional de frentistas ao benzeno tem sido um objeto de estudo e controle em nível mundial (OLIVEIRA, 2016). O Instituto Nacional do Câncer (INCA), em parceria com a Organização Pan-americana da Saúde possui um projeto de estudo sobre “Avaliação dos efeitos mutagênicos e imunotóxicos do benzeno na saúde dos trabalhadores dos postos de combustíveis do Rio de Janeiro”. Para contribuir para esse estudo, foi solicitada análise de sangue periférico de funcionários que trabalham próximos a bomba de gasolina em postos de abastecimento de combustível. Assim foi possível verificar características do perfil

imune de uma população controle (não exposta) e uma população em exposição crônica.

1.4 Octil Metoxinamato (OMC)

Os raios ultravioleta (UV) podem provocar alterações diversas ao organismos como danos ao DNA, imunossupressão, alterações químicas e histológicas na epiderme, envelhecimento precoce, cataratas e carcinogênese, dentre outras patologias. Diversas moléculas na pele podem absorver essa radiação e por isso, existe a possibilidade de gerar alterações químicas (BALOGH et al, 2011). Por isso, a população vem buscando proteção a essa exposição diária. A procura não é apenas por produtos com essa finalidade primária mas também por produtos com outros objetivos os quais também ofertam proteção UV, e para isso, a indústria farmacêutica disponibiliza uma grande variedade cosméticos como por exemplo: xampu, maquiagens, hidratantes, entre outros.

Muitos filtros solares químicos têm sido analisados, por se mostrarem tóxicos em experimentos *in vivo* com roedores e *in vitro*. Alguns exemplos são a benzofenona 2 (BZF2), benzofenona 3 (BZF3), metilbenzilideno cânfora (MBC) e octil metoxicinamato (OMC) (BARBOSA, 2014; SCHMUTZLER et al, 2004; SEIDLOVÁ-WUTTKE et al, 2006; KLAMMER et al, 2007).

Um dos filtros UV mais utilizados em produtos para uso humano é o OMC (JANJUA, 2004), por diversas características físicas como estabilidade, fácil homogeneização e pouca solubilidade em água que o torna mais aderente a pele. O OMC é um filtro UVB, mas apresenta uma absorção adicional em uma pequena faixa do espectro UVA (FICHA TECNICA MAPRIC). Esse composto foi isolado de diversas secreções do corpo humano, indicando que os consumidores estão expostos a outras possíveis ações desse composto, uma vez que ele é comprovadamente absorvido e metabolizado (BARBOSA, 2015).

Quanto ao OMC, alguns estudos *in vitro* demonstraram que este pode exercer atividade estrogênica, pois esse composto induz aumento na proliferação de células cancerosas mamárias (SCHLUMPF et al., 2001). Em estudos *in vivo*, apontam ao aumento do peso uterino após exposição a 1035 mg/kg/dia de OMC por 4 dias (SCHLUMPF et al., 2001). No entanto as consequências do uso de filtros UV ainda é

pouco explorada na literatura, com algumas evidências como impacto em parâmetros relacionados ao desenvolvimento, principalmente reprodutivo e eixo tireoidiano (BARBOSA, 2015).

As exposições controladas de seres humanos às substâncias potencialmente tóxicas vêm-se restringidas por razões éticas e, por isso, com grande frequência se recorre a estudos em animais para prever a reação humana aos efeitos destas substâncias (AMORIM, 2003). O Laboratório de Farmacologia no DFT/INCQS avalia os efeitos do OMC em camundongos (*Mus musculus*) Swiss expostos diariamente no período lactacional ao OMC. Para completar dados a esse estudo, foi requerida análises das populações de linfócitos TCD4+ e CD8+ através da CF, em células de baço dos animais desse experimento.

Os estudos têm mostrado resultados os quais o OMC atua sobre o eixo tireodiano. Em adultos esse dano pode ser tratado, mas em crianças pode gerar deficiência no desenvolvimento da comunicação, alterações neuromotoras, e danos cognitivos, déficit de atenção, hiperatividade, dicção, déficit na percepção espacial (ROVET et al, 1992). Tais manifestações são motivos de preocupação dada a intensidade de uso desse produto e conseqüente contaminação ambiental. O estudo das substâncias que levam ao desequilíbrio da homeostasia é de grande relevância uma vez que eles interferem em importantes eventos para o desenvolvimento e funcionamento de diversos sistemas.

2 JUSTIFICATIVA

Por definição, Vigilância Sanitária é "um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde" (BRASIL, 1990).

É uma das mais antigas práticas de Saúde Pública do mundo associadas ao processo de regulação, monitoramento e fiscalização de produtos e serviços, com caráter multidisciplinar, com a capacidade de intervir nas relações sociais de produção consumo a fim de realizar a prevenção, diminuição ou eliminação de riscos ou danos à saúde, seja ela individual ou coletiva. (COSTA, 1999; ROZENFELD, 2012).

