

**IMUNOLOGIA**

**BÁSICA E**

**APLICADA ÀS**

**ANÁLISES CLÍNICAS**

**Prof. Sérgio Lisboa Machado**

**Prof. Raimundo Diogo Machado**

# **IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA ÀS ANÁLISES CLÍNICAS**

**Prof. Sérgio Lisboa Machado**

**Prof. Assistente do Departamento de Análises Clínicas e  
Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro**

**Prof. Raimundo Diogo Machado**

**Prof. Titular Aposentado do Departamento de Virologia do  
Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro**

## **Prefácio**

Esta publicação é uma atualização de um livro escrito pelo meu pai em 1992, e que já há muito tempo eu tentava publicar. No entanto, como a imunologia está sempre em constante renovação, muitas das vezes deixei de envia-lo a editora para acrescentar mais um dado novo. Este livro deverá servir para profissionais que buscam atualizar seus conhecimentos e mais do que repetir o que as bulas de nossos ensaios laboratoriais nos fazem repetir, ele procura fazer com que você tome conhecimento de como os ensaios se processam e o porque da não conformidade. Poder-se-á observar, que esta publicação não é um livro, e sim uma coletânea dos melhores livros e trabalhos existentes nesta área, onde a literatura em língua portuguesa é escassa e, por isto mesmo fez-se mister lançar esta coletânea com os dados mais atualizados e importantes ao profissional das análises clínicas.

Espero que este agregado de informações seja bem aproveitado, assim como foi a publicação de meu pai, que muito contribuiu em minha formação profissional, e que por isso contribua também na de vocês caros leitores.

Espero que esta publicação não seja a última e sim uma das que venham a incentivar o mercado a produzir novas publicações do mesmo gênero e desmistificar o “terror” como a imunologia se apresenta aos estudantes e profissionais da área da saúde.

Façam bom proveito,

Prof. Sérgio Lisboa Machado e Prof. Raimundo Diogo Machado

## SUMÁRIO

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Defesas inatas do organismo        | 1  |
| Tipos de imunidade                 | 7  |
| Mecanismos da imunidade            | 8  |
| Respostas imunes adaptativas       | 9  |
| Resposta imune humoral             | 9  |
| Via clássica do complemento        | 14 |
| As imunoglobulinas                 | 18 |
| Anticorpos monoclonais             | 21 |
| Síntese das imunoglobulinas        | 22 |
| Reações mediadas por células       | 26 |
| Regulação da resposta imune        | 31 |
| O fenômeno da tolerância           | 34 |
| Reações de hipersensibilidade      | 37 |
| Hipersensibilidade tipo I          | 38 |
| Hipersensibilidade tipo II         | 41 |
| Teste de Coombs                    | 47 |
| Pesquisa de anticorpos irregulares | 49 |
| Hipersensibilidade tipo III        | 50 |
| Conglutinação e imunoconglutinação | 56 |
| Imunoconglutininas                 | 57 |
| Hipersensibilidade tipo IV         | 58 |
| Hipersensibilidade de contato      | 58 |
| Reação tuberculínica               | 60 |
| Hipersensibilidade granulomatosa   | 61 |
| Doenças autoimunes                 | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| Lupus eritematoso sistêmico (LES)                | 66  |
| Artrite reumatóide                               | 70  |
| Tiroidite de Hashimoto                           | 71  |
| Doença de Graves´                                | 72  |
| Diabetes insulino dependente                     | 73  |
| Esclerose múltipla                               | 74  |
| Miastia gravis                                   | 75  |
| Síndrome de Goodpasture                          | 75  |
| Reações imunológicas a vírus                     | 76  |
| Imunidade a bactérias                            | 79  |
| Imunidade a fungos                               | 83  |
| Resposta imune a parasitos                       | 84  |
| Princípio dos imunoensaios                       | 93  |
| Deteccão indireta de imunocomplexos              | 99  |
| Controle de qualidade nos imunoensaios           | 101 |
| Validação de um ensaio                           | 102 |
| Outras medidas para garantir qualidade           | 106 |
| Interferências nos imunoensaios                  | 108 |
| Reações cruzadas e analitos heterogêneos         | 110 |
| Reduzindo as reações cruzadas                    | 111 |
| Anticorpos heterófilos e anticorpos para animais | 113 |
| Reconhecendo e reduzindo a interferência         |     |
| dos anticorpos endógenos                         | 116 |
| Interferências devido a antígenos que            |     |
| mascaram a reação                                | 118 |
| Interferências com o mecanismo indicador         | 118 |
| Efeitos matriz                                   | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| Ensaio de aglutinação   | 120 |
| Ensaio de dispersão de luz  | 124 |
| Neflometria   | 125 |
| Turbidimetria   | 127 |
| Aplicações da neflometria e turbidimetria                             | 128 |
| Fatores que afetam a performance dos ensaios                          | 130 |
| Teste de Paul Bunnell & Davidsohn e monoteste                         | 130 |
| Teste do látex  | 133 |
| Teste de Waaler-Rose  | 134 |
| Teste de fixação do complemento                                       | 136 |
| Teste para avaliação da via clássica<br>do complemento ( $CH_{50}$ )  | 147 |
| Teste para avaliação da via alternada<br>do complemento ( $AH_{50}$ ) | 150 |
| Antiestreptolisina O (ASLO)   | 151 |
| Teste de neutralização  | 155 |
| Teste de difusão em gel   | 158 |
| Teste da DRS  | 159 |
| Teste da dupla difusão  | 160 |
| Imunoeletroforese   | 162 |
| ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)                             | 163 |
| Imunofluorescência  | 170 |
| Quimioluminescência   | 176 |
| Teste de Western blot   | 178 |

