

Capítulo 5

Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica

Ana Lígia Bender
Carlos Alberto von Mühlen

TESTES SOROLÓGICOS OU IMUNOENSAIOS

Os imunoenaios são técnicas para a detecção ou quantificação de antígenos ou anticorpos, podendo utilizar reagentes marcados ou não marcados. Os ensaios com reagentes não marcados possuem sensibilidade de detecção menor, pois é necessário que se forme grande quantidade de imunocomplexos para que se processe a visualização do fenômeno.

A imunquímica disponibiliza métodos simples, rápidos e sensíveis aplicáveis às análises na rotina laboratorial. Os métodos imunquímicos normalmente não requerem equipamentos caros e preservam as características do material biológico. A utilização de sistemas de marcação de reagentes torna possível a amplificação do sinal final e detecção através de instrumentos (fotometria, fluorimetria ou luminometria), elevando a sensibilidade à ordem de atomol ou zeptomol (10^{-19} / 10^{-21}).

Nas últimas décadas os imunoenaios se tornaram a tecnologia padrão em medicina laboratorial. Houve grande desenvolvimento na tecnologia de produção de anticorpos e antígenos empregados, bem como dos analisadores automatizados. Esses avanços tecnológicos agregaram baixa variabilidade inter e intra-ensaios ($CV =$ coeficiente de variação) e rapidez na realização dos testes.

Apesar do aumento nos processos automatizados nos laboratórios clínicos, a intervenção humana

é requerida em várias fases do processo analítico e pós-analítico, principalmente no que se refere à validação dos resultados. O processo de validação é chave na prevenção de erros (imprecisão e inexatidão) e interpretação dos resultados.

Neste capítulo relacionamos os princípios dos imunoenaios mais utilizados em diagnóstico laboratorial.

REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO

As reações de precipitação envolvem a combinação de antígeno solúvel com anticorpo solúvel para produzir complexos insolúveis que são visíveis. As técnicas de precipitação começaram a ser utilizadas há aproximadamente 100 anos por Rudolf Kraus em Viena e em 1905 Bechhold apresentou seus experimentos sobre a precipitação em géis.

Heidelberger e Kendall em 1935 descreveram a curva parabólica que mostra a quantidade de precipitado (imunocomplexos Ag-Ac) quando é adicionada quantidade crescente de antígeno a uma quantidade constante de anticorpo (Fig. 5.1). A reação entre o antígeno e o anticorpo é reversível e obedece a uma constante de associação (K_a). Dentre vários fatores físico-químicos e imunológicos que interferem na reação, as concentrações relativas do antígeno e do anticorpo é um dos mais importantes. Quando as quantidades de antígeno e anticorpo são equivalentes (zona de equivalência) há a formação máxima de precipitado, decrescendo à medida em que um dos

dois reagentes está em excesso: pró-zona ou zona de excesso de anticorpo e pós-zona ou zona de excesso de antígeno. Em virtude da reversibilidade da reação, o excesso de um dos reagentes pode induzir à dissociação do precipitado formado, causando erros de interpretação dos resultados. Esta situação é prevista e minimizada durante os processos de padronização dos ensaios.

reatividade). A densidade da linha de precipitação e a distância em relação ao orifício da amostra pode dar alguma indicação da concentração do anticorpo. Estas reações continuam sendo utilizadas por alguns laboratórios devido a sua especificidade, principalmente no diagnóstico de infecções causadas por fungos e para a detecção de alguns auto-anticorpos.

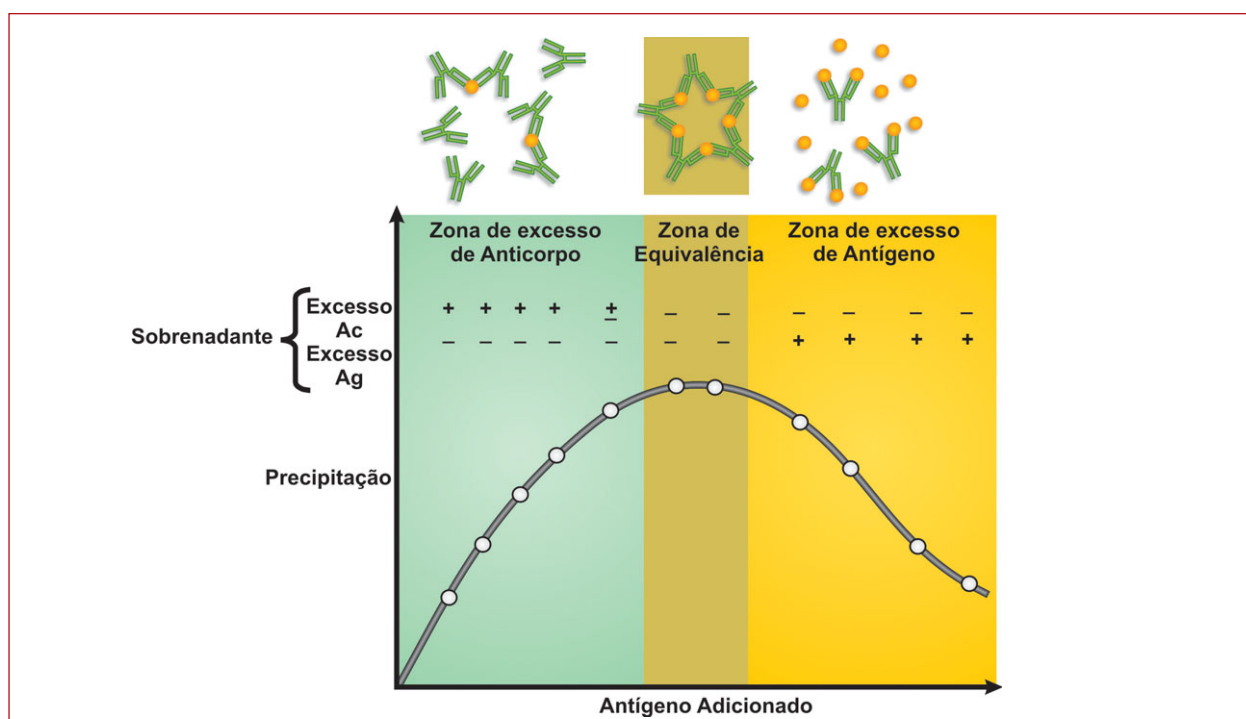


Fig. 5.1 – Curva de formação de imunocomplexo em função da quantidade de antígeno adicionada. (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/3231MMUN/C2_AGAB.)

A reação de precipitação, em tubo de ensaio, pode ser utilizada, por exemplo, para a detecção de imunoglobulinas do soro humano que se precipitam a baixas temperaturas (crioglobulinas) (Fig. 5.2).

Imunodifusão Radial Dupla

Também chamada de difusão de Ouchterlony, é um método semi-quantitativo baseado na premissa que quando ambos os reagentes (um antígeno desconhecido e moléculas de um anticorpo poliespecífico) são colocados a difundir em um meio suporte, o ponto onde os reagentes se encontram e formam pode ser visualizado como uma linha ou banda de precipitação (Fig. 5.3).

Esta reação é estritamente qualitativa ou semi-quantitativa (resultado expresso como a máxima diluição da amostra do paciente que apresente

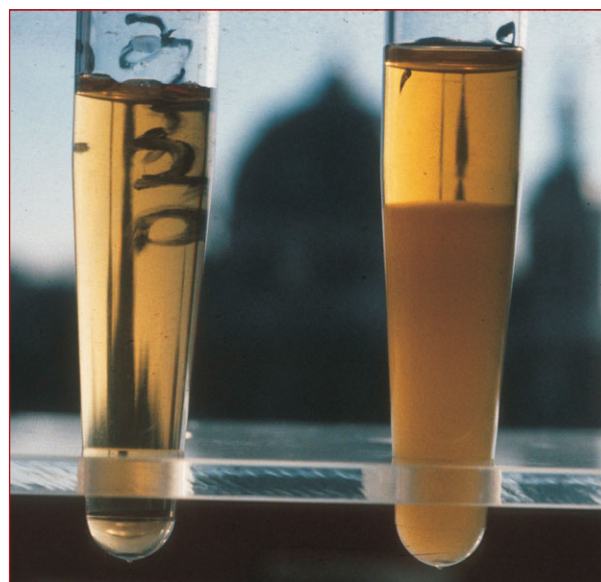


Fig. 5.2 – Prova de precipitação simples demonstrando presença de crioglobulinas no soro à direita, em paciente com infecção pelo vírus da hepatite C.

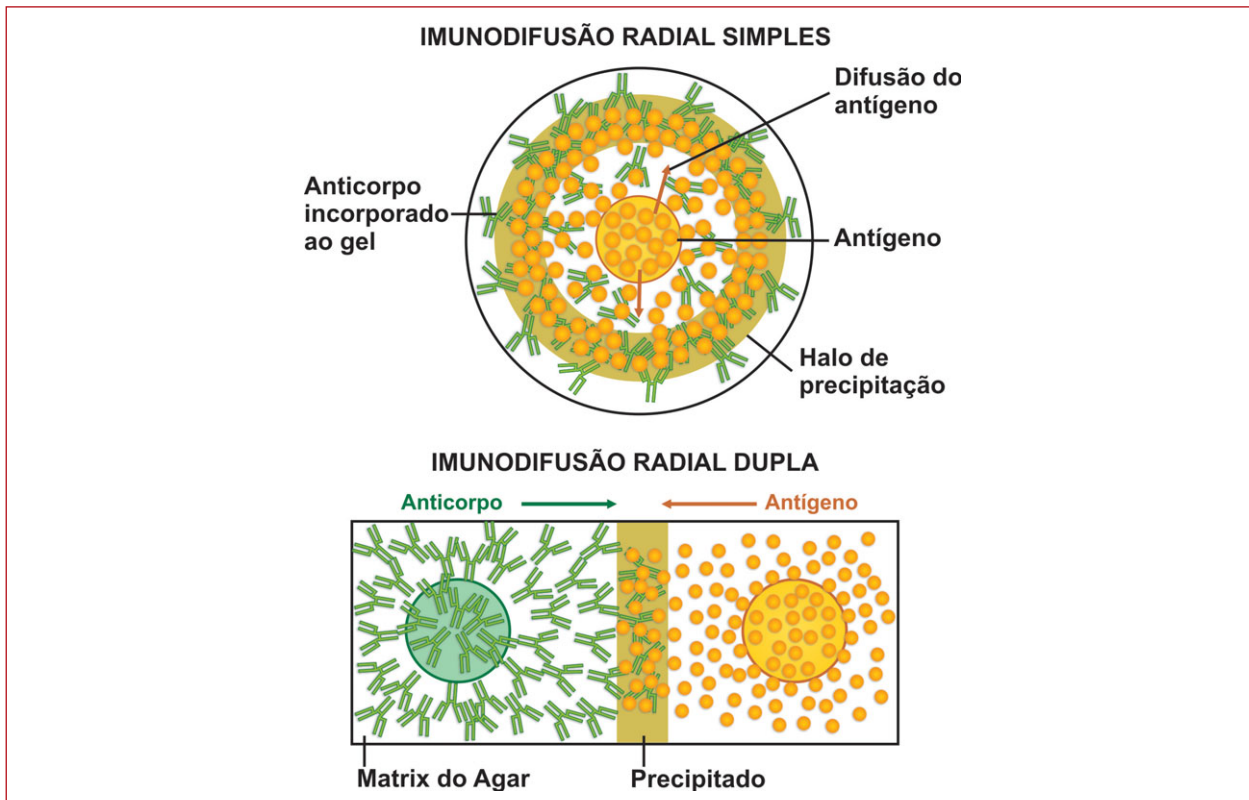


Fig. 5.3 – Reações de imunodifusão radial simples e dupla. (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/3231MMUN/C2_AGAB.)

Imunodifusão Radial Simples

É a variação quantitativa da imunodifusão radial dupla. Nesta técnica o anticorpo é uniformemente distribuído no gel e o antígeno (amostra teste) é aplicado em um orifício. A amostra teste difunde radialmente no gel, formando um halo de precipitação circular em torno do orifício da amostra (Fig. 5.3).

A difusão depende do tamanho do orifício, temperatura, consistência do gel, concentração do anticorpo incluído no gel, tempo de difusão e outros parâmetros. O diâmetro do halo de precipitação formado é proporcional à concentração do analito pesquisado na amostra. Pela comparação do diâmetro do halo da amostra-teste com padrões de concentração conhecida (curva padrão), estabelece-se a concentração do analito na amostra. Esta técnica pode ser utilizada principalmente na quantificação de proteínas como imunoglobulinas, fatores do complemento, proteínas de fase aguda, cadeias leves e proteínas de transporte.