O direito a saúde é garantido aos cidadão pela constituição federal. O melhor uso dos recursos da saúde pública está na prevenção uma vez que apresenta-se como uma alternativa menos onerosa em relação aos gastos em saúde curativa. Entre as ações atribuídas a Vigilância Sanitária, encontram-se diversos órgãos e instituições que atuam para executar a proteção aos direitos a saúde. Pesquisas relacionadas a substâncias potencialmente tóxicas (substâncias como o Benzeno e OMC) contribuem para eficiência das políticas de prevenção a agravos a saúde.

O INCQS ao fornecer o serviço de citometria, pode contribuir com várias pesquisas em torno de diversas substâncias as quais podem alterar o bom funcionamento do organismo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Implantar a metodologia de imunofenotipagem da análise de soluções com células (de murinos ou humanos) no Laboratório de Farmacologia do DFT por CF, observando parâmetros das populações de linfócitos T CD3+ (linfócitos T totais) e subpopulações CD4+ (linfócitos T helper ativados ou não ativados) e CD8+ (linfócitos T citotóxicos) para avaliação imunofenotípica de exposição a agentes imunomoduladores.

3.2 Objetivo específico

Desenvolver um painel imunofenotípico para a contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+, a partir da quantificação dos antígenos específicos (CD4+/CD8+) na superfície das células, utilizando anticorpos monoclonais específicos marcados com corantes fluorescentes.

Elaborar um Procedimento Padrão Operacional para marcação de amostras e aquisição das amostras.

Avaliar se a exposição ao octil metoxicinamato no período lactacional é capaz de induzir alterações imunológicas.

Avaliar se a exposição ocupacional ao benzeno é capaz de induzir alterações imunológicas.

4 MÉTODO

4.1 Amostras humanas

Para o projeto sobre “Avaliação dos efeitos mutagênicos e imunotóxicos do benzeno na saúde dos trabalhadores dos postos de combustíveis do Rio de Janeiro” foram analisadas 162 amostras de sangue periférico de voluntários, divididos em dois grupos. Grupo benzeno: 86 indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno, ou seja, trabalhadores que por ficarem grande quantidade de tempo próximos a bomba de gasolina, absorvem por diversas vias aquele produto; e Grupo Controle: 76 indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno.

As amostras e sangue periférico humano foram recebidas em tubos com EDTA, com identificação compatível com a ficha de requerimento e em temperatura ambiente. A análise foi realizada 48 horas após a coleta. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA – CEP/ INCA com o número de protocolo 135/11. Esse projeto teve o intuito de documentar a dados ocupacionais e avaliar a influência da exposição ao benzeno com o risco de desenvolvimento de linfoma não-Hodgkin (LNH).

Foram elegíveis para o estudo, casos diagnosticados com tumor primário de LNH, com confirmação histológica por imunofenotipagem e sem diagnóstico de Aids (C82 – C85). Os controles foram acompanhantes, visitantes de pacientes sem diagnóstico de cânceres hematológicos; doadores de materiais biológicos e, também sem diagnóstico de Aids ou de algum câncer prévio. Em relação às características sociodemográficas foram incluídos de ambos os grupos, aqueles que tinham nacionalidade brasileira, ambos os sexos, faixa etária de 25 a 75 anos, residentes do estado do Rio de Janeiro – RJ/ Brasil. Além disso, foram incluídos aqueles que tinham condições para responder as perguntas do questionário. Para tentar garantir que o grupo de casos e controles seja da mesma base populacional foi realizado o pareamento por frequência da variável sexo e idade, por faixas etárias (25 – 44 anos, 45 – 64 anos, 65 - 75 anos). Assim, o processo de recrutamento dos participantes foi condicionado monitorando o número de casos e controles. A decisão de parrear veio da necessidade de evitar vieses de confundimento.

Quanto à faixa etária da população base do estudo, como o intuito era avaliar a exposição laboral, considerando o tempo mínimo de latência do LNH (HOWARD,

2013), foi estabelecido a partir de 25 anos. No caso dos idosos, pela dificuldade de pareamento de controles a partir de 75 anos, foi restringido o recrutamento de indivíduos até esta idade.

O critério de exclusão foi à existência de solicitação de retirada da investigação por parte dos participantes do estudo ou algum critério de elegibilidade que não tenha sido atendido, após revisão dos questionários. Todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 Amostra Murina

O projeto que iniciou tal estudo se encontra em execução para a tese de doutorado do aluno Esdras Barbosa, colaborador do laboratório de farmacologia. O projeto foi nomeado como “Estudo da exposição pós-natal ao filtro solar Octil Metoxi Cinamatoe seus efeitos sobre parâmetros de desenvolvimento do sistema neuro-imune-endócrino em roedores”.