## DEFESAS INATAS DO ORGANISMO

Chamamos de defesa inata aquela que nasce com o indivíduo, é ela que age como primeira barreira para tentar evitar que um agente infeccioso, por exemplo, ao entrar no organismo consiga se replicar e propagar. No entanto nem sempre a resposta inata é suficiente para fazer este bloqueio e aí, quem toma parte neste processo é o sistema imune adaptativo que leva algum tempo até que atinja sua eficiência máxima e consiga evitar a propagação do agente infeccioso. Além disso o sistema de resposta imune adaptativo tem importante papel na reinfecção pelo mesmo agente, pois aí sua resposta é mais rápida no combate ao mesmo, isto se deve a chamada “memória” do sistema imune.

No sistema de resposta inato, temos a participação por exemplo, de fatores solúveis como lisozima e o sistema complemento (principalmente a via alternada deste), e da participação de células fagocitárias. Já no sistema adaptativo temos principalmente a ação de mecanismos dependentes de linfócitos B que darão início a produção de anticorpos e a coordenação da atividade e supressão ligada principalmente aos linfócitos B. São os linfócitos os responsáveis pela memória do sistema imune, uma vez ativados eles conseguem estabelecer uma resposta específica e rápida quando ocorre uma reinfecção.

A fim de compreender melhor a imunologia devemos ter noção de alguns conceitos básicos que determinam se um indivíduo possa se infectar ou não:

- **REFRATARIEDADE** - É um fenômeno inato, inespecífico e invariável que impede que uma pessoa se infecte por determinados microrganismos. Nestes casos, mesmo que variem as condições intrínsecas e extrínsecas do indivíduo, este não adquire determinadas infecções. Como exemplo existem microrganismos que infectam os animais e jamais infectam o homem. O vírus da Bóvia aviária, o vírus da peste suína clássica, o vírus da peste suína africana que são virulentos para a galinha e o porco respectivamente, jamais infectam o homem. As células humanas não possuem receptores para estes vírus. Do mesmo modo, certas doenças infecciosas humanas, não são reproduzidas em certos animais. Os vírus do sarampo, da caxumba e da rubéola não infectam as aves, o cão o gato e outros animais.
- **RESISTÊNCIA** - É um fenômeno inato, inespecífico e variável, e a variação vai depender das condições intrínsecas e extrínsecas de cada indivíduo e também da biologia do agente infeccioso. Como exemplo, tem-se o *Mycobacterium tuberculosis*, que na maioria das vezes infecta o homem, sem lhe causar danos e este, pelas suas defesas fique em estado latente, permanentemente, ou por um longo período. Se houver problemas imunológicos por um conjunto de variáveis como infecções em que haja destruição da defesa celular, administração de certos medicamentos, como corticosteróides, desnutrição, o *Mycobacterium* em fase latente pode reativar causando a tuberculose doença. Um exemplo de doença destruindo a resistência é a SIDA. O HIV, além de destruir o principal linfócito, o T4, produz uma série de outros distúrbios causados por outros microrganismos tidos como normais.