TÉCNICAS ENVOLVENDO SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA

Nestas técnicas ocorre a migração de partículas carregadas em um solvente condutor sob a influência

de campo elétrico. O movimento das moléculas em um campo elétrico depende principalmente da sua carga, que é por sua vez determinada pelo pH do suporte. Como as moléculas de proteínas se tornam ionizadas, migram ao eletrodo com carga oposta (para o polo positivo, se a carga de superfície for negativa ou vice-versa). Esse é o princípio da separação eletroforética de misturas complexas, como as proteínas do soro (Fig. 5.4). Deste modo, a eletroforese de proteínas é adotada para separação em métodos como imunoeletroforese e imunofixação.

Imunoeletroforese

Combina a eletroforese em gel, seguida da imunodifusão e precipitação das proteínas. É um procedimento em duas etapas que primeiro envolve a separação eletroforética das proteínas, seguida de imunodifusão de cada componente, a partir do seu centro de difusão, contra o anti-soro específico, formando uma linha ou arco de precipitação na região de equivalência. Assim, a caracterização de uma substância é feita a partir de suas propriedades eletroforéticas (mobilidades diferentes devido a cargas elétricas diferentes), coeficientes de difusão e propriedades imunológicas (especificidade). O sistema de imunodifusão que se obtém aproxima-se de uma

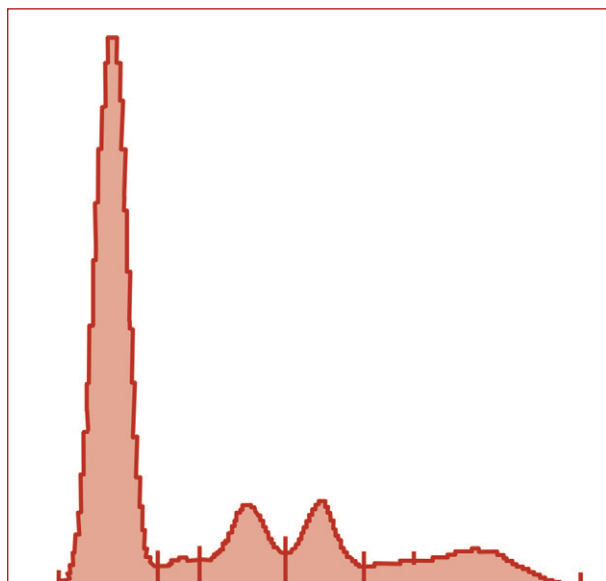


Fig. 5.4 – Eletroforese de proteínas séricas. Da esquerda para a direita, as frações albumina, α_1 , α_2 , β e γ -globulinas. (Figura cedida pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUC – RS.)

dupla difusão bidimensional e, portanto, os padrões de precipitação obtidos podem ser interpretados como nas técnicas de dupla difusão .

A imunoeletroforese pode ser utilizada para detecção de proteína-M (monoclonal). É tecnicamente mais fácil e de menor custo quando comparada à técnica de imunofixação, no entanto não é tão sensível.

Imunofixação

A imunofixação deve ser realizada quando um pico ou banda é encontrada na eletroforese de proteínas séricas ou quando há suspeita de gamopatia monoclonal. A imunofixação combina a eletroforese e a imunoprecipitação. É um procedimento em dois estágios: primeiro a amostra é aplicada em seis posições diferentes do gel de agarose e as proteínas são separadas por eletroforese de acordo com a carga. Após, soros monoespecíficos para IgG, IgA, IgM, cadeia *kappa* e cadeia *lambda* impregnados numa fita de papel ou acetato de celulose são colocados individualmente sobre cada posição, seguidos da aplicação de solução fixadora de proteínas. Se o antígeno complementar estiver presente em proporções adequadas na amostra, os complexos formados precipitam e são fixados no gel, o que permite sua identificação com o auxílio de um corante (Fig. 5.5). O teste é utilizado na detecção precoce de gamopatias monoclonais, na intervenção terapêutica em casos novos e na recorrência de mieloma.

Permite a identificação de gamopatias biclonais e de doença de cadeias pesadas e leves, auxiliando no diagnóstico e na monitorização de outras doenças linfoproliferativas.

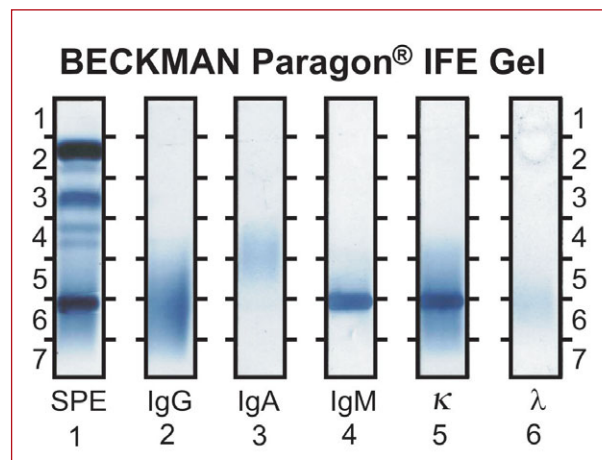


Fig. 5.5 – Eletroforese com imunofixação. SPE é a eletroforese de referência e, a seguir, cada campo foi analisado com o anti-soro respectivo (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa e anti-lambda). Notamos neste paciente a presença de proteína M monoclonal em IgM-kappa. (Figura cedida pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUC-RS).

TÉCNICAS ENVOLVENDO A DISPERSÃO DA LUZ

Nefelometria

Uma característica importante das soluções coloidais é a sua pronunciada dispersão da luz. Quando um feixe de luz incidente atravessa um meio contendo partículas, estas interferem com a passagem da luz, fazendo com que seja dispersa em todas as direções. Este fenômeno, conhecido como efeito *Tyndall*, não altera o comprimento de onda da luz incidente e é independente do tipo de partícula (Fig. 5.6).

Os ensaios nefelométricos se baseiam no princípio de que um imunocomplexo em solução dispersa luz em vários ângulos em relação à luz incidente. Um nefelômetro utiliza uma fonte de luz de alta intensidade que incide em uma cubeta contendo os imunorreagentes.

A quantidade e a natureza da dispersão dependem da forma e do tamanho das partículas, da concentração, do comprimento de onda e do índice de refração do meio. A nefelometria é totalmente automatizada, de realização fácil, rápida e precisa, principalmente se forem utilizados nefelômetros que subtraíam ruídos, como os causados por lipemia ou hemólise,

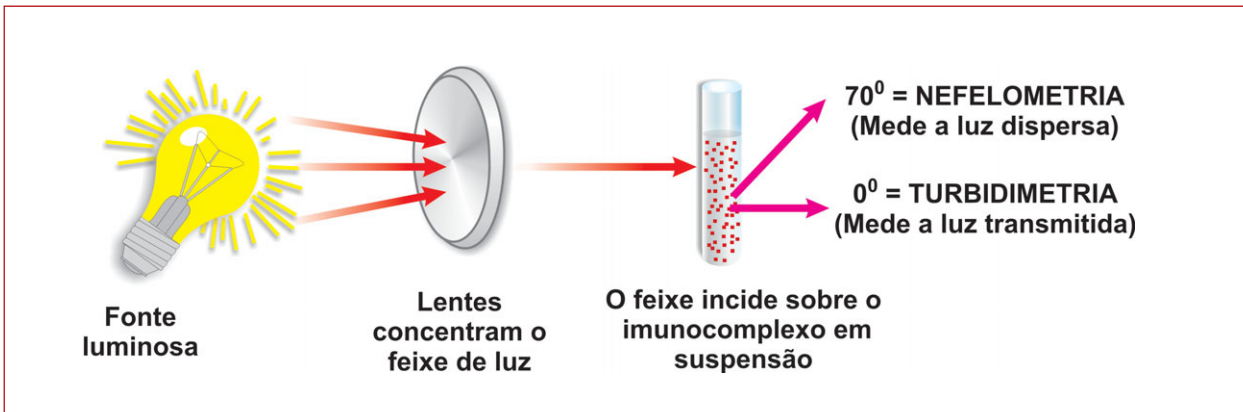


Fig. 5.6 – Esquema do princípio físico da nefelometria e da turbidimetria.

e que garantam leitura na região de excesso de anticorpo. Medidas acuradas só podem ser feitas nesta região porque é onde existe relação linear entre a concentração da substância e a densidade ótica. Dentre as aplicações mais comuns temos as determinações de proteínas específicas como alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína-ácida, alfa-2-antiplasmina, IgG, IgA, IgM, C3, C4, apolipoproteínas, beta-2-microglobulina, anti-estreptolisina O, proteína C reativa ultrasensível e fator reumatóide.

Turbidimetria

Este teste está sujeito às mesmas condições dos sistemas nefelométricos. O sinal de detecção é a absorbância e não a intensidade de luz dispersa (Fig. 5.6). Não necessita de aparelhagem especial. As reações podem ser medidas em espectrofotômetros simples utilizados em bioquímica. Pode ser utilizada para medidas quantitativas de drogas ou biomarcadores no soro, plasma ou urina.

REAÇÕES DE AGLUTINAÇÃO

A ligação cruzada com produção de agregados ocorre quando um anticorpo reage com um antígeno

multivalente presente em uma partícula (insolúvel). A partícula insolúvel pode ser um antígeno insolúvel nativo, antígenos expressos em células (por exemplo, antígenos eritrocitários) ou partículas cobertas com antígenos (por exemplo, partículas de látex). As reações de aglutinação têm boa sensibilidade e podem ser analisadas por inspeção visual, no entanto são mais sujeitas a resultados falso-positivos devido à aglutinação inespecífica.

Reação de Aglutinação Direta

Nesta reação utilizam-se partículas antigênicas insolúveis em sua forma íntegra ou fragmentada: hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpo. São realizadas diluições em série do anticorpo frente a uma quantidade constante do antígeno. Após um período de incubação a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso como a máxima diluição em que ocorre a aglutinação (Fig. 5.7). Exemplos de reações de aglutinação direta: tipagem de grupos sanguíneos (antígenos específicos), reação de Paul-Bunnell-Davidson (antígenos heterófilos), teste de Widal para salmoneloses, teste de aglutinação para toxoplasmose e tripanossomíase.

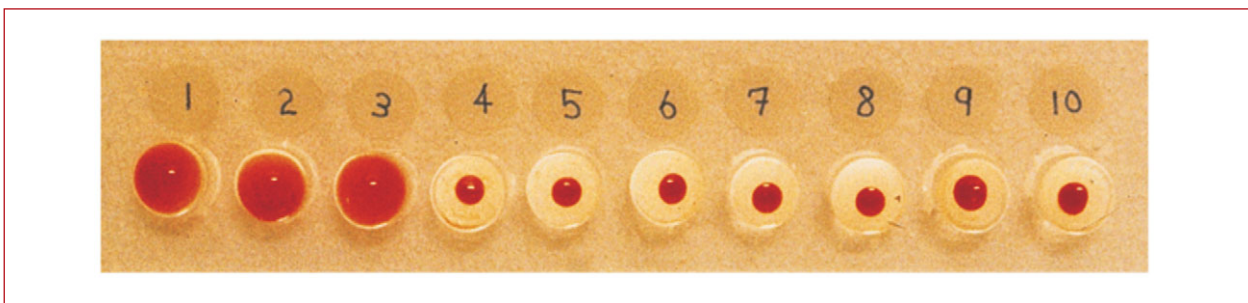


Fig. 5.7 – Reação de hemaglutinação. (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/3231MMUN/C2_AGAB.)

Reação de Aglutinação Passiva ou Indireta

Nas reações de aglutinação passiva ou indireta, as hemácias e as partículas inertes (bentonita, látex, *sepharose*, leveduras, gelatina) podem ser sensibilizadas por adsorção passiva. Isto pode ser feito através de contato direto com antígenos solúveis, por adsorção via agentes químicos solúveis, por adsorção com agentes químicos, (p. ex. ácido tânico ou cloreto de cromo) e por conjugação através de ligações químicas covalentes. Estes processos de adsorção fornecem reagentes estáveis. Devido à grande diversidade de antígenos que podem se ligar às células ou partículas, a aplicação dos testes de aglutinação passiva é muito variada.

Reação de Inibição da Aglutinação

As reações de inibição da aglutinação são baseadas na competição entre antígenos particulados e solúveis por um número limitado de sítios combinatórios em moléculas de anticorpos. A inibição da aglutinação é um indicador de reação positiva. Um exemplo de técnica de inibição da aglutinação é a testagem para a presença do hormônio da gonadotrofina coriônica (hCG) como teste de gravidez.