Foram utilizados camundongos Swiss recém-nascidos, de ambos os sexos, provenientes de vinte e duas fêmeas pesando entre 30 e 45 g, fornecidas pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB). Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$), umidade (55%) e ciclo alternado claro/escuro de 12 horas. No dia pós-natal 1 (DPN1) os filhotes foram sexados e divididos em cinco grupos experimentais. As ninhadas foram mantidas com suas respectivas mães acondicionadas em caixas individuais. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-Fiocruz) e licenciado pelo nº P16/14.2.

As mães foram divididas pelos grupos, sendo selecionado oito filhos de cada ninhada (quatro fêmeas e quatro machos).

Os grupos experimentais foram:

Grupo 1- Veículo (óleo de milho) – 5ml/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo, utilizado como Controle negativo;

Grupo 2 - PTU (Propiltiouracil) – 4mg/kg/dia ajustado pelo peso corpóreo, utilizado como Controle Positivo de indutor do hipotireoidismo;

Grupo 3 - OMC (250 mg/kg/dia) - ajustado pelo peso corpóreo;

Grupo 4 - OMC (500 mg/kg/dia) - ajustado pelo peso corpóreo;

Grupo 5 - OMC (1000 mg/kg/dia) - ajustado pelo peso corpóreo.

Foram expostos 30 filhotes do grupo controle negativo (óleo de milho), 27 do grupo controle positivo (PTU), 12 do grupo exposto ao OMC 250, 22 do grupo exposto ao OMC 500 e 28 do grupo exposto ao OMC 1000, totalizando 119 animais (excetuando as mães). Os animais foram expostos a partir do primeiro dia de vida, durante vinte e dois dias. Os animais foram eutanasiados com overdose de Cetamina (140mg/Kg) associado a Xilazina (20mg/Kg) no vigésimo terceiro dia de vida (DPN23). Foram coletados os baços e mantidos em gelo, devidamente identificados até o momento de triturar e marcar. Para análise de células em suspensão, a trituração foi feita manualmente com uso de pistilo, conservadas em gelo e não ultrapassaram 12 horas após a coleta.

4.3 Marcação de superfície

Os linfócitos são lidos a partir de marcadores de superfície (anticorpo monoclonal) de forma direta. Foi feito um *pool* com uma mistura de três anticorpos listados na tabela 1 e 2, de acordo com a amostra a ser analisada. Todos os anticorpos que utilizamos foram fornecidos pela EXBIO.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados na marcação de sangue periférico humano FACSCalibur™

Anticorpos utilizados na marcação de sangue periférico humano FACSCalibur™					
Marcador de superfície	Fluorocromo Conjugado	Excitação Máxima	Emissão Máxima	Parâmetro	Cor
Anti-CD3	APC Allophycocyanin	635 nm	660 nm	FL4	Vermelho (Laser Red)
Anti-CD8	FITC Fluorescein Isothiocyanate	488 nm	517 nm	FL4	Verde (Laser Argon)
Anti-CD4	PerCP-Cy5.5 Peridinin- chlorophyll proteins	488 nm	695 nm	FL3	Vermelho (Laser Argon)

Fonte: BIOSCIENCE, 2007.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados na marcação de triturado de baço murino CyFlow® Space

Anticorpos utilizados na marcação de triturado de baço murino CyFlow® Space					
Marcador de superfície	Fluorocromo Conjugado	Excitação Máxima	Emissão Máxima	Parâmetro	Cor
Anti-CD3	PerCP-Cy5.5 Peridinin- chlorophyll proteins	488 nm	670 nm	FL3	Vermelho
Anti-CD8	PE Phycoerythrin	495 nm	557nm	FL2	Laranja
Anti-CD4	FITC fluorescein isothiocyanate	494 nm	517 nm	FL1	Verde

Fonte: PARTEC , 2013.

Foram utilizados 50 µl com a amostra de sangue periférico humano para o primeiro projeto e a suspensão de 10⁵ células do triturado de baço de camundongos para o segundo projeto. Adicionou-se os conjuntos de macadores (anticorpo monoclonal ligado ao fluorocromo), segundo as tabelas 1 e 2 em quantidades de acordo com informações do fabricante. Incubou-se por uma hora as amostras com os anticorpos, no escuro e à temperatura ambiente.

Como a análise é feita com intuito de avaliar os linfócitos, adicionou-se em cada amostra 600µl de solução para lise de hemácias fornecida pela BD Biosciences (Lysing Buffer), a qual agiu sobre a amostra por 15 minutos. Terminado o procedimento de lise de hemácias, as amostras receberam a adição de solução tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline – PBS), para bloquear a ação da lise.