- **IMUNIDADE** - É um fenômeno nato, específico e não raro sofre variação, principalmente quando há um desequilíbrio da imunidade celular. A infecção pelo HIV é um exemplo clássico dessa alteração. A imunidade é realizada pelo sistema imune adaptativo, ou seja é realizado por células específicas para este fim.
- **IMUNIDADE INATA** - Muitos mecanismos eficazes podem proteger o indivíduo de infecções por microrganismos altamente patogênicos, independente de qualquer contato prévio com os agentes etiológicos. Estes mecanismos tão eficientes impedem a ação de diferentes microrganismos. Toda defesa parece ser controlada geneticamente e há uma diferença de espécie para espécie e mesmo intra espécie, com variações menores para um mesmo indivíduo.

Para um mesmo agente etiológico há variações na sensibilidade de diferentes indivíduos. A galinha é altamente susceptível ao vírus da boubá, entretanto, qualquer mamífero é totalmente resistente, e mesmo as aves de espécies diferentes são também resistentes. Outro exemplo é a resistência dos felinos e caninos ao vírus Influenza A, entretanto este infecciona e produz doença com facilidade em aves, suínos e equinos. Determinantes ambientais podem fazer aparecer desde o início da vida uma imunidade adquirida que induz um mecanismo de resistência a certas infecções. Com relação a esta resistência temos, por exemplo a grande sensibilidade da população indígena às várias doenças do homem civilizado. Aquela população é muito mais sensível ao sarampo, à gripe, à tuberculose do que o homem civilizado.

A imunidade inata é correlacionada a um grande número de determinantes. Estes podem ser específicos do hospedeiro, tais como: espécies e raças, fatores genéticos individuais, idade, variação hormonal, nutrição. Também, é importante a participação de determinantes físicos como: pele, mucosas, superfícies úmidas como é o caso dos olhos, sítios anatômicos que retêm a poeira e os microrganismos, etc. Aliado a estes determinantes, temos substâncias químicas como secreções diversas com atividade antimicrobiana, e as enzimas e os polipeptídeos básicos que são substâncias com atividade bactericida ou bacteriostática. A própria fagocitose com sua clássica digestão, é um fenômeno inespecífico.

A imunidade está diretamente relacionada às raças, às espécies e às famílias. Como exemplo citamos a hereditariedade, que está relacionada à resistência de determinadas famílias cujos membros são muito sensíveis à tuberculose, contrastando com o que normalmente acontece com a população humana em geral.

Também temos a idade como fator de alteração na resposta inata, geralmente as crianças recém-nascidas são sensíveis a uma variedade de agentes infecciosos e tal sensibilidade está ligada à deficiência imunitária, por incapacidade do sistema linfóide reagir aos antígenos estranhos. Na velhice, os determinantes também desempenham anormalidades de resistência, ficando as pessoas mais sensíveis aos agentes estranhos diversos.



A nutrição é outro fator de alteração marcante na variação da resistência. A subnutrição de animais de laboratório acarreta uma leucopenia e a atividade fagocitária diminui, induzindo o aparecimento de infecções diversas. Por outro lado, a resistência inata pode variar com o agente etiológico. Sabe-se que o vírus da poliomielite prefere as crianças bem nutridas, enquanto que as crianças desnutridas são mais resistentes a este vírus. O contrário acontece com o vírus do sarampo que infecta a criança desnutrida produzindo processos infecciosos graves. Nas crianças bem nutridas a doença produzida por este vírus é mais suave.

Fazem parte da imunidade inata, as barreiras mecânicas e químicas conforme já citado anteriormente. A pele integra é um obstáculo a um grande número de agentes infecciosos. A camada de queratina contribui muito para esta eficiente barreira. As mucosas contendo secreções, células ciliadas com seus movimentos característicos removem os microrganismos e as enzimas oferecem efeitos bloqueadores. No estômago, o suco gástrico, pelo seu pH, tem ação bactericida sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas. Logicamente umas poucas espécies de bactérias como o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Helicobacter pylori* resistem a esse pH e podem até colonizar na mucosa estomacal. Na pele, as secreções sebáceas e sudoríparas contêm ácidos graxos com propriedades bactericida, fungicida e viruscida. Na cavidade oral e nos olhos encontra-se a lisozima, proteína básica de baixo peso molecular, encontrada em alta concentração nos polimorfonucleares e com capacidade de hidrolizar os glicopeptídeos da parede de muitas bactérias Gram negativas, resultando em lise das mesmas. Menor ação é exercida sobre Gram positivas.