Teste de Aglutinação do Látex

Partículas de látex são esferas de poliestireno utilizadas como suportes na adsorção de proteína solúvel e antígenos polissacarídicos, funcionando como sistema indicador da reação antígeno-anticorpo. O teste pode ser empregado na pesquisa de antígenos ou anticorpos. A aplicação mais comum é na detecção de fator reumatóide IgM, dirigido contra isotipos de IgG, IgA1, IgM ou IgE.

Teste de Aglutinação de Cristais de Colesterol

O teste do VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) emprega cristais de colesterol que são sensibilizados com lecitina e cardiolipina para a pesquisa de anticorpos cardiolipídicos da sífilis ou na presença de auto-anticorpos da síndrome anti-fosfolípide primária ou secundária, neste caso em geral associada ao lúpus eritematoso sistêmico.

Coaglutinação

Nos testes de coaglutinação estafilocócica, cepas de *Staphylococcus aureus* mortos e intactos são usadas para visualização. A parede celular desses

microrganismos contém proteína A, que se liga à porção Fc do anticorpo IgG, deixando a porção Fab livre para reagir com o antígeno específico. As reações de coaglutinação são mais susceptíveis à aglutinação inespecífica. A aglutinação visível das partículas de *Staphylococcus aureus* indica a reação antígeno-anticorpo.

ENSAIOS LÍTICOS

Reação de Fixação do Complemento

A presença de anticorpo específico no soro do paciente é detectada através da utilização de antígeno, complemento e eritrócitos. Se o anticorpo está presente, este irá se ligar ao antígeno específico. O imunocomplexo formado ativa a cascata do complemento pela via clássica e haverá consumo de complemento. Na segunda etapa, adiciona-se o sistema indicador da reação que consiste de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (anticorpo anti-hemácias de carneiro obtido em coelhos). A medida da atividade hemolítica do complemento no sistema indicador permite determinar a presença ou não de antígeno ou anticorpo na mistura inicial e sua quantidade. A atividade hemolítica pode ser quantificada empregando-se diluições seriadas da amostra a ser analisada. Tanto o anticorpo como o antígeno não podem ter atividade anticomplementar, isto é, ativar o complemento separadamente.

Em laboratórios de Saúde Pública a reação de fixação do complemento é usada para tipagem de isolados virais.

Ensaio de Neutralização

É semelhante à reação de fixação do complemento, mas é aplicável somente em certas situações patogênicas onde o anticorpo a ser medido é dirigido contra uma hemolisina (toxina bacteriana capaz de lisar diretamente os eritrócitos). Nestas situações, a hemolisina e os eritrócitos reagentes são adicionados e, se o anticorpo à hemolisina está presente, a lise dos eritrócitos não ocorrerá. A quantificação é realizada pela diluição seriada da amostra

ENSAIOS COM MARCADORES FLUORESCENTES

Fluorocromo (ou fluoróforo) é uma substância que absorve luz de comprimento de onda menor e emite luz de comprimento de onda maior quando excitado, fenômeno conhecido como fluorescência.

A liberação de energia na fluorescência é imediata. Os fluorocromos são moléculas orgânicas com comprimento de onda de excitação característico. O intervalo de tempo entre a absorção de energia e a emissão da fluorescência é muito curto, da ordem de nanosegundos.

Testes fluorescentes homogêneos de modulação direta

São baseados na capacidade da molécula de fluoresceína em emitir luz polarizada em um plano após excitação. O sinal emitido é modificado quando o antígeno marcado se liga ao anticorpo, como por exemplo no sistema *Fluorescence Polarization Immunoassay* (FPIA). Neste, um composto marcado com fluoresceína (normalmente um fármaco ou droga) compete com o composto não marcado, da amostra analisada, pelo sítio de ligação em um anticorpo específico. Quanto menor a quantidade do composto na amostra, maior a quantidade de composto marcado ligado ao anticorpo específico em solução, com retenção da luz polarizada incidente. Este ensaio é adequado para a detecção de moléculas pequenas e é muito utilizado para a monitorização terapêutica ou dosagem de drogas de abuso, sendo rápido e reprodutível.

Testes Fluorescentes Heterogêneos (Fig. 5.8)

Reação de Imunofluorescência Direta

É a detecção direta de antígenos usando anticorpo antígeno-específico marcado com substância fluorescente. Pelo fato de ser utilizada para detectar

antígenos em tecidos biológicos (material de biópsias, vírus, bactérias, células etc.), é raramente quantitativa. Essa técnica é muito utilizada para a pesquisa de vírus respiratórios (influenza, parainfluenza, vírus sincicial respiratório e adenovírus).

Reação de Imunofluorescência Indireta

No teste de imunofluorescência indireta o anticorpo presente na amostra do paciente reage com um antígeno específico fixado em uma lâmina de microscopia. Um passo de lavagem é realizado e um anticorpo anti-humano (conjugado) marcado com substância fluorescente é adicionado. Após um segundo passo de lavagem, para remover o conjugado não ligado, a observação de fluorescência ao microscópio é indicativa da presença do anticorpo em estudo na amostra do paciente. O conjugado é isotipo-específico, sendo assim possível distinguir reações condicionadas pela presença de IgG, IgA e IgM.

A imunofluorescência indireta é o teste de referência na sorologia de muitas doenças, como as infecciosas e auto-ímmunes (Figs. 5.9 e 5.10). É sensível, específica em sua reação molecular, reprodutível e de padronização e execução simples. O mesmo conjugado pode ser utilizado em sistemas diferentes. A necessidade de microscópio de fluorescência, a qualidade do sistema de iluminação empregado a subjetividade na leitura podem ser fatores limitantes. O teste é muito utilizado para a pesquisa de auto-anticorpos em doenças difusas do tecido conjuntivo, nas vasculites sistêmicas (ANCA) e no diagnóstico de infecções pelo *Treponema pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, para as diversas *Chlamydiae*, entre outros.

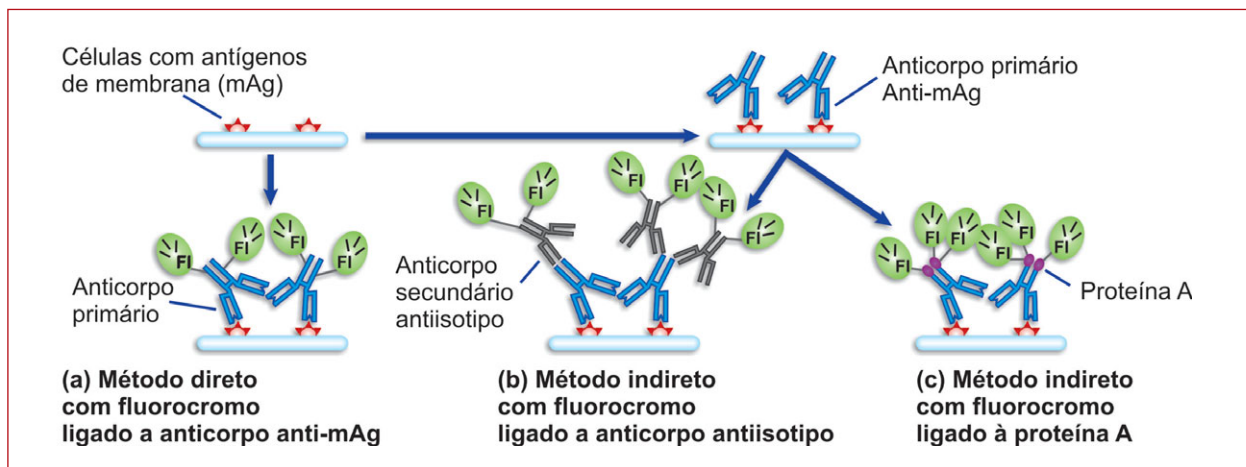


Fig. 5.8 - Testes fluorescentes heterogêneos: em (a) imunofluorescência direta (IFD), em (b) imunofluorescência indireta (IFI) com anticorpo antiisotipo e em (c), IFI com proteína A marcada com substância fluorescente. (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/323IMMUN/C2_AGAB)

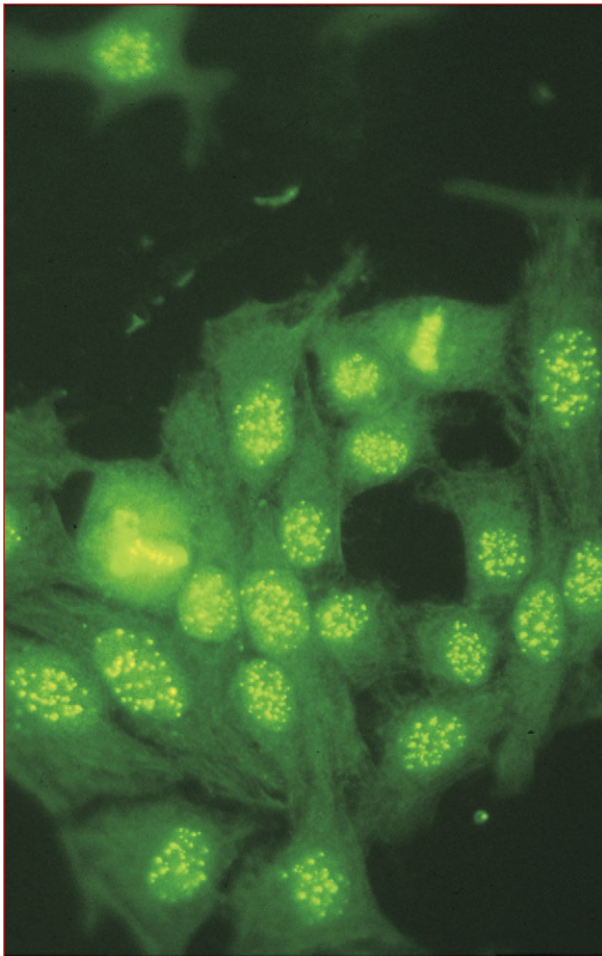


Fig. 5.9 - Imunofluorescência indireta em células de epitélio humano (HEp-2) mostrando padrão nuclear pontilhado grosso e células em metáfase igualmente decoradas, características da presença de auto-anticorpos anti-centrômero. Estes auto-anticorpos são vistos na esclerose sistêmica, cirrose biliar primária e em alguns casos de síndrome de Sjögren.

Citometria de Fluxo

É a aplicação das técnicas de imunofluorescência na identificação de determinadas células em suspensão, ou seja, na identificação de antígenos em células vivas. Quando uma suspensão de células marcadas é colocada em um separador de células ativado por fluorescência (FACS), o aparelho determina a intensidade da fluorescência de cada célula. As células são separadas conforme sua emissão fluorescente característica. Esta técnica permite, além da análise fenotípica e funcional de subpopulações celulares, o isolamento de diferentes populações celulares com distintos antígenos de superfície corados por diferentes anticorpos fluorescentes (Fig. 5.11).

A citometria de fluxo é ferramenta diagnóstica e prognóstica na avaliação de doenças malignas e benignas, transplante de órgãos e tecidos, imunodeficiências primárias e adquiridas. Exemplos da

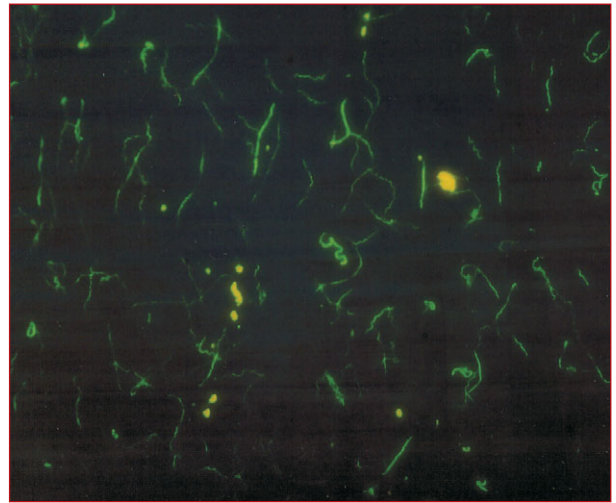


Fig. 5.10 - Imunofluorescência indireta positiva para borreliose de Lyme. Soro de paciente contendo anticorpos IgM, na fase aguda da doença.

aplicação são a quantificação de populações celulares (CD4+, CD8+), identificação de antígenos leucocitários como HLA B27, HLA DR4 e imunofenotipagem.

Ensaio de Citometria de Fluxo Baseado em Partículas Multiplex

Ensaio desenvolvido recentemente que combina a citometria de fluxo com microesferas. Várias destas microesferas são produzidas por diferentes empresas. Um destes sistemas consiste de 100 diferentes tipos de microesferas produzidas de forma uniforme, com proporções e níveis de fluorescência do vermelho e laranja (detectado em um equipamento FACScan) distintas. Cada microesfera forma a base de um ensaio individual, eis que apresenta endereço espectral específico, usando a fluorescência verde para analisar os resultados (FL1). Assim, um primeiro feixe de laser lê qual a esfera específica que está passando pelo detector, e o segundo feixe lê a reação em sua superfície. Este sistema facilita o desenvolvimento de ensaios multiplexados, que simultaneamente medem diferentes analitos em um pequeno volume de amostra (Fig. 5.12). Eles são rápidos, não requerem lavagem para separação da fase livre daquela ligada e podem ser realizados em menos de 2 horas.