Foi adicionado 500µl de PBS, e centrifugou-se a 2000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 800µl de PBS.

4.4 Análise por Citometria de Fluxo

O Citômetro de Fluxo utilizado para as amostras do projeto Benzeno foi FACSCalibur™ (a sigla “FACS” representam os citômetros de fluxo da empresa Becton & Dickinson - BD), representado pela FIGURA, no Departamento de Farmacologia Aplicada do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos). O software utilizado para análise das amostras adquiridas por esse aparelho é o BD CellQuest™.

Figura 7 - Aparelho Citômetro modelo BD FACSCalibur Bench-top Analyzer utilizado para citometria.



Fonte: www.bdbiosciences.com, 2017.

Figura 7: BD FACSCalibur Bench-top Analyzer. 2 lasers, 4 cores.

O aparelho utilizado para as amostras do projeto OMC foi o CyFlow® Space da empresa Partec, presente no Laboratório de Farmacologia do INCQS. O software utilizado para análise das amostras adquiridas por esse aparelho é o FloMax®.

Figura 8 – Aparelho Citômetro modelo CyFlow® Space utilizado para citometria.



Fonte: <https://pdfs.wolflabs.co.uk>, 2007.
Figura 8: CyFlow® Space 2 lasers, 6 cores.

Nos projetos analisados, o número de células adquirido foi cerca de 20.000 eventos e a informação computadorizada foi guardada para posterior avaliação com o programa de análise do próprio aparelho. Os resultados foram expressos em percentagem de células (linfócitos T totais ou CD4+ ou CD8+). O “gate” de linfócitos foi feito a partir da população de células CD3 positivas. Foram avaliadas a razão da percentagem de células CD4+ e percentagem de CD8+ e percentagem de LT CD3+ entre a população de leucócitos totais.

4.5 Análise estatística dos dados

O software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EUA) foi utilizado nas análises. O teste utilizado foi o paramétrico *t de Student*. Os valores de *p* adotados como estatisticamente significantes nas análises foram aqueles inferiores a 0,05.

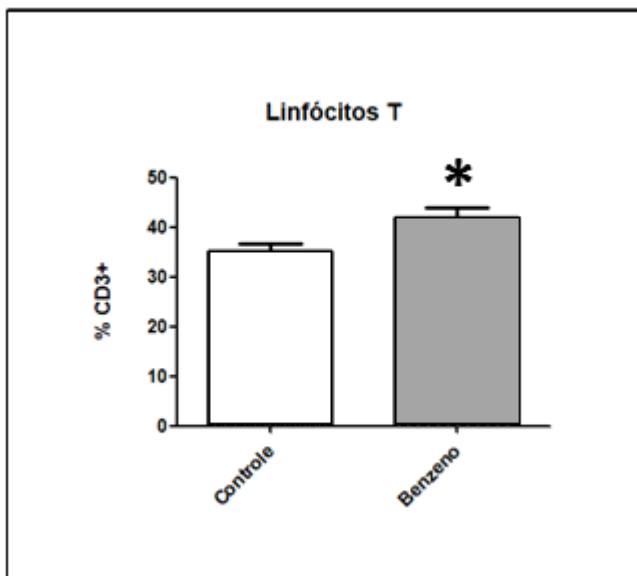
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para implantar o serviço, obedecendo o Sistema de Gestão da Qualidade implementado de acordo com as Normas ABNT NBR ISO/IEC 17.025, foi feito Procedimento Operacional Padrão (POP) para as marcações e leitura do aparelho. Ambos estão no anexo 1 no final do documento.

5.1 Resultados das análises de sangue humano

Os resultados indicaram aumento significativo na média da porcentagem de LT CD3+ (FIGURA 8) em sangue periférico de indivíduos expostos $42,04 \pm 1,907$ em comparação com os resultados das amostras de indivíduos não expostos $35,15 \pm 1,516$; sendo o p valor 0,0024.

Figura 9 - Gráfico com resultado das medidas das populações de linfócitos T CD3+



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 9: Representação da média de população LT CD3+ de acordo com seus grupos (Controle e Indivíduos expostos ao benzeno). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O “ * ” indica diferença significativa estatisticamente ($p < 0,05$) entre grupo controle e benzeno.

A diferença entre as razões de LT CD4+/CD8+ dos grupos controle e exposto ao benzeno mostrou-se significativa (FIGURA 9). Nota-se um aumento da população de LT CD8+ em relação a população de LT CD4+ no grupo exposto ao benzeno.

O valor médio da razão LT CD4+/CD8+ no grupo controle foi de $1,987 \pm 0,1182$ enquanto no grupo exposto foi de $1,632 \pm 0,05717$; p valor menor que 0,001.