Quando os microrganismos conseguem vencer as barreiras naturais temos o processo inflamatório em que, no decorrer deste, há lesão de um grande número de células, liberando vários tipos de proteínas básicas. Incluem-se, entre estas as esperminas e as espermidinas que destroem o *Mycobacterium tuberculosis* e o *Staphylococcus aureus*. Além destas, são liberadas, também, proteínas básicas com alto teor de lisina e arginina, com função bactericida.

### **Os Fagócitos**

Os fagócitos são células especializadas na captura de microrganismos e substâncias estranhas ao organismo e, devido a sua especialidade são também chamados de fagócitos profissionais. Estes fagócitos são formados por dois principais grupos celulares que compreende os grandes macrófagos e os pequenos granulócitos polinucleares. Os granulócitos polinucleares também são chamados de polimorfos ou neutrófilos, baseado nas propriedades que tem ao terem seu citoplasmas corados.

Os macrófagos tem origem na medula óssea como promonócitos os quais ao amadurecerem circulam no sangue como monócitos e por fim se transformam em macrófagos, se espalhando pelos tecidos. Estes macrófagos estão presentes por todo o tecido conectivo e estão associados a membrana basal de pequenos vasos. Eles estão concentrados em órgãos como pulmões (macrófagos alveolares), fígado (células de Kupfer), na periferia dos seios medulares dos linfonodos, nos sinusóides do baço, tudo isso com a finalidade de atuar como uma barreira filtrante à entrada de microrganismos. Em geral

os macrófagos são células de vida longa e que dependem da mitocôndria para retirarem sua energia, apresentam ainda um retículo endoplasmático extremamente rugoso devido a grande quantidade de proteínas secretórias que esta célula produz e libera.

Os polimorfonucleares são as células encontradas em maior quantidade dentre os leucócitos, assim como os macrófagos, se originam de uma mesma célula totipotente na medula óssea. Estas células não possuem mitocôndria, mas faz uso de seu glicogênio citoplasmático (que é abundante) estocado justamente para servir de fonte de energia. A glicólise que estas células realizam permite que elas trabalhem em condições de anaerobiose, como as que ocorrem num processo inflamatório. Outra característica dos polimorfonucleares, é que são células que não se dividem e possuem um tempo de vida curto (algo entre 24 e 72 horas), apresentam um núcleo segmentado, seu citoplasma se caracteriza pela presença de grânulos azurófilos, que contém mieloperoxidase, lisozima e proteínas catiônicas, grânulos secundários específicos que contém lactoferrina e lisozima associadas e grânulos terciários, que contém as hidrolases ácidas. De modo geral, podemos dizer que os polimorfonucleares são a defesa contra as bactérias piogênicas enquanto que os macrófagos atuam melhor contra microrganismos intracelulares.

O processo de fagocitose pelas células fagocitárias envolve primeiro a adesão do microrganismo a superfície celular destas células. Esta adesão envolve o reconhecimento de carboidratos do microrganismo e, uma vez aderido e identificado como estranho, o microrganismo é iniciada a ingestão, ativando o sistema de contração de actina e miosina o qual faz com que o citoplasma celular vá envolvendo a partícula estranha até que esta fique dentro de um vacúolo (fagossomo). A etapa seguinte nesse processo é a liberação de substâncias que tentarão destruir esta partícula ingerida. Nessa etapa há um grande consumo de oxigênio pela célula resultando no aumento do desvio da atividade da hexose monofosfato. Isto gera NADPH e reduz o oxigênio molecular através da sistema da membrana citoplasmática de citocromos dando origem a uma serie de agentes microbicidas poderosos, chamados de anion superóxido, peróxido de hidrogênio, e radicais hidroxila. O peróxido formado, em associação com a mieloperoxidase da origem a um potente sistema de halogenação que é capaz de destruir tanto bactérias como vírus.

Assim que o anion superóxido é formado, a enzima superóxido desmutase atua de forma a converter o superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, consumindo durante este processo ions hidrogênio. Deste modo há inicialmente um aumento do pH, facilitando a ação anti bacteriana das proteínas catiônicas oriundas dos grânulos dos fagócitos. Estas moléculas são capazes de lesar a membrana microbiana devido a ação da catepsina G e pela aderência direta a membrana microbiana. Outros fatores oriundos dos grânulos são a lactoferrina e intermediários nitrogenados como o óxido nítrico, através de sua capacidade de se complexar ao ferro, privando a bactéria de um elemento essencial ao seu crescimento, e a lisozima que destrói a proteinaglicana da parede celular bacteriana. Deste modo o pH vai caindo de modo que os microrganismos que estão mortos ou

morrendo vão sendo degradados pelas enzimas hidrolíticas. Assim que o processo termina os produtos resultante desta degradação são liberados para o exterior da célula.