ENSAIOS DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Imunoperoxidase

É um ensaio semelhante à imunofluorescência indireta em que a presença de anticorpo é identi-

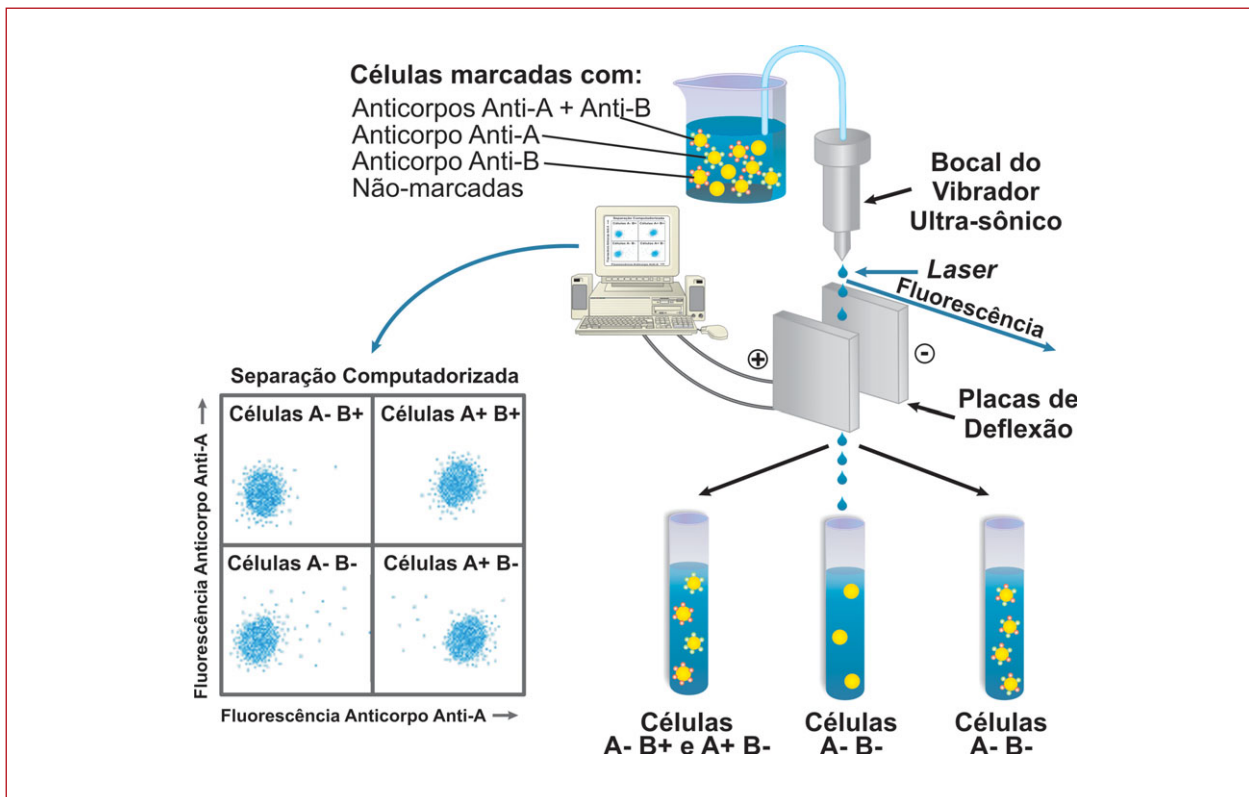


Fig. 5.11 - Esquema de separação de população de células expressando ou não antígenos A e B marcados, identificados por anticorpo marcado com molécula fluorescente. Após análise computadorizada as populações celulares são representadas graficamente em função da fluorescência emitida após marcação. (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/323IMMUN/C2_AGAB).

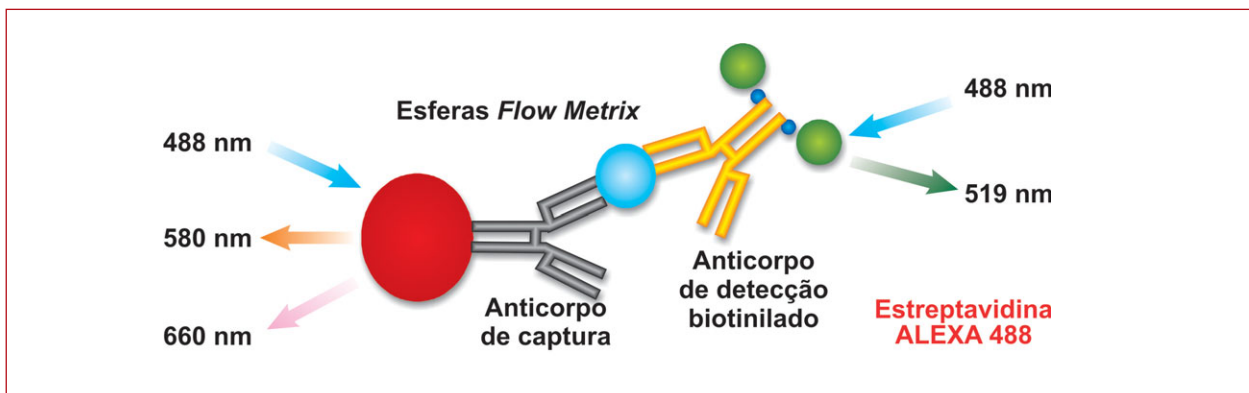


Fig. 5.12 - Representação esquemática dos reagentes utilizados no ensaio de citometria de fluxo baseado em partículas Multiplex. As linhas azuis representam a luz excitatória incidente, as linhas das demais cores, os padrões de emissão.

cada visualmente no substrato antigênico. Contudo, na imunoperoxidase indireta, em vez de o conjugado ser um anticorpo marcado com uma substância fluorescente, o conjugado é marcado com uma enzima (principalmente peroxidase), que reage com o seu substrato correspondente produzindo um produto que pode ser visto em um microscópio ótico, e eliminando teoricamente o custo do microscópio de imunofluorescência.

Imunocitoquímica

Envolve a avaliação microscópica computadorizada após ensaio de imunofluorescência ou imunohistoquímica em material de biópsia. Há aumento na especificidade com a remoção da subjetividade do observador, podendo ser realizada a avaliação quantitativa através da análise de cor, intensidade e concentração.

ENSAIOS COM MARCADORES RADIOATIVOS

Radioimunoensaio

Os testes radioativos utilizam um reagente marcado, antígeno ou anticorpo, para quantificar o antígeno ou o anticorpo da amostra. O composto desconhecido pode ser determinado pela medida da radioatividade emitida. O termo radioimunoensaio (RIE) é utilizado usualmente quando o componente marcado é o antígeno e ensaio imunorradiométrico (IRMA) quando o componente marcado é o anticorpo. O radioisótopo mais utilizado é o iodo-125. A sensibilidade do método é da ordem de nanogramas ou picogramas.

“Radioallergosorbent Test”

É o nome dado para o método *in vitro* que detecta anticorpos IgE (ou IgG) alergeno-específicos. Uma matriz de carboidratos (chamada *sorbent*) é revestida de alergeno, podendo ser detectados utilizando anti-anticorpo marcado com um radioisótopo.

ENSAIOS LUMINESCENTES

Ensaio Quimioluminescentes

São baseados na emissão de luz produzida em algumas reações químicas de oxidação, aqui incluídos agentes quimioluminescentes derivados biologicamente. A emissão de luz pode ser detectada ou medida utilizando-se luminômetros com tubos fotomultiplicadores, diodo de silicone em estado sólido ou filme fotográfico como detector. As reações de

quimioluminescência mais utilizadas envolvem reações de oxidação do luminol e do isoluminol, ésteres de acridina e decomposição catalisada pela fosfatase alcalina de adamantil 1,2-dioxetano aril-fosfato. São altamente sensíveis e o nível de detecção é da ordem de atomol ou zeptomol.

Eletroquimioluminescência

A eletroquimioluminescência, também chamada de quimioluminescência eletrogerada, envolve reações de transferência de um elétron na superfície de um eletrodo com geração de composto instável (excitado) que emite um fóton de luz (Fig. 5.13). Ocorre como uma reação de oxidação-redução em ciclo. O sistema mais utilizado envolve a aplicação de voltagem em um eletrodo na presença de um luminóforo eletroquimioluminescente como o rutênio $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ em presença da tripropilamina (TPA). A eletroquimioluminescência encontra aplicação em imunoenaios e análise de DNA. Este sistema é utilizado para a dosagem de hormônios, marcadores tumorais, marcadores cardíacos e detecção de anticorpos em algumas doenças infecciosas.

ENSAIO COM MARCADORES ENZIMÁTICOS

Enzimaimunoensaio

É o termo genérico para um grande número de testes que permitem ensaios quali- e quantitativos, para a detecção tanto de antígenos quanto de anticorpos. Estes testes usam o produto da mudança de cor da interação da enzima com o seu substrato para medir a reação entre o antígeno e o anticorpo.

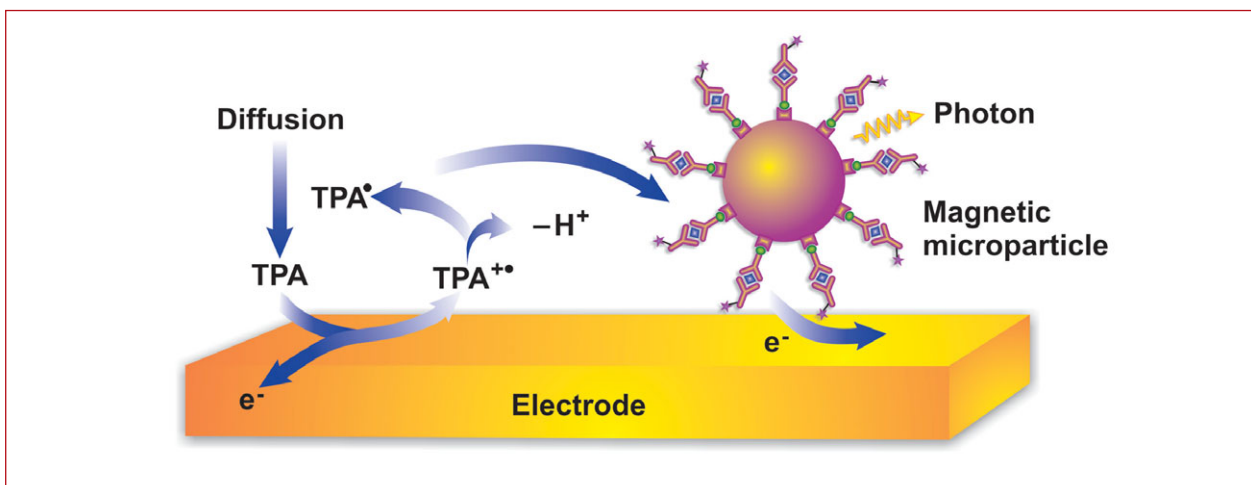


Fig. 5.13 - Esquema da reação de eletroquimioluminescência. A micropartícula magnética (fase sólida) suporta a estrutura do imunoenensaio, em que o marcador é a molécula de rutênio. O marcador participa de uma reação de oxidação-redução com a tripropilamina (TPA). (Fonte: Roche do Brasil – Divisão Diagnóstica.)

“Enzyme Multiplied Immunoassay Technique” (EMIT)

É um teste de enzimaensaio homogêneo (fase única) em que o antígeno a ser medido compete, com um antígeno marcado com enzima, por um número limitado de anticorpos. O anticorpo reagente tem a capacidade de bloquear a atividade enzimática ao ligar-se ao antígeno marcado, impedindo a formação do produto ao ser adicionado o substrato. O antígeno marcado livre resultante da competição com o antígeno da amostra reage com o substrato e forma um produto corado proporcional à concentração de antígeno presente na amostra. É um teste similar ao FPIA, com ampla aplicação no monitoramento terapêutico e pesquisa de drogas de abuso. Pode ser utilizado sangue total, soro ou urina. A vantagem do EMIT sobre o FPIA é que pode ser facilmente adaptável a analisadores automáticos de parâmetros bioquímicos. Em nosso meio o sistema EMIT tem sido utilizado na dosagem de ciclosporina em transplantados.

“Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) (Fig. 5.14)

Trata-se de técnica imunoenzimática sensível, heterogênea (múltiplas fases), para a quantificação de antígenos ou anticorpos. Um dos reagentes é imobilizado na fase sólida, enquanto outro pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo.