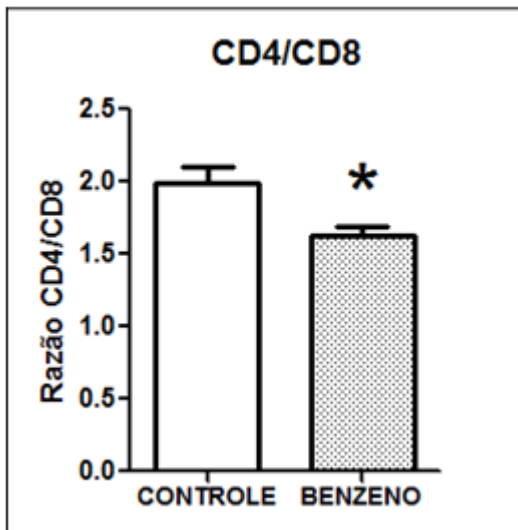
Os LT CD4+ estão presentes no sangue periférico em torno de 65% das células T positivas enquanto as de LT CD8+ representam cerca de 35% em indivíduos normais (SILVA, 2009). Assim, é natural esperar de um grupo controle uma razão LT CD4+/LT CD8+ próxima a 1,9. Quanto maior o aumento da população de LT CD8+, menor é a razão de LT CD4+/CD8+. É possível notar na figura 10 a diferença na porcentagem de células T CD8+ entre os grupos.

Os LT CD8+ são responsáveis por reconhecer os antígenos intracitoplasmáticos, sendo importantes células envolvidas na resposta imune contra células infectadas ou tumorais. Após a adesão a célula alvo com coestímulo adequado, os LT CD8+ se proliferam com o objetivo de eliminar por citotoxicidade as células com antígenos reconhecidos como estranhos ao corpo (MESQUITA-JÚNIOR et al, 2010).

Sugere-se que o aumento células T CD3+ possui um papel protetor. Um estudo com pacientes com câncer de ovário exibiu resultados onde um subgrupo de pacientes com altas frequências de LT CD8+ intra-epiteliais apresentou melhor sobrevida que em pequenas frequências (SATO et al, 2005).

A baixa relação CD4+/CD8+ devido ao aumento da frequência de CD8+ no grupo exposto ao benzeno (FIGURA 9 e 10) se assemelha a outros dados da literatura, como um estudo com trabalhadores rurais expostos cronicamente a pesticidas conhecidamente cancerígenos. Nesse trabalho, o grupo exposto possui razão LT CD4+/CD8+ de 1,94 e o grupo controle 2,21, sugerindo a queda da razão LT CD4+/CD8+ quando há exposição aos produtos tóxicos (STEERENBERG, 2008).

Figura 10 - Gráfico com resultado médio da razão de células T CD4+/T CD8+

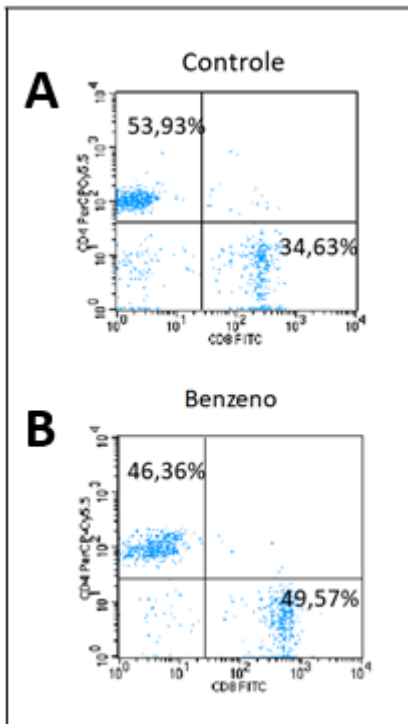


Fonte: (Do autor, 2017).

Figura 10: Representação da relação LT CD4+/CD8+ em amostras de sangue periférico de indivíduos não expostos e expostos ao benzeno. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O “ * ” indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupo controle e benzeno.

Assim, a menor relação da razão LT CD4+/CD8+ é um indicativo de alteração do status hematológico e possivelmente imune dos indivíduos que estão expostos ao benzeno. No entanto, para falar melhor sobre o tipo de toxicidade do benzeno outros parâmetros devem ser analisados como: outros marcadores como CD19+, CD56+, CD45+ entre outros; análises hematológicas como contagem de leucócitos e bioquímicas, como enzimas ligadas ao metabolismo renal e hepático (ALT, AST, creatinina, entre outras).