Como a fagocitose depende da adesão celular a membrana do fagócito, está claro que deve haver um mecanismo que permita mobilizar um maior número de células para o local de entrada do agente estranho. No caso das bactérias estas produzem substâncias como a formil metionina a qual atrai os leucócitos, no entanto este é um sinal ainda fraco, e existe um complexo mais eficiente realizado por nosso próprio organismo que é a ativação da cascata do complemento (principalmente a via alternativa).

O complemento tem a propriedade de disparar o estímulo necessário a ativação de uma cascata que termina por destruir o organismo estranho e atrair células fagocitárias para o local onde o microrganismo está. O principal elemento da cascata do complemento é o C3, e a sua clivagem dá início a via alternativa do complemento. O C3 entra em ativação espontânea em pequenas concentrações gerando uma nova molécula a C3b, a qual é capaz de se complexar com o fator B e interage com o fator D presente no plasma dando origem a enzima C3bBb (C3 convertase), esta por sua vez dá um feedback positivo aumentando a amplificação da resposta ao produzir novas moléculas de C3b. No entanto todo este processo é regulado por mecanismos que bloqueiam a ação da C3 convertase, a quebrando em novas moléculas menores e sem ação sobre a C3.

Na presença de certas moléculas como carboidratos presentes na superfície de bactérias o C3b gerado pela C3 convertase, pode aderir e se tornar estável à uma nova quebra, não perdendo assim sua ação. É nessa situação que ela atua ativando a via alternativa do complemento. Nesta ativação uma grande quantidade de C3b, e logo se adere a membrana do microrganismo de forma covalente, isto termina por conferir a propriedade opsonizante desta fração do complemento. Esta opsonização faz com que as células fagocitárias reconheçam o organismo estranho com maior facilidade e assim o fagocitem com maior rapidez. O C3b junto com a C3 convertase consegue atuar sobre o fator C5 do complemento o quebrando em C5a e C5b. O C5a junto com C3a atuam sobre os mastócitos os fazendo degranular, conseqüentemente há a liberação de fatores quimiotáticos e de mediadores da permeabilidade vascular. Estes mediadores da permeabilidade vascular aumentam a permeabilidade através da modificação das forças intercelulares entre as células endoteliais da parede dos vasos. Isto não só permite a exudação do plasma como permite que elementos constituintes deste como o complemento chegue ao sítio da infecção. Estes mediadores também promovem a ativação de moléculas como a ICAM-1 (molécula 1 intracelular de adesão) e ELAM-1 (molécula 1 endotelial de adesão leucocitária) as quais se ligam moléculas específicas dos polimorfonucleares e permitem que estas passem entre as paredes dos capilares.

Por outro lado os fatores quimiotáticos, atraem os leucócitos polimorfonucleares marginais de sua localização intravascular, através da parede dos vasos e eventualmente os conduzem até os microrganismos opsonizados. Os polimorfonucleares possuem um receptor específico para C3b em sua membrana e por isso aderem rapidamente e firmemente ao microrganismo opsonizado.

O processo de dilatação dos capilares (eritema), exudação das proteínas plasmáticas e do fluido plasmático (edema), devido a alteração hidrostática e osmótica, e ao acúmulo de neutrófilos é que dão origem a **resposta inflamatória aguda**.

Além da atuação da fração C5a do complemento temos a continuação da cascata do complemento com o C5b que também adere a membrana do microrganismo, ao lado de C3b. Após a adesão de C5b temos a adesão de C6, C7 e C8 que forma um complexo capaz de já dar início a lesão da membrana celular, com a adição de alguns componentes C9 temos então a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) que leva a lise do microrganismo por perfurar a membrana.