A fase sólida pode ser constituída por partículas de agarose, poliacrilamida, dextrano, poliestireno, etc. Placas plásticas são as mais difundidas por permitirem múltiplos ensaios e automação. O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros forem bem padronizados. Para a pesquisa de antígeno o anticorpo específico correspondente é imobilizado à fase sólida. Os conjugados enzimáticos devem ser preparados com anticorpos de alta afinidade e muito purificados. Os substratos cromogênicos empregados pela degra-

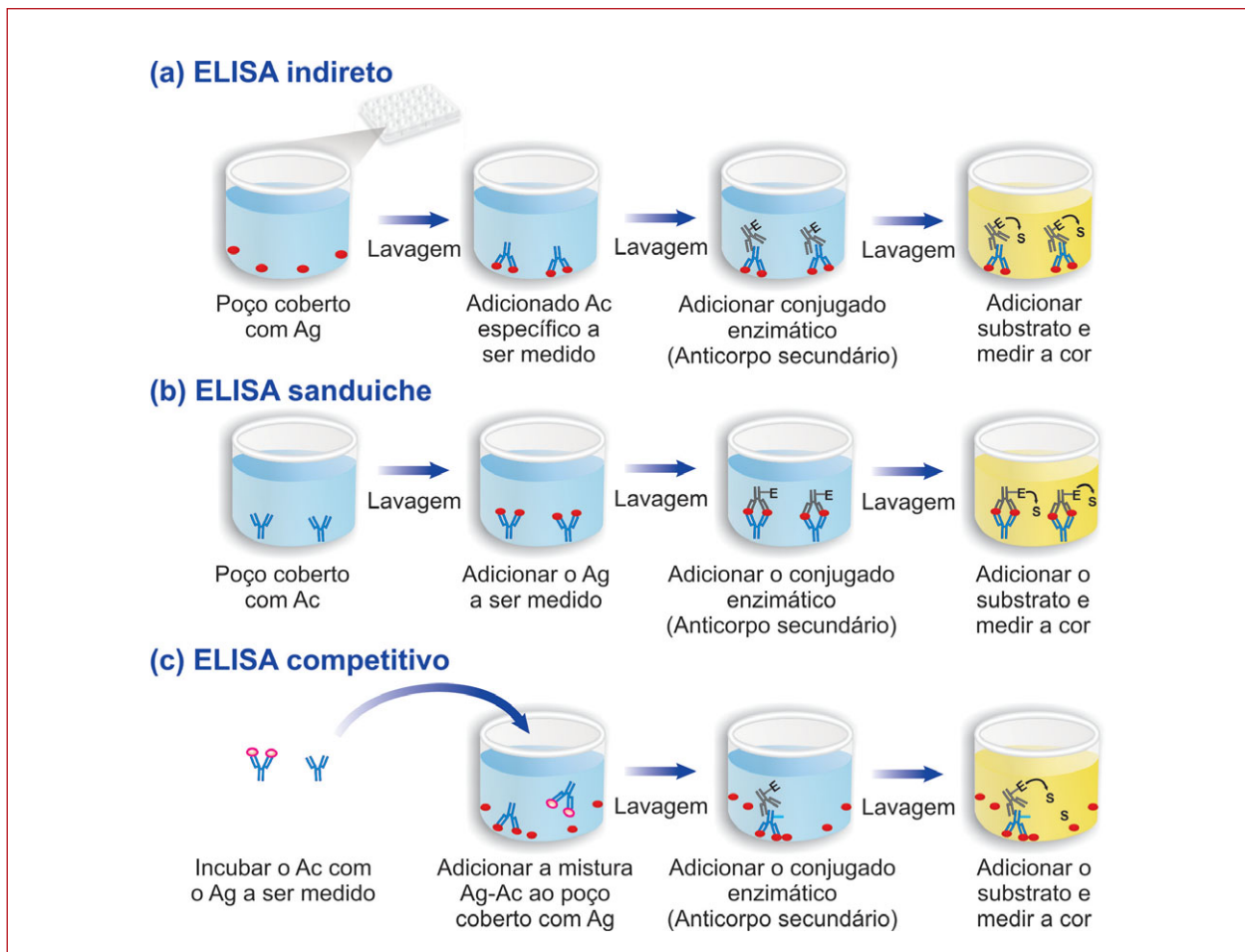


Fig. 5.14 - Esquemas dos testes enzimáticos heterogêneos do tipo indireto (a), sanduiche (b) e captura (c). (Fonte: http://www.uoguelph.ca/mbnet/323IMMUN/C2_AGAB.)

dação enzimática dão origem a produtos solúveis coloridos, cuja determinação é feita medindo-se a densidade óptica da solução por espectrofotometria. Para a peroxidase, o substrato é o peróxido de hidrogênio e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são a ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-amino-salicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotialino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB).

ELISA Direto é uma técnica para a medida de antígeno baseada na competição entre o antígeno da amostra e o antígeno marcado com enzima pelo anticorpo. *ELISA Indireto*, ou ensaio imunométrico, mede a concentração de anticorpo usando o antígeno ligado à fase sólida, onde o anticorpo da amostra se ligará. O imunocomplexo será evidenciado pelo anti-anticorpo marcado com enzima (pode ser isotipo-específico: IgG, IgA, IgM) e a subsequente adição do substrato/cromógeno. A especificidade do ensaio de ELISA indireto para a detecção de anticorpos da classe IgM em doenças infecciosas é limitada, ocorrendo resultados falso-positivos devido à interferência do fator reumatóide na presença de anticorpos IgG específicos. O uso de imunoadsorventes comerciais pode minimizar este problema.

ELISA com Captura de IgM

Foi desenvolvido para solucionar o problema descrito da interferência do fator reumatóide na presença de anticorpos IgG específicos. Neste ensaio, anticorpos anti-IgM são adsorvidos à fase sólida, capazes de fixar todos os anticorpos de isotipo IgM da amostra do paciente. Após, o antígeno é adicionado, ligando-se ao anticorpo específico da amostra anteriormente imobilizado. Um segundo anticorpo anti-antígeno marcado com enzima é adicionado e, subsequentemente, o substrato/cromógeno, resultando em um produto corado de intensidade proporcional à concentração de IgM específica presente na amostra. Esta técnica é o método de escolha para a detecção de anticorpos IgM específicos.

Enzimaimunoensaio com Micropartículas (MEIA)

É uma técnica imunoenzimática em que o suporte sólido consiste de pequenas micropartículas em suspensão líquida.

Western Blotting

É um procedimento em que as proteínas são separadas pelo tamanho por eletroforese e, após

separação, transferidas para uma membrana de nitrocelulose onde ficam imobilizadas. Essa membrana é utilizada como suporte sólido para um ensaio imunoenzimático, semelhante ao método da imunoperoxidase.

Essa técnica pode ser empregada para a pesquisa de antígenos ou de anticorpos, sendo um importante auxiliar no diagnóstico de doenças infecciosas e auto-imunes. Utilizando-se este teste, pode-se determinar se há antígeno ou anticorpo na amostra e qual é a sua especificidade, se o preparado é puro ou não, quais proteínas estão sendo reconhecidas por um anticorpo, distinguir diferentes perfis de anticorpos de acordo com a fase da doença ou infecção ou, de acordo com a presença ou não de infecção, diferenciar entre cepas patogênicas e não patogênicas. É também utilizado como teste confirmatório na investigação de doenças infecciosas e auto-imunes (Fig. 5.15).

IMUNIDADE CELULAR E FUNÇÕES FAGOCÍTICAS

A presente seção pretende apresentar os ensaios disponíveis para avaliar laboratorialmente aspectos importantes da função imunológica, como a resposta imune celular e as funções de quimiotaxia e explosão oxidativa de células fagocíticas. Estes temas foram assim distribuídos:

- Avaliação da Imunidade Celular
 - Avaliação da função das células T:
 - Contagem absoluta de linfócitos.
 - Contagem das subpopulações de linfócitos.
 - Análise funcional dos linfócitos (a citometria de fluxo na avaliação da ativação e proliferação dos linfócitos).
 - Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (*delayed-type hypersensitivity-test – DHT*).
 - Produção de citocinas.
 - Ensaios de citotoxicidade.
- Alguns Exemplos da Aplicação Clínica dos Testes de Avaliação da Imunidade Celular
 - Avaliação das Funções Fagocíticas: Oxidação e Quimiotaxia
 - Indicações clínicas para os ensaios de avaliação da função fagocítica.
 - Procedimentos laboratoriais:
 - Isolamento de neutrófilos e monócitos.

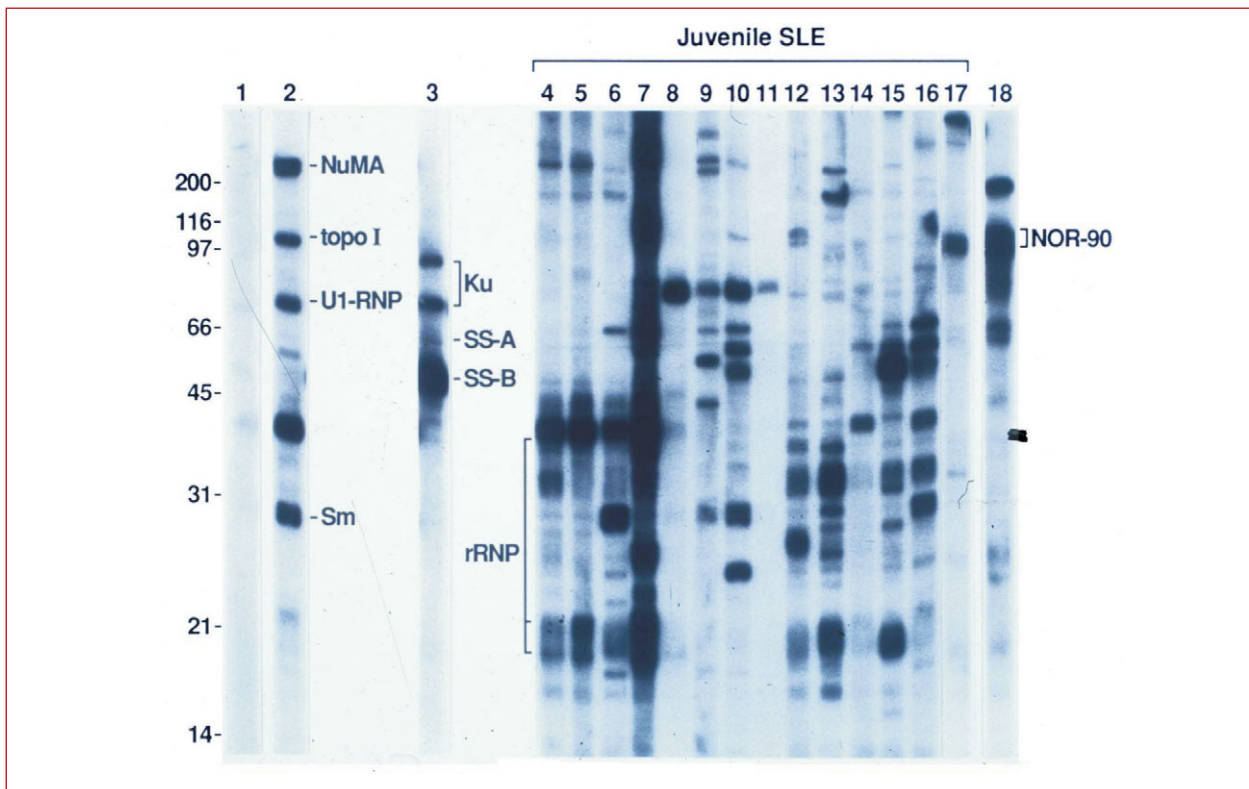


Fig. 5.15 - Western Blot de soros de crianças com diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico juvenil. Em 1, soro controle negativo, em 2 e 3, soros controle positivos, conforme indicado. Entre 4 e 17, fitas com reações individuais de auto-anticorpos. Perceber a presença de auto-anticorpos contra proteína P ribossomal (rRNP) em 4 a 7, bem como a grande variedade de bandas representativas da presença de mais de um auto-anticorpo nos casos juvenis de lúpus. Em 18, soro reagindo com o antígeno NOR-90 (human upstream binding factor), proveniente de criança com fenômeno de Raynaud.

Ensaio de atividade microbicida.
 Ensaio de quimiotaxia.
 Ensaio em lâmina do NBT.
 Ensaio com a diclorofluoresceína.
 Imunofenotipagem.

– Passos na investigação da função fagocítica.

AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR

A compreensão do sistema imune é melhorada pela detecção de anormalidades discretas em pacientes com suspeita de deficiência imune. Estes avanços vieram de estudos da função e diferenciação celular normais, da deleção gênica experimental e da análise detalhada das síndromes de imunodeficiências humanas. Novas abordagens experimentais têm ajudado a elucidar os mecanismos e bases funcionais da desregulação imune em pacientes com mutação genética primária (congenita) do sistema imune ou infecções secundárias (adquiridas). Em geral, as deficiências imunes não podem ser distinguidas pela apresentação clínica das infecções. A informação

genética é um componente cada vez mais importante da testagem e interpretação diagnóstica. O papel do laboratório de imunologia clínica é o de traduzir os novos rumos da pesquisa em testes relevantes para a investigação individual do paciente¹.

Quando Fazer a Avaliação da Imunidade Celular?

Os testes que avaliam a função celular podem ser caros e demorados. A escolha do teste depende da suspeita clínica. Existem poucos testes totalmente específicos e os seus resultados devem ser interpretados com cautela.

A decisão de investigar a resposta imune em um paciente normalmente começa devido a uma aumentada suscetibilidade a infecções, aumento na gravidade de infecções comuns ou por reação atípica a imunizações. Desta forma, os testes de triagem iniciais devem incluir a presença de infecção pelo HIV.

Alterações imunes podem acompanhar muitas entidades clínicas, incluindo doenças malignas e tratamento da hemofilia, doenças hematológicas,

trombocitopenia auto-imune, doenças linfoproliferativas, hemoglobinopatias e anormalidades cromossômicas, como por exemplo a síndrome de DiGeorge e a síndrome de Down. Doenças auto-imunes como a doença mista do tecido conjuntivo, o lúpus eritematoso sistêmico, o diabetes tipo 1, a esclerose amiotrófica lateral, a esclerose múltipla e a miastenia *gravis* podem estar associadas a alterações imunes celulares.

Avaliação da Função das Células T

Os testes de triagem para a avaliação da função das células T são freqüentemente seguidos por testes adicionais para completar a avaliação da imunidade celular. Dada a complexidade destes testes complementares, eles normalmente só são disponíveis em grandes centros com laboratórios especializados de imunologia.

Os testes disponíveis para a avaliação das células T incluem:

- Contagem absoluta de linfócitos.
- Contagem das subpopulações de células T.
- Análise funcional das células T.
- Teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (*delayed-type hypersensitivity* – DHT).
- Produção de citocinas.
- Ensaio de citotoxicidade.

Contagem Absoluta de Linfócitos

As células T constituem 3/4 do pool de linfócitos circulantes, assim, uma diminuição substancial na quantidade de linfócitos T circulantes resulta em redução na contagem dos linfócitos. É um dado facilmente obtido.

É bom lembrar que a contagem absoluta de linfócitos difere significativamente entre bebês, crianças e adultos. Assim, é importante avaliar a contagem absoluta de linfócitos na faixa referencial idade-específica.

Contagem das Subpopulações de Linfócitos

A função imune diferencial é realizada por citometria de fluxo, em que os linfócitos T são separados pela expressão do seu receptor CD3. Este receptor é essencial para a ativação da população de células T. Linfócitos B são identificados pela sua imunoglobulina de superfície (detectada por anticorpos monoclonais como anti-CD19 e anti-CD20). A expressão de moléculas do MHC de classe II também pode

ser detectada por citometria de fluxo utilizando-se anticorpos anti-HLA-DR ou anti-HLA-DQ. É uma marca característica da deficiência de moléculas de MHC classe II¹ (Tabelas 5.1 e 5.2).

A citometria de fluxo é muito utilizada para avaliar o estado funcional dos leucócitos, e praticamente todos os aspectos de sua vida (e morte) são acessíveis através da técnica. A citometria de fluxo disponibiliza a imunofenotipagem multiparamétrica, ensaios funcionais celulares, achados moleculares da superfície celular, além de processos intracelulares como a produção de citocinas e a fosforilação de proteínas. A visualização e quantificação direta de células T antígeno-específicas utilizando a tecno-

Tabela 5.1. Imunofenotipagem: Subpopulações de Linfócitos

Painel básico em sangue periférico (sangue total, lisado de células vermelhas)
CD45/CD14
Controles isotipo imunoglobulinas de rato
CD3/CD19
CD3/CD4
CD3/CD8
CD3-/CD56 e 16
Painel de ativação: isolado de células mononucleares
CD45/CD14
Controles isotipo imunoglobulinas de rato
CD3/CD25 (Receptor de interleucina 2 IL-2-R)
CD3/HLA-DR

Tabela 5.2. Painel de Ativação de Células T5

Componentes	Valores de Referência
CD2	75% a 92%
CD3	63% a 84%
CD69 e CD3	0% a 2%
CD25 2 CD2	0% a 5%
CD71 e CD2	0% a 8%
HLA-DR e CD3q	1% a 9%
Receptor de célula T (TCR α - β)	59% a 84%
Receptor de célula T (TCR γ - δ)	0% a 10%

logia do tetrâmero peptídeo-MHC, em combinação com os ensaios funcionais, proporciona o estudo de subpopulações de células T específicas que sejam de interesse.

Análise Funcional dos Linfócitos (a Citometria de Fluxo na Avaliação da Ativação e Proliferação dos Linfócitos)

Uma metodologia baseada na citometria de fluxo pode ser utilizada para avaliação dos linfócitos nas várias fases do seu ciclo celular. Em geral, a análise do ciclo celular é realizada pela medida do nível de intensidade de fluorescência emitida após a marcação do DNA. A marcação mais utilizada é com iodeto de propídio (a intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA na célula). Utilizando um complexo modelo matemático, é possível medir o percentual de células contendo DNA entre $2n$ e $4n$, o que se correlaciona com o percentual de células na fase “S” do ciclo celular. Os linfócitos do sangue periférico geralmente estão na fase de repouso do ciclo celular, com menos de 5% das células na fase “S”.

Alguns laboratórios têm substituído o ensaio com a incorporação da timidina triciada por uma combinação de ensaios de indução de marcadores de superfície celular e a medida do percentual de células nas várias fases do ciclo celular após ativação.

Teste Cutâneo de Hipersensibilidade Tardia (Delayed-type Hypersensitivity Test – DHT)

O procedimento *in vivo* mais utilizado para avaliar a imunidade celular é o teste cutâneo simples. Um teste cutâneo positivo a uma resposta tipo hipersensibilidade tardia implica numa resposta imune celular intacta, bem como uma intacta quimiotaxia monocítica. Embora os testes cutâneos sejam facilmente realizáveis, os resultados negativos são de difícil interpretação, especialmente em crianças pequenas. Um teste cutâneo não é tão sensível quanto um ensaio de estimulação linfocitária *in vitro*.

O DHT utiliza antígenos aos quais o indivíduo tenha sido previamente exposto, como por exemplo o toxóide tetânico, os antígenos da *Candida albicans* e da caxumba etc. A falha na resposta pode refletir disfunção nas células T (anergia das células T, Tabela 5.3). Quando o teste cutâneo for utilizado para avaliar a imunidade celular, deve-se atentar para o fato de que o paciente seja inoculado com um antígeno ao qual certamente tenha sido exposto anteriormente, caso contrário, um teste negativo se

dará não pela anergia da célula T, e sim pelo fato da falta de exposição anterior. Normalmente é indicada a aplicação de mais de um tipo de antígeno no DHT para superar este tipo de problema.

O DHT depende da preparação do antígeno (qualidade), aplicação e interpretação da resposta (avaliação), o que requer treinamento cuidadoso dos profissionais envolvidos na sua realização.

A resposta cutânea ao veneno de hera e outras reações de hipersensibilidade de contato são equivalentes ao teste cutâneo DHT.

Tabela 5.3. Causas de Anergia no Teste Cutâneo

• Falta da história antigênica adequada, quando o painel aplicado não inclui ativadores de amplo espectro
• Imunodeficiência primária
• Infecções virais
• Má nutrição
• Doença granulomatosa crônica
• Neoplasias

Produção de Citocinas

O estudo dos mecanismos imunológicos de desenvolvimento de auto-imunidade, alergias, doenças hematológicas e imunodeficiências é impossível sem uma avaliação quali-quantitativa da produção de citocinas. Em um número de doenças do sistema imune, a quantificação de citocinas no soro e no meio de células sanguíneas estimuladas é essencial para determinar o estágio imunopatogenético do desenvolvimento de uma doença, para escolher a imunoterapia adequada e estimar a eficácia da imunocorreção específica.

Conseqüentemente, o desenvolvimento de novos métodos para estimar o nível de citocinas em meio fisiológico ou meio de cultura de células é importante não somente na pesquisa, mas também na prática médica.

Existem *kits* comerciais disponíveis para a dosagem de citocinas através de metodologia imunoenzimática (ELISA), radioimunoensaio (RIA), quimioluminescência (CLIA) ou eletroquimioluminescência (ECLIA). Atualmente, estão disponíveis em laboratórios de referência a dosagem das seguintes citocinas: IL-1, receptor antagonista de IL-1, IL-2, receptor solúvel de IL-2, IL-3, IL-4, IL-

5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, TNF- α e IFN- γ . Também estão disponíveis as dosagens de α e β -quimiocinas (moléculas com função de recrutamento e ativação de leucócitos), prostaglandinas e leucotrienos.

Alterações nas cadeias protéicas dos receptores específicos das citocinas podem estar associadas a infecções recorrentes por microrganismos oportunistas, como o *Mycobacterium avium*.

Ensaio de Citotoxicidade

A atividade citotóxica de linfócitos T, células matadoras naturais (NK) e células matadoras ativadas por citocinas é usualmente testada através de ensaios radioativos, que detectam a liberação de conteúdos citoplasmáticos após a desintegração da célula-alvo agonizante. Em contraste a esta avaliação indireta da citotoxicidade, foi descrito um ensaio de fluorescência baseado na análise direta qualitativa por citometria de fluxo de dano celular a um único nível celular. Nesta técnica, células-alvo são coradas com PKH-26, corante lipofílico que se integra à membrana celular e permite a distinção entre célula-alvo e célula efetora. Após 3 horas de incubação *in vitro*, uma outra coloração com anexina V-FITC (ann-FITC) e iodeto de propídio (PI) permite a discriminação entre células vivas, em apoptose ou necróticas. A análise de dados é realizada primeiramente nas células-alvo PKH-26 positivas, seguida da análise das subpopulações ann-FITC e PI positivas. O percentual de citotoxicidade na população de células PKH-26 é calculado pela subtração de células-alvo ann-FITC ou PI positivas não-específicas, medida em controles apropriados sem a célula efetora.

A coloração da membrana da célula-alvo como células de melanoma primário ou blastos leucêmicos revelou impregnação alta e estável do PKH-26, sem alterar a viabilidade ou imunogenicidade das células. Usando linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos, foi demonstrado que a técnica com citometria de fluxo é sensível e se correlaciona com o ensaio padrão de liberação do cromo 51, sendo o novo ensaio mais simples e altamente reprodutível.

Similarmente, a proteína fluorescente verde enriquecida (*enhanced green fluorescent protein* – EGFP) foi utilizada para avaliar a citotoxicidade de células matadoras naturais (NK) sobre células de eritroleucemia humana (linhagem K562) por citometria de fluxo. Esta nova técnica para avaliação de citotoxicidade de células NK mostrou forte associação à técnica padrão que utiliza marcação radioativa

com Cr⁵¹, sem a necessidade de pré-coloração ou pré-marcação das células-alvo.

ALGUNS EXEMPLOS DA APLICAÇÃO CLÍNICA DESTES TESTES SOFISTICADOS DE AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR

O monitoramento da resposta celular à imunoterapia do câncer pode ser avaliado. Muitos ensaios clínicos estão testando a viabilidade de estimular o sistema imune para tratar o câncer. A eficácia desta abordagem será determinada pelo desfecho, no qual a avaliação da magnitude e atividade da resposta imune é um importante ponto intermediário no desenvolvimento destas estratégias imunoterápicas.

Outra aplicação clínica são os ensaios com células NK no prognóstico do diabetes tipo I. O diabetes tipo I é uma doença caracterizada pelo distúrbio na homeostasia da glicose, que resulta da destruição auto-imune de células β produtoras de insulina no pâncreas. O ataque auto-imune ainda não está totalmente caracterizado, mas exhibe componentes tanto da alteração dos auto-antígenos quanto da falha nos mecanismos de autotolerância.

Deficiências nas células NK têm sido identificadas em modelos animais de diabetes tipo I. O trabalho de Poulton e Baxter, citado abaixo, sugere um relacionamento similar em humanos, podendo existir associação entre deficiências em células NK e diabetes tipo I. Os autores descrevem métodos apropriados para a avaliação clínica das células NK e discutem os passos necessários na testagem e validação de ensaios com células NK como um fator prognóstico no diabetes tipo I.