Figura 11 - Gráfico Dot Plots representativos dos grupos estudados com marcações para T CD4+ e T CD8+



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 11: A imagem mostra gráficos representativos do tipo Dot Plot formado a partir de seleção de gate em um Gráfico primário. Esses gráficos representam dentro da população de células LT CD3+, as porcentagens de Células LT CD4+ e CD8+ em indivíduos não-expostos e expostos ao benzeno.

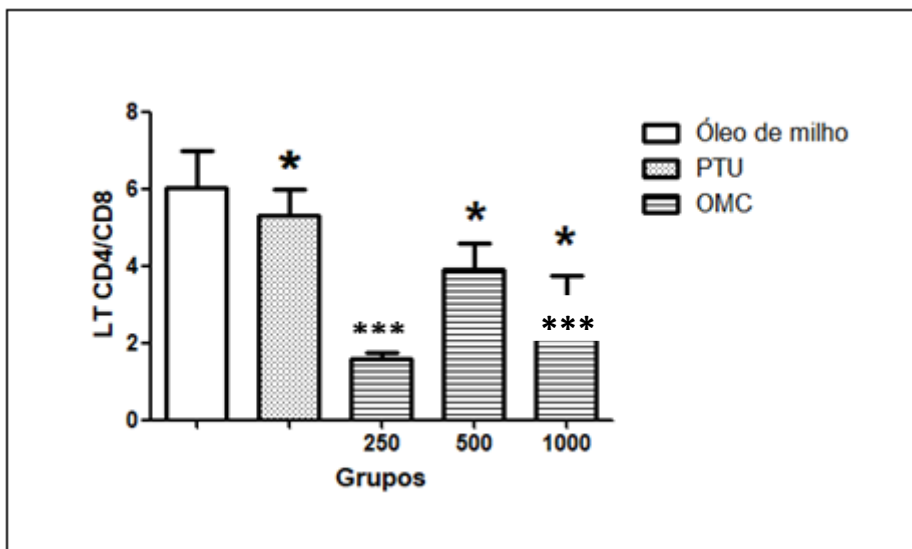
5.2 Resultados das análises de triturado de baço

Nas amostras estudadas do baço de camundongos expostos durante o período lactacional (DPN 1-22) ao OMC, a citometria revelou diferenças significativas nas razões LT CD4+/CD8+ entre o grupo controle e exposto ao PTU, onde o valor médio do grupo controle foi de $6,028 \pm 0,9569$ e grupo exposto ao PTU foi de $5,289 \pm 0,6818$; p valor foi 0,0470. Isso mostra que a exposição a um fármaco conhecidamente indutor de hipotireoidismo, e conseqüentemente capaz de gerar alterações sistêmicas, também resulta em alterações imunológicas.

As amostras oriundas de animais expostos ao OMC apresentaram razão LT CD4+/CD8+ ainda menores que o grupo exposto ao PTU, nos quais os valores médios foram $1,604 \pm 0,1359$; $3,899 \pm 0,6987$; $3,066 \pm 0,6750$ respectivamente da menor dose para a maior; p valor foram menor que 0,0001 para a menor dose, 0,0292 e 0,0417 para a dose de 500 mg/kg e 1000 mg/kg respectivamente.

Isso mostra que a exposição ao OMC, da mesma forma que substâncias tóxicas como o benzeno, aumenta o percentual de LT CD8+. Curiosamente a menor dose apresentou os menores valores para razão LT CD4+/LTCD8+, sugerindo maior risco de toxicidade quando absorvido em pequenas doses, situação na qual a população se encontra ao utilizar filtros solares. No entanto, o grupo OMC 250 mg/kg apresentou o menor número amostral (n=12), por perdas de animais durante o tratamento, sendo necessárias mais análises que comprovem esses resultados (dados em estudo).

Figura 12 - Gráfico mostrando a relação LT CD4/LT CD8 nos diferentes grupos expostos ao OMC



Fonte: Do autor, 2017.

Figura 12: Médias das razões LT CD4/CD8 dos grupos estudados presentes no baço de camundongos expostos no período lactacional (DPN 1-22). A imagem mostra o grupo Controle negativo, grupo exposto ao PTU, grupo OMC 250 mg/kg, grupo OMC 500 mg/kg e grupo OMC 1000 mg/kg. O “ * ” indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupo controle e os demais grupos.

Disfunções tireoidianas também podem provocar diminuição da relação LT CD4+/CD8. Esse fato é mostrado por alguns autores como em casos de pacientes com hipotireoidismo no período pós-parto e Tireoidite de Hashimoto (GOLDMAN et al, 1986; COVAS et al, 1992; BARCA et al, 2000). Com base nos resultados, é possível inferir que provavelmente o filtro solar em questão e o PTU estão induzindo uma desregulação tireoideana compatível com a redução da razão LT CD4/CD8. Para confirmar tal hipótese, é necessário realizar dosagens hormonais, como

tiroxina (T4), tri-iodotironina (T3), hormônio tireotrófico (TRH) e hormônio tireoestimulante (TSH) para associar aos resultados mostrados.