Fazendo parte desta resposta imune inata, temos ainda as **proteínas de fase aguda**, como a Proteína C Reativa, que tem sua concentração aumentada em decorrência da liberação de mediadores de sua síntese tais como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Estes mediadores são liberados como consequência da injúria celular. Existem ainda outros fatores antimicrobianos extracelulares presentes no plasma como a lactoferrina, que forma um complexo com o ferro e o torna indisponível à bactéria que costuma utilizá-lo como fator de crescimento. Temos também os interferons (IFN), mais conhecidos por ter ação antiviral, por interferirem com o processo de adesão viral à uma célula e, por vezes não permitindo que mais de um vírus infecte uma célula já parasitada por um vírus. Os leucócitos produzem vários tipos diferentes de  $\alpha$ -IFN, enquanto os fibroblastos e praticamente todos os tipos celulares sintetizam o  $\beta$ -IFN. Um terceiro tipo de interferon, o  $\gamma$ -IFN não é um componente da resposta imune inata.

Quando as células são infectadas por um vírus, elas produzem e secretam interferon o qual se liga a receptores específicos nas células adjacentes. O interferon, uma vez ligado a uma célula não infectada exerce atividade antiviral ao facilitar a síntese de enzimas que interferem com o mecanismo de replicação viral.

Ainda fazendo parte da resposta imune inata encontramos um grupo de células chamadas de Células Natural Killer ou NK (matadoras naturais), estas células possuem atividade citotóxica. Na verdade as NK são grandes linfócitos granulares que se ligam, provavelmente a glicoproteínas, que aparecem na superfície de células infectadas por vírus e algumas células tumorais. Uma vez ligada a célula alvo as NK liberam o conteúdo de seus grânulos. Parece que o elemento citotóxico mais importante liberado são as perforinas, que possuem uma ação parecida com o elemento C9 do complemento uma vez que é capaz de fazer furos na membrana da célula alvo e assim a leva a citólise.

Ainda com menor participação temos os eosinófilos, que parecem ser os fagócitos com especificidade para agentes parasitários como os helmintos. Os eosinófilos possuem grânulos em seu citoplasma que tem a propriedade de se corar com corantes ácidos. Estas células também possuem receptores para o elemento C3b do complemento, uma vez feita a adesão do eosinófilo com o parasito ocorre a liberação de proteínas capazes de lesar a membrana do mesmo e ainda promover uma destruição maior devido a liberação de metabólitos do oxigênio que contribuem nesta destruição.

## **TIPOS DE IMUNIDADE**

Sempre que ultrapassadas as barreiras inespecíficas pelos agentes infecciosos, estes vão induzir novos mecanismos de defesa, na maioria das vezes muito mais eficientes do que as diferentes modalidades que vimos anteriormente. Este conjunto denomina-se **estado de imunidade**.

A imunidade pode ser ativa e passiva, subdividindo-se cada uma destas modalidades em natural e artificial.

**IMUNIDADE ATIVA:** É aquela em que o indivíduo recebe o antígeno e o organismo tem que trabalhar para formar a sua defesa, isto é, a imunidade humoral mediada por anticorpos e a celular mediada por células.

**IMUNIDADE ATIVA NATURAL:** É aquela adquirida pela infecção natural. Ex.: sarampo, caxumba, mononucleose.

**IMUNIDADE ATIVA ARTIFICIAL:** É aquela induzida pela vacina, a qual pode ser constituída por microrganismos atenuados como a vacina da tuberculose, anti-pólio, anti-sarampo e anti-febre amarela; vacinas inativadas como a vacina anti-rábica, anti-coqueluxe, anti-salmonelose; e vacinas constituídas por toxóides ou frações de microrganismos como a para difteria e tétano (toxóides), adenovirose, (hexon isolado do Adenovírus). Atualmente, há outra modalidade de vacinas que são proteínas clonadas muito específicas. Como este exemplo, temos a vacina contra a Hepatite B, produzida numa levedura pelo processo do DNA recombinante.

**IMUNIDADE PASSIVA:** É aquela resultante dos anticorpos pré-formados. Neste caso a imunidade é por pouco tempo.

**IMUNIDADE PASSIVA NATURAL:** É obtida através de anticorpos da mãe (IgG) que atravessam a placenta para o feto ou através do colostro, nos primeiros dias de amamentação.

**IMUNIDADE PASSIVA ARTIFICIAL:** É adquirida pela inoculação de anticorpos pré-formados em outro animal. Como exemplo, temos a soroterapia contra raiva, anti-ofídica, anti-tetânica e anti-diftérica. Estes antissoros são obtidos em cavalos e após purificação são usados para imunização. É um processo efêmero de proteção, durando de um a 4 meses, no máximo.