Estudos de laboratório são essenciais para a avaliação do estado funcional imune. O uso prudente destes testes requer, contudo, que não somente sejam usados de maneira organizada, começando com os testes simples de triagem, mas que também sejam selecionados de acordo com os indícios clínicos obtidos no histórico e exame físico do paciente. Além disso, os resultados são relativamente fáceis de interpretar quando estão claramente normais ou totalmente anormais. A dificuldade reside em determinar o atual grau de disfunção imune quando os resultados estão na zona indeterminada. Nestas situações, uma combinação de testes laboratoriais freqüentemente ajuda a esclarecer o *status* imune funcional, e a interpretação deve ser feita por um especialista em distúrbios imunes.

As avaliações de disfunções na imunidade humoral são muito mais compreendidas e os ensaios para sua avaliação mais facilmente disponíveis nos laboratórios. Com o desenvolvimento da imunoterapia e a manipulação da imunomodulação, os testes de avaliação da imunidade celular serão cada vez mais necessários para monitorar a eficácia e estimar o grau de intervenção durante a terapia. Com estes recursos, deveremos estar cada vez mais familiarizados

AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES FAGOCÍTICAS: OXIDAÇÃO E QUIMIOTAXIA

A disfunção fagocítica, atribuída aos leucócitos mononucleares (monócitos/macrófagos), polimorfonucleares ou ambos, é classificada como intrínseca ou extrínseca.

Os defeitos intrínsecos são devidos, em parte, a deficiências herdadas em enzimas-chave da via glicolítica ou da hexose-monofosfato. Estas rotas metabólicas são responsáveis pela produção de radicais de oxigênio como mecanismo microbicida, tanto nos polimorfonucleares (PMN) quanto nos mononucleares. Outros defeitos intrínsecos estão associados a deficiências das moléculas de adesão da superfície celular (CD11b, CD18), necessárias à migração da célula ou fagócito.

Os defeitos extrínsecos que comprometem a função fagocítica incluem hipogamaglobulinemia, deficiências de complemento, doenças auto-imunes, imunodeficiência adquirida e várias terapias imunossupressoras.

Indicações Clínicas para os Ensaio de Avaliação da Função Fagocítica

As situações clínicas em que algum tipo de avaliação das funções dos monócitos/macrófagos ou neutrófilos é necessária é muito variada, indo de um paciente pediátrico com história de infecção cutânea crônica, abscesso perinatal ou episódios múltiplos de pneumonia a um adulto com processo retardado de cicatrização. Com o advento da terapia com citocinas, um auxiliar à terapia pós-irradiação e quimioterapia para doenças malignas, ou no tratamento da imunodeficiência adquirida, novos testes de laboratório são necessários para avaliar a eficácia do tratamento. Os pacientes pediátricos com suspeita de disfunção neutrofilica são primeiramente triados para avaliação da explosão oxidativa intacta pelo teste simples em lâmina do *nitroblue tetrazolium*

(NBT) ou o ensaio com diclorofluoresceína (DCF) por citometria de fluxo. Se o resultado for anormal, realiza-se o ensaio de avaliação microbicida, que abrange todos os componentes dos processos fagocíticos e serve como teste funcional definitivo para o diagnóstico da doença granulomatosa crônica (CGD). O transplante de medula óssea nos pacientes com doença granulomatosa crônica é simplesmente seguido periodicamente pelo teste do NBT ou pelo ensaio DCF, para monitorar o bom êxito inicial e sustentado do enxerto.

A terapia com citocinas como uma forma de aumentar os mecanismos de defesa está se tornando um procedimento freqüente em pacientes com predisposição transitória ou crônica às infecções. Alguns exemplos incluem pacientes sob tratamento de doenças malignas ou tratados com terapia antiviral imunossupressora para a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS). Nestes casos, a avaliação da modulação positiva (*upregulation*) de monócitos/macrófagos ou neutrófilos é realizada através da presença de marcadores de superfície como Ia, CD11b, CD64(FcR I), CD16 (FcR III) e CD 18 porque estes marcadores têm um papel importante na resposta inflamatória e no mapeamento imune. Eles estão freqüentemente deprimidos em pacientes secundariamente imunocomprometidos.

Procedimentos Laboratoriais

Isolamento de Neutrófilos e Monócitos

Este procedimento é realizado para o isolamento de monócitos e neutrófilos que serão usados nos ensaios de quimiotaxia e atividade microbicida.

Princípio: Amostra de sangue total heparinizado é submetida a gradiente de densidade em Ficoll/Hypaque sob centrifugação. As células mononucleares (linfócitos e monócitos) situam-se na interface plasma/Ficoll-Hypaque. Estas células mononucleares são cuidadosamente aspiradas. O plasma e o Ficoll/Hypaque remanescentes são aspirados, permanecendo no tubo as células vermelhas e polimorfonucleares. As células mononucleares são depositadas em frascos cobertos com gelatina, seguindo a aderência dos monócitos. As células mononucleares que não ficam aderidas (linfócitos) são cuidadosamente decantadas. Posteriormente, os monócitos serão soltos da gelatina através de aspiração.

Os eritrócitos e polimorfonucleares são ressuspensos e é adicionado Dextran 500 a 1%. Após centrifugação, as células vermelhas sedimentam e

os polimorfonucleares permanecem em suspensão. O sobrenadante, rico em polimorfonucleares, é cuidadosamente aspirado.

Desta forma, obtêm-se células mono e polimorfonucleares separadas para serem utilizadas nos testes específicos.

Ensaio de Atividade Microbicida

Princípio: O ensaio microbicida há muito tempo é considerado o melhor teste funcional para avaliação da função fagocítica. O teste é baseado na adição de concentrações conhecidas de bactérias opsonizadas a neutrófilos ou monócitos isolados, seguida de incubação a 37°C com amostragem da reação em intervalos de 30 min até 2 horas. As amostras então são colocadas em placas com ágar-sangue, seguida de incubação por 12 a 18 h (*overnight*) a 37°C, para visualizar as bactérias viáveis através do crescimento visível das colônias. As colônias são contadas. O número de colônias em cada fração de tempo é plotado em um gráfico semi-log. Alternativamente, o percentual de bactérias mortas em cada fração de tempo é determinado pela reação com misturas contendo somente bactérias opsonizadas. Uma reação controle bactéria-polimorfonuclear deve proporcionar morte bacteriana superior a 90% em 2 horas de incubação.

Ensaio de Quimiotaxia

Princípio: A migração de monócitos e neutrófilos em resposta a um estímulo quimiotático específico é o primeiro passo crucial na seqüência de eventos principais da resposta inflamatória aguda e crônica. Receptores de superfície celular para várias funções de estímulo são expressos na membrana celular. Estes eventos resultam na migração dirigida de fagócitos ao local da inflamação.

Este ensaio mede a migração radial de monócitos ou neutrófilos na agarose, em resposta a um gradiente quimiotático criado pela difusão de um quimioatraente na agarose. Após permitir a migração direta em direção ao quimioatraente e a migração randômica na direção oposta do quimioatraente aplicado, os monócitos ou neutrófilos são fixados e corados com Giemsa. Após secagem, a distância da migração e a orientação randômica da migração dos fagócitos corados e fixados é determinada por microprojeção (40 ×). A rede de migração é determinada por subtração da distância randômica de migração (em centímetros) da migração direta em direção ao quimioatraente. Os valores dos pacientes são

comparados com valores de controles obtidos com fagócitos-controle avaliados em paralelo.

Ensaio em Lâmina do NBT

Princípio: Um importante mecanismo microbicida dos fagócitos normais é sua habilidade em gerar radicais tóxicos de oxigênio na fagocitose, principal mecanismo celular de morte bacteriana. Um destes radicais de oxigênio, o superóxido (O_2^-), é facilmente detectado na fagocitose estimulada pela redução do NBT a sua forma insolúvel (formazan). O formazan é observado em microscopia óptica como grânulos azuis no citoplasma do fagócito estimulado. A quantidade de NBT reduzido é diretamente proporcional à quantidade de superóxido produzido pelos fagócitos estimulados. A deficiência dos fagócitos em enzimas-chave da via da hexose-monofosfato está prejudicada na sua capacidade de gerar superóxido.

Interpretação: No teste do NBT com estímulo de fagocitose utilizando-se o *Phorbol 12-myristate, 13 acetate* (PMA), a amostra controle produz 99% a 100% de células polimorfonucleares positivas, enquanto o controle em repouso (sem estímulo) seria entre 5% e 40% de células positivas.

Pacientes com doença granulomatosa crônica ligada ao X não apresentam células positivas no teste do NBT com estímulo com PMA, enquanto os heterozigotos produzirão entre 30% e 70% de células positivas sob estímulo do PMA. Pacientes com doença autossômica recessiva produzirão 100% de células positivas, com uma marcada redução na quantidade de formazan depositado no citoplasma de cada célula, que pode freqüentemente levar a uma interpretação equivocada no diagnóstico. Os carreadores heterozigotos da doença autossômica recessiva não são distinguidos dos indivíduos-controles normais.

Ensaio com a Diclorofluoresceína (Ensaio DCF)

Princípio: O peróxido de hidrogênio é um importante produto microbicida da explosão oxidativa dos fagócitos estimulados. Este composto é derivado da dismutação do superóxido produzido pela via da hexose monofosfato. O peróxido de hidrogênio pode ser medido pela oxidação do composto não-fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a um composto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A forma não-polar e não-fluorescente do DCFH é 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA prontamente se difunde através

da membrana citoplasmática dos fagócitos e é retido dentro da célula por clivagem do grupamento acetila por enzimas citoplasmáticas ao não-fluorescente, ionicamente carregado, DCFH. A estimulação da explosão oxidativa do DCFH ligado aos fagócitos leva à produção de peróxido de hidrogênio que oxida o DCFH a uma forma fluorescente, a molécula de DCF. A quantidade de DCF presente no citoplasma de DCFH ligado, em fagócitos estimulados, pode ser rapidamente detectada por citometria de fluxo.

A vantagem deste ensaio é a sua capacidade em avaliar fagócitos em amostras de sangue total, assim evitando os efeitos estimulatórios encontrados nos procedimentos de purificação das células. Além disso, volumes extremamente pequenos de sangue total (0,2 mL) são necessários para a avaliação, o que faz deste ensaio o ideal para pacientes pediátricos.

A amostra consiste de sangue total anticoagulado com EDTA (idealmente 0,5 mL). Deve-se colher simultaneamente amostras do paciente e de um indivíduo-controle normal. As amostras podem ser mantidas à temperatura ambiente e avaliadas em até 24 horas após a coleta. Este fato torna o teste executável nas situações em que é necessário enviar as amostras a laboratórios-referência distantes.

Imunofenotipagem

Monócitos/macrófagos e neutrófilos têm um importante papel nos mecanismos de defesa imune inata e na regulação da resposta imune adaptativa celular e humoral. Estes mecanismos efetores são mediados através de importantes moléculas de adesão e receptores celulares na membrana citoplasmática dos fagócitos. Os receptores para a porção Fc da imunoglobulina IgG (CD16, FcRIII; CD32, FcRII; CD64, FcRI), bem como os receptores para os componentes do complemento (CD11b, receptor C3bi) têm um papel crucial na ligação de antígenos imunocomplexados à superfície das células fagocíticas, assim auxiliando o processo fagocítico e a eliminação dos patógenos. Além disso, a expressão de moléculas de adesão na superfície das células, tais como o CD18, é essencial para a migração dos fagócitos aos locais da inflamação. Estes mesmos receptores encontrados em monócitos/macrófagos servem para realizar a internalização dos antígenos, o que contribui para o processamento e posterior apresentação às células T imunorregulatórias.

Pacientes com deficiências nos receptores de membrana (CD11b, CD16, CD18) estão predispos-

tos a infecções. As terapias com citocinas podem ser utilizadas na indução de uma regulação positiva na expressão de receptores de superfície. Um exemplo é a terapia com interferon- γ , que leva a um aumento na expressão de CD64 (FcRI) em monócitos, o que é refletido como um aumento na atividade microbiana, bem como nas respostas linfoproliferativas ao antígenos.

Estas novas terapias com citocinas têm levado ao desenvolvimento laboratorial de ensaios que são utilizados ao monitorá-las.

A análise multiparamétrica por citometria de fluxo de subpopulações de células a partir de amostras de sangue total avalia quantitativamente a expressão de receptores de membrana na superfície de monócitos e neutrófilos. Esta metodologia não somente detecta a presença ou ausência de receptores, mas também avalia a regulação da expressão destes receptores em resposta a vários estímulos. A técnica utiliza múltiplos anticorpos monoclonais marcados com diferentes fluorocromos que identificam a expressão do receptor de subpopulações específicas de fagócitos derivados da amostra de sangue total, não sendo necessário o passo demorado de isolamento e purificação das populações celulares.