O Brasil possui legislações atuais que mostram grande preocupação com a exposição ambiental ou ocupacional ao benzeno. Apesar disso, ainda há muitas providências necessárias à proteção da saúde do trabalhador. Já o OMC é um estudo novo que necessita de mais informações quanto a sua atividade tóxica. Os dados gerados serão úteis para os diferentes projetos de pesquisa. Essas linhas de pesquisa geram dados importantes quanto a saúde da população, sendo portanto uma questão de vigilância sanitária a qual mais uma vez o INCQS pode contribuir.

O uso de metodologias com a CF é de extrema importância no fornecimento de dados mais aprofundados sobre os efeitos tóxicos que a população pode ser acometida, no entanto para o emprego deste tipo de metodologia é necessário investimentos em conjuntos de anticorpos de acordo com as questões a serem levantadas.

Esse é um protocolo que depende de tempo para realização e treinamento dos funcionários para elaboração dos laudos.

6 CONCLUSÃO

A citometria se mostrou uma metodologia auxiliar e segura para o diagnóstico de alterações imunológicas e eficiente para os estudos realizados. Além disso, possui a vantagem de não ser muito invasiva quando realizada em sangue periférico. O DFT encontra-se apto a disponibilizar o serviço de citometria fluxo para pedidos externos ao laboratório de farmacologia, o qual possui do aparelho, capacidade de execução e protocolo para análise. No entanto, para disponibilizar tal serviço, o setor depende da disponibilidade de especialistas e insumos específicos para execução das análises.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

_____. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2017.

ALVES D. B. et al. Linfócitos CD4, CD8 e células NK no estroma da cérvix uterina de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.43, n.4, p. 425-429, jul./ago. 2010.

ALVES E. T. A. **Métodos de clusterização em citometria de fluxo aplicados a imunologia**. 2015. 98 f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

AMORIM, L.C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 6, n. 2, p. 158-160, 2003.

BALOGH, T. S. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.86, n.4, p.732-742, ago. 2011.

BARBOSA, E. **Efeito da desregulação tireoideana induzida por octil metoxi cinamato sobre parâmetros cognitivos em ratos**. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

BARCA, M. F. et al. Prevalence and characteristics of postpartum thyroid dysfunction in São Paulo, Brazil. **Clinical Endocrinology**, v. 53, n. 1, p. 21-31, Julho, 2000.

BERTHO, A. L., Ferraz R. **Citometria de fluxo**: princípios e aplicações. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

BIOSCIENCE. **BD FACSCalibur instructions for use**: part no. 643271 rev. A. November 2007. Disponível em: 02, dez. Disponível em: <https://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2018.

BRAGA, K. M. S. Citometria de fluxo: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa. **Enciclopédia Biosfera**, v.13, n. 23, p.304-319, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 776/GM, em 24 de abril de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 abr. 2004.

_____. **Risco químico: atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno** Brasília: Editora MS, 2006.

_____. **Risco químico atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno**. 2006. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/risco_saude_trabalhadores_expostos_benzeno.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2018.

CARVALHO, J. B. J. et al. Citometria de fluxo: aplicabilidade em Ginecologia e Obstetrícia. **Revista Brasileira de Medicina**, Campinas, v. 69, p.10, out. 2012.

CLARK, G. et al. Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. **Clinical & Translational Immunology**. v. 22, n.5, p. 57, jan. 2016.

CRUVINEL, W. M. Sistema imunitário - parte I: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p.434-447, 2010.

COVAS, M. I. et al. Peripheral blood T-lymphocyte subsets in autoimmune thyroid disease. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 2, p. 131-135, 1992.

D'ALASCIO R. G. et al. Sintomas relacionados à intoxicação por benzeno nos frentistas do sul de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 1, n. 12, p. 21-29, 2014.

DAVIS, S. J. et al. The nature of molecular recognition by T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 217-224, mar. 2003.

FACScaliburTraining. n. 643271. rev. A. November, 2007. Disponível em: <https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2013/06/BD_FACScalibur_instructions.pdf > Acesso em: 02 jan. 2018.

FRELINGER, J. et al. Modeling flow cytometry data for cancer vaccine immune monitoring. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 59, n. 9, p. 1435-1441, 2010.

GIL, E. A. **Sintomas relacionados à intoxicação por benzeno nos frentistas do Sul de Santa Catarina**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2011.

GOLDMAN, J.M. et al. Postpartum thyroid dysfunction. **Archives of internal medicine**, v. 146, n. 7, p. 1296-1299, Julho, 1986.