**IMUNIDADE ADOTIVA:** É uma imunidade especial adquirida pela transferência de células (suspensão de linfonodos, baço, medula óssea), provenientes de doadores imunizados que são aceitos como histocompatíveis.

## **MECANISMOS DA IMUNIDADE**

Os mecanismos da defesa orgânica contra as infecções podem ser discriminados da seguinte forma:

- a) Imunidade humoral (anticorpos)
  - a.1) Antitóxica

## a.2) Antimicrobiana

### b) Imunidade celular

**IMUNIDADE ANTITÓXICA:** Este tipo de imunidade é típico das toxi-infecções tais como tétano e difteria, nos quais os microrganismos causadores atuam por seu poder toxigênico afetando as células do organismo hospedeiro.

**IMUNIDADE ANTIMICROBIANA:** A imunidade humoral antimicrobiana é bem exemplificada pela defesa específica que se estabelece no decurso da pneumonia lobar pelo *Streptococcus pneumoniae* e na meningite causada pela *Neisseria meningitidis*. Quaisquer destes germes transpondo as barreiras defensivas do trato respiratório, invadem os alvéolos de determinado segmento brônquico onde se implantam e se multiplicam. Daí por diante segue uma sequência de eventos semelhantes aos que se desenvolvem no processo inflamatório, em que os capilares se distendem e o plasma filtra através de suas paredes, derramando para o interior dos alvéolos pulmonares. Fagócitos, inicialmente, polimorfonucleares e depois macrófagos afluem em grande quantidade formando um exudato espesso tornando maciço o conteúdo alveolar, impossibilitando a respiração.

**IMUNIDADE CELULAR:** O agente etiológico de infecções pode multiplicar-se dentro dos macrófagos. Nestas condições o anticorpo não pode atingi-lo, estabelecendo a imunidade através de linfócitos efetadores, que determinam uma “ativação” dos macrófagos, causando uma destruição do agente infeccioso intracelular. Em infecções como a tuberculose, a lepra, a brucelose e as viroses, em geral é estabelecido um quadro de equilíbrio entre o hospedeiro e o agente infeccioso, persistindo este no organismo em focos de infecção latente ou crônica.

Bem diferente da imunidade humoral, a imunidade celular não pode ser transferida, passivamente, com soro imune, mas sim com células linfóides (imunidade adotiva) de animal sobrevivente à infecção com microrganismo virulento ou vacinado com agente atenuado. Exemplo típico encontramos na vacina BCG ou nas vacinas virais atenuadas, como a da febre amarela, da poliomielite, etc.

A grande importância da imunidade celular é evidenciada nas viroses, nas quais o vírus que é um agente intracelular, é destruído onde o anticorpo não é capaz de penetrar. Este fato mostra que os anticorpos sistêmicos ou locais não tem papel relevante nas infecções virais. Estes anticorpos são incapazes de impedir a propagação do vírus por contiguidade celular. Estes anticorpos tem a função mais de neutralizar os vírus, impedindo sua disseminação hematogênica, como é o caso do vírus da pólio.

## **RESPOSTAS IMUNES ADAPTATIVAS**

O sistema imune adaptativo existe como uma forma de bloqueio aos microrganismos que tenham conseguido escapar do ataque promovido pelo sistema inato. Sabemos que isto ocorre porque temos microrganismos mutantes que não ativam a via alternativa do complemento, alguns microrganismos também ao serem capturados pelos macrófagos desenvolvem reações que são capazes de neutralizar as substâncias liberadas no vacúolo, vírus que são insensíveis a ação das células NK (natural killer) e vírus que quase não estimulam a produção celular de interferon, deste modo não havendo a comunicação célula a célula capaz de evitar a propagação viral.

Uma das principais proteínas sintetizadas nesta defesa imune adaptativa são os anticorpos os quais são sintetizados pelos linfócitos B, mais especificamente pelos Plasmócitos. A síntese destes anticorpos só ocorre se houver um estímulo feito pelo antígeno ao linfócito B ou se este for estimulado pelos linfócitos T. Cada anticorpo possui um sítio de reconhecimento, que se encaixa e amolda no antígeno, e isto faz com que a ligação do anticorpo ao antígeno seja mais forte ou mais fraca dependendo da especificidade da molécula de anticorpo. Os anticorpos possuem ainda outros sítios, necessários para diversas funções como a ativação da via clássica do complemento, ligação a células fagocitárias e células apresentadoras de antígenos. Deste modo, quando um antígeno está recoberto por moléculas de anticorpo, estes são capazes de induzir a fixação do complemento e a fagocitose.

## **AS BASES CELULARES RESPOSTA IMUNE HUMORAL**

O papel primário do sistema imune humoral é de eliminar organismos e biomoléculas estranhas, com o auxílio de proteínas próprias e células. Isto é realizado pela ligação de alo e autoantígenos às imunoglobulinas. A resposta subsequente inclui a ativação do complemento e os sistemas celulares da resposta imune o que eventualmente leva a fagocitose e destruição da célula alvo, vírus ou proteína.

Para que este mecanismo funcione é necessário que o sistema imune reconheça uma grande variedade de antígenos “não self” (estranhos ou aloantígenos), normalmente em baixas concentrações. Quando isto não ocorre denominamos de inunodeficiência. Além disso o sistema imune deve responder de forma eficiente aos aloantígenos sem que isso leve a uma super reatividade aos antígenos próprios (perda da tolerância levando a doença autoimune), ou a resposta indevida levando a estimulação imune (produção de IgE levando a alergia). Além disso deve ocorrer a supressão da resposta imune quando a “limpa” do organismo já tiver sido efetuada.

A regulação do sistema imune é também realizada pelo contato celular e mecanismos que dependem das citocinas para serem estimulados ou suprimidos. Os caminhos que a resposta toma depende dos tipos de leucócitos envolvidos, tipos de antígenos de membrana que entram em contato e citocinas liberadas.

## **A apresentação de antígenos**

A fim de tornar simples o modo geral de apresentação de antígenos ao sistema imune, podemos dizer que existem dois grupos celulares, um expressando o Antígeno de Histocompatibilidade (MHC) de Classe I, que está presente em todas as células do organismo, e outro grupo apresentando o MHC de Classe II, que é encontrado nas células apresentadoras de antígeno.

Podemos dizer que as células com o MHC de classe I são responsáveis pela apresentação de antígenos endógenos, como vírus e alguns marcadores tumorais produzidos dentro da célula afetada, e que as células com o MHC de classe II fazem a apresentação de antígenos exógenos como bactérias e toxinas.

As células expressando o MHC de classe I, em geral fazem o processamento da seguinte forma: primeiro elas pegam as proteínas produzidas por elas no citossol ou endógenamente, as quebram em peptídeos (8 a 12 aminoácidos) pelos spliceossomas e então são enviadas ao Retículo Endoplasmático (RE), através de moléculas de transporte associadas a proteína. No RE, os peptídeos são ligados as moléculas do MHC de classe I ativas e são transportadas via Complexo de Golgi, a superfície celular. Uma vez na superfície celular, o complexo MHC classe I + antígeno, se ligam a células T CD8<sup>+</sup>, o que leva a uma resposta mediada por células do tipo citotóxica.

Quanto as células que expressam o MHC de classe II, elas fazem a captura do antígeno exógeno por endocitose. O antígeno é em seguida transportado para o lisossomo, onde então é degradado em peptídeos, os quais serão ligados a moléculas de classe II específicas. O complexo MHC de classe II + antígeno é então exposto na superfície celular, onde então irá se ligar a linfócitos T CD4<sup>+</sup> que darão início a resposta imune humoral (produção de anticorpos). (McDonnel, W.M., 1997)

### **Células Apresentadoras de Antígenos (APC)**

Os plasmócitos, são células oriundas da diferenciação dos linfócitos B e tomam parte na resposta humoral a partir do momento que estão envolvidas na montagem de imunoglobulinas, no entanto, as Células Apresentadoras de Antígenos (APC) e os linfócitos T são necessários para o estímulo e controle da produção de anticorpos. Os leucócitos fagocitários podem ser divididos em duas classes funcionais: os macrófagos/monócitos e as APC, elas são responsáveis pela eliminação de produtos estranhos ao organismo assim como de moléculas próprias. Aparentemente, os macrófagos não são bons em reprocessar os antígenos para a apresentação ao sistema imune, eles apresentam em sua superfície um grande número de receptores para região Fc das imunoglobulinas (FcR) e para o fator C3 do complemento (auxiliando no reconhecimento de células recobertas com anticorpo ou complemento), possui também em menor quantidade mas em concentrações variáveis os antígenos de histocompatibilidade (HLA ou MHC) e outras moléculas de adesão celular como a CD54 e CD58.

As APCs são muito menores em número do que os macrófagos e