Os principais receptores celulares avaliados são CD14, CD11b, CD18, CD64, CD32 e CD16.

Passos na Investigação da Função Fagocítica

1. Contagem diferencial I e morfológica de leucócitos.
2. Se forem observadas neutropenia ou anormalidades morfológicas, são indicados os ensaios de avaliação fagocítica funcional (imunofenotipagem: expressão de receptores de membrana e moléculas de adesão por citometria de fluxo e avaliação da explosão oxidativa através do teste de NBT ou DCF).
3. Avaliação da quimiotaxia.

A avaliação funcional dos fagócitos é uma ótima ferramenta na investigação de pacientes com infecções recorrentes e história de anormalidade genética nas funções fagocíticas. Porém, os testes disponíveis algumas vezes falham em demonstrar estas anormalidades. Isso se deve à sensibilidade de cada teste, à observação das condições de coleta e tempo transcorrido até a realização do ensaio. O diagnóstico será resultado dos achados clínicos, avaliação genética e funcional da imunodeficiência envolvendo função fagocítica.

DOSAGEM DE CITOCINAS INTRACELULARES

As citocinas são polipeptídeos secretados por uma variedade de células em resposta a vários estímulos, mediando efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, que são pleiotrópicos e redundantes. As citocinas imunologicamente relevantes são principalmente aquelas formadas por células imunes (monocinas e linfocinas) e/ou influenciam a sua função.

O estudo dos mecanismos imunológicos do desenvolvimento de doenças auto-imunes, alérgicas, hematológicas e imunodeficiências é impossível sem uma estimativa quali e quantitativa da produção de citocinas. Em inúmeras doenças do sistema imune, a quantificação de citocinas no sangue e em meios de cultura de células sangüíneas estimuladas é essencial para determinar o estágio imunopatogénico do desenvolvimento da doença, a escolha da imunoterapia apropriada, bem como estimar a eficácia da imunocorreção específica.

A princípio, as citocinas são detectáveis em três níveis:

1. Pelo uso da reação em cadeia da polimerase (PCR), a expressão do RNA mensageiro dos genes das citocinas pode ser detectada e, com novas técnicas, até mesmo quantificada.
2. Através de bioensaios e enzimaímunensaios podemos estimar a síntese de proteínas. A detecção da produção intracelular de citocinas pode ser avaliada através de técnica imunocitológica ou imunoistológica.
3. Detecção da formação de citocinas pela análise dos produtos da atividade das citocinas.

Sennikov e cols., citados abaixo, descreveram um método empregando eletroquimioluminescência (ECLIA) desenvolvido pela IGEN (EUA) para a dosagem de interleucinas (IL-1, IL-4 e IL-10 e IFN) séricas e em meios de cultivo de células mononucleares. Outros imunensaios enzimáticos e quimioluminescentes também estão disponíveis no mercado para a dosagem sérica e em meios de cultivo de citocinas e seus receptores solúveis.

A demonstração da síntese de citocinas habitualmente requer o isolamento de células. Esta abordagem permite a dissecação dos mecanismos moleculares e celulares reguladores da resposta imune, mas tem limitações para aplicações em grande escala, como monitoramento imune em pesquisas clínicas para avaliação de novas vacinas ou agentes

imunoterapêuticos. Para evitar os problemas relacionados com o uso de células purificadas, culturas de sangue total foram desenvolvidas especialmente para o estudo da rede de citocinas humanas em nível de proteína ou gene. A medida de citocinas via RNA mensageiro (mRNA) de células mononucleares em sangue periférico foi descrita por Stordeur e cols.³ por PCR, sendo muito sensível e atrativa, principalmente quando a metodologia PCR *real time* é utilizada.

A citometria de fluxo também tem sido empregada na avaliação da imunidade celular. O mapeamento de epítipo por citometria de fluxo é uma abordagem muito moderna que não somente identifica os epítipos das células T, mas simultaneamente permite a análise detalhada da resposta das subpopulações das células T, incluindo a linhagem e expressão de marcadores de ativação, dentre outros. O sistema mais frequentemente utilizado é baseado na identificação de citocinas intracelulares em células T ativadas, seguindo estimulação com peptídeos ou *pools* de peptídeos. Um ensaio mais recentemente desenvolvido analisa a proliferação de células T medindo a diminuição na coloração do éster de succimidil-carboxifluoresceína diacetato (CFDA-SE) em células proliferadas⁵.

O fascínio do uso da citometria de fluxo para o mapeamento de epítipos consiste na grande versatilidade deste sistema no que diz respeito ao número de parâmetros que podem ser obtidos em uma única medida, isto é: marcador de linhagem celular, marcador de ativação na superfície e internamente à célula. Hoffmeister e cols., citados abaixo, descreveram um sistema baseado na detecção da produção rápida de citocinas em células T ativadas em curto prazo (tão curto quanto 6 horas) – ensaio *ex vivo*. Neste sistema, além da rapidez, a resposta CD4 e CD8 pode ser medida no mesmo ensaio e no mesmo tubo de teste. O uso da coloração com o CFDA-SE é simples e rápido. A intensidade de coloração desta proteína é perdida em aumentos regulares, à medida que há passagem ao próximo estágio de divisão celular. O CFDA-SE é um corante não-tóxico, fluoresceína-relacionado, que é capaz de penetrar na célula com o auxílio de suas duas cadeias acetato laterais. Uma vez dentro da célula, o grupo acetato é removido pelas esterases intracelulares e a carboxifluoresceína resultante sai em uma velocidade muito lenta, seguindo a ligação covalente das aminas livres das proteínas citoplasmáticas, formando ligações amino muito estáveis.

A disponibilidade de técnicas eficientes capazes de avaliar a imunidade celular têm disponibilizado

estudos em diversas áreas. Assim, Pnoskaltis e cols. descrevem a quantificação e produção de citocinas circulantes por células mielóides e linfóides circulantes na leucemia mielóide aguda, enquanto Brown e cols. avaliaram a expressão de marcadores de superfície e a produção de citocinas intracelulares em células T de vias aéreas de crianças com e sem asma⁷.

Nas doenças auto-imunes, as citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α têm um papel central nos processos inflamatórios crônicos. Laufer e cols. descreveram um ensaio de triagem *in vitro* para a detecção de inibidores da síntese de citocinas pró-inflamatórias (drogas antiartríticas e modificadoras da doença).

A identificação e quantificação de citocinas, tanto na forma secretada, quanto intracelular através de técnicas rápidas, com alta sensibilidade e especificidade, aliada à possibilidade de testagem em grande escala, podem fornecer uma importante ferramenta de avaliação do *status* imune e ampliar o uso de imunomoduladores. Constituem um novo arsenal à disposição do clínico para caracterizar defeitos de função do sistema imunológico. Este novo arsenal à disposição do clínico pode ser revisado de forma abrangente no excelente capítulo de Massey & McPherson⁹.

LEITURA RECOMENDADA

Testes Sorológicos ou Imunoensaios

1. Ferreira WA, Ávila SLM. Sorologia: Importância e parâmetros. In: Ferreira WA, Ávila SL, eds. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ª Ed. Rio de Janeiro (RJ), Guanabara Koogan, 2001.
2. Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories. *Labmedicine*;37:490-497, 2006.
3. Kyle RA. Sequence of Testing for Monoclonal Gammopathies. Serum and Urine Assays. *Arch Pathol Lab Medicine*;123:114-118, 1999.
4. Oosterhuis WP, Ulenkate HJLM, Goldschmidt HMJ. Evaluation of LabRespond, a New Automated Validation System for Clinical Laboratory Test Results. *Clin Chemistry*;46:1811-1816, 2000.
5. McPherson RA & Pincus MR eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007.
6. Peng Z, Chen Z, Jiang J, Zhang X, Shen G, Yu R. A novel immunoassay based on the dissociation of immunocomplex and fluorescence quenching by gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*; 583:40-44, 2007.
7. Peter JB. Use and Interpretation of Tests in Infectious Diseases. 4th ed. Santa Monica, Specialty Laboratories, 361-367, 1996.
8. Richter MM. Electrochemiluminescence (ECL). *Chem Rev*;104:3003-3036, 2004.

9. Stevens CD. Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective. 2nd ed. Philadelphia, F.A. Davis Company, p.128-168, 2003.
10. Vignali DAA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods*, 243-255, 2000.
11. Warsinke A, Benkert A, Scheller FW. Electrochemical immunoassays. *Fresenius J Anal Chem*, 366:622-634, 2000.
12. Zane HD. Immunology. Theoretical & Practical Concepts in Laboratory Medicine. Philadelphia, WB Saunders Company, p. 212-286, 2001.

Imunidade Celular e Funções Fagocíticas

1. Paxton HMA, Cunningham-Rundles S, O'Gorman MRG. Laboratory Evaluation of Cellular Immune System in J.B. Henry, ed, Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 20th ed, Philadelphia, Saunders chp 36, p. 850-77, 2001.
2. Riley RS & Ben-Ezra J. Laboratory evaluation of the cellular immune system. In McPherson RA & Pincus MR eds. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st ed. Philadelphia, Saunders Elsevier, chp 44, p. 819-34, 2007.
3. Fleisher TA. Evaluation of suspected immunodeficiency. www.mlo-online.com. Feb, p. 10-15, 2003.
3. Fleisher TA. Methods. In Samter's Immunologic Diseases. Eds Austen KF, Frank MA, Atkinson JP, Cantor H. Lipincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 6th edition p 1229-46, 2001.
4. Bleesing JJ, Fleisher TA. Cell function-based flow cytometry. *Semin Hematol*;38:169-78, 2001.
5. Weiss RL (Editor). Interpretative Data Guide ARUP Laboratories Inc. Salt Lake City (Utah), USA. 2ª ed p 473, 1999.
6. Sennikov SV, Krysov SV, Injelevskaya TV et al. Quantitative analysis of human immunoregulatory cytokines by electrochemiluminescence method. *J Immunol Methods*, 9286:1-8, 2003.
7. Fischer K, Andreesen R, Mackensen A. An improved flow cytometric assays for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J Immunol Methods*, 259:159-69, 2002.
8. Kantakamalaku W, Jiraporn J, Pattanapanyasat K. A novel enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxic activity. *J Immunol Methods*, 189-97, 2003.
9. Morse MA, Clay TM, Hobeika AC et al. Monitoring cellular immune response to cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther*, 3:45-52, 2001.
10. Poulton LD, Baxter AG. Clinical application of NKT cell assays to the prediction of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 17:429-35, 2001.
11. Campbell DE, Douglas SD. In Phagocytic Cell Functions I. Oxidation and Chemotaxis – Manual of Clinical Laboratory Immunology. Rose NR et al. ed. ASM Press Washington D.C., 1997.
12. Baechner RL and Nathan DG. Deficient glucose oxidation in the intact leukocytes of chronic granulomatous disease. *Blood*, 20:1010, 1966
13. Baechner RL and Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*, 278:971-6, 1968.
14. Bass DA, Parce JW, Dechatelet P et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol*, 130:1910-7, 1983.

Dosagem de Citocinas Intracelulares

1. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Analysis of cytokine expression in dermatology. *Arch Dermatol* 138(9):1189-96, 2002.
2. Sennikov SV, Krysov SV, Injelevskaya TV, Silkov AN, Grishina LV, Kozlov VA. Quantitative analysis of human immunoregulatory cytokines by electrochemiluminescence method. *J Immunol Methods*, 9286 1-8, 2003.
3. Stordeur P, Poulin LF, Craciun L, Zhou I, Schandene L, de Lavareille A et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods*, 259-55, 2002.
4. Stordeur P, Zhou L, Byl B, Brohet F, Burny W, Groote D et al. Immune monitoring in whole blood using real-time PCR. *J Immunol Methods*, 276:69-77, 2003.
5. Hoffmeister B, Kiecker F, Tesfa L, Volk HD et al. Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods* 29(3): 270-81, 2003.
6. Panoskaltis N, Reid CD, Knight SC. Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukaemia. *Leukemia*, 17(4):716-30, 2003.
7. Brown V, Warke TJ, Shields MD, Ennis M. T cell cytokine profiles in childhood asthma. *Thorax*, 58(4): 311-16, 2003.
8. Laufer S, Greim C, Bertsche T An in-vitro screening assay for the detection of inhibitors of proinflammatory cytokine synthesis: a useful tool for the development of new antiarthritic and disease modifying drugs. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10: 961-7, 2002.
9. Massey HD & McPherson RA. Mediators of inflammation: complement, cytokines and adhesion molecules. In McPherson RA & Pincus MR eds. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21st ed. Philadelphia, Saunders Elsevier, 2007.