HOWARD, J. M. D. **Minimum latency & types or categories of cancer**. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2013. 9 p. (Monitoring treatment, 9.11).

INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations**. France, 2012. (IARC monographs 100 F). Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

_____. Carcinogenicity of benzene. **The Lancet**, v. 18, n. 12, p. 1574-1575, 26 out. 2017. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045\(17\)30832-X.pdf](http://www.thelancet.com/pdfs/journals/lanonc/PIIS1470-2045(17)30832-X.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2018.

JANJUA, N. R. et al. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 57-61, 2004.

KLAMMER, H. et al. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of hypothalamo-pituitary- thyroid function in rats. **Toxicology**. v. 238, p. 192-199, 2007.

KOBAYASHI, K. et al. Effects of hypothyroidism induced by perinatal exposure to PTU on rat behavior and synaptic gene expression. **Toxicology**, v. 212, p. 135-147, 2005.

KUHNS M, S.; DAVIS M.M.; GARCIA K.C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. **Immunity**, v. 24, n.2, p. 133-139, 2006.

LAGUENS G. et al. Stromal CD4+ and CD8+ T Cells in Human Breast Carcinomas. Its Correlation with Chemokine MIG/CXCL9. **Advances in Breast Cancer Research**, v.1, n. 2, p. 7-11, jul. 2012.

LAMM, Q. et al. Hematotoxicity in Workers Exposed to Low Levels of Benzene. **American Association for the Advancement of Science**. v. 306, n. 5702, p. 1774–1776, dez. 2004.

LAMM, Q. et al. Benzene exposure and hematotoxicity. **American Association for the Advancement of Science**, v. 312, n. 5776, p. 998-999, maio 2006.

LAUWERYS, R.R.; HOET, P. **Industrial chemical exposure: guidelines for biological monitoring**. London: Lewis Publishers, 1993.

MARTINS, D.M.; GAGLIANI, L. H. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. **Revista Centro Universitário Lusíada (UNILUS) Ensino e Pesquisa**. São Paulo, v. 5, n. 8, 2008.

MESQUITA JUNIOR, D. et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, out. 2010.

MOURA-CORREA, M. J.; LARENTIS, A. L. Exposição ao benzeno no trabalho e seus efeitos à saúde. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, p. 1-4, 2017. Supl. 1, e14s.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NAOUM, P. C.. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 23, n. 2, p. 111-119, 2001.

OLIVEIRA, R. I. S. et al. Investigação sintomatológica por intoxicação ao benzeno em rede de postos de combustíveis em Aracaju – SE. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA, NUTRIÇÃO E SAÚDE, 2., 2016, Aracaju. Livro de resumos. Aracaju: UNIT, 2016.

PARTEC CyFlow® Space Instrument Operation Manual. rev. 007. Janeiro, 2013. Disponível em: <https://pdfs.wolflabs.co.uk/service/Sysmex-partec_flow-cytometers_cyflow-space_manual.pdf> Acesso em: 02 jan. 2018.

RIAZI RAD, F. et al. Comparative Analysis of CD4+ and CD8+ T Cells in Tumor Tissues, Lymph Nodes and the Peripheral Blood from Patients with Breast Cancer. **Iranian Biomedical Journal**, v.19 n.1, p.35-44, 2014.

REGO, Ed. M.; SANTOS, G. A. S. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 367-374, 2009.

ROVET, J.; EHRLICH, R.; SORBARA, D. Neurodevelopment in infants and preschool children with congenital hypothyroidism: etiological and treatment factors affecting outcome. **The Journal of Pediatric Psychology and Clinical Practice in Pediatric Psychology**, v. 2, p. 187-213, 1992.

SATO, E. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+ / regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 102, n. 51, p. 18538-18543, 2005.

SCHLUMPF, M. et al. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, p. 239-244, 2001c.

SCHMUTZLER, C. et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. **Toxicology**, v. 205, p. 95-102, 2004.

SEIDLOVÁ-WUTTKE, D. et al. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 214, p. 1-7, 2006.

SHAH, W. et al. Lymphocytes and a high percentage of CD4+ FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix Walayat. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 8, n.1, p.59-66, 2011.

SILVA, R. C. **Avaliação dos anticorpos monoclonais ANTI-CD3, ANTICD4 E ANTI-CD8 em um teste de imunofenotipagem para a quantificação de linfócitos T, utilizando a Citometria de Fluxo.** 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Tecnologia de Imunobiológicos) – Instituto Oswaldo Cruz - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

STEERENBERG, P. et al. Toxicological evaluation of the immune function of pesticide workers, a European wide assessment. **Human & Experimental Toxicology**, Europa, v.27, n.9, p. 701-707, set. 2008.

Anexo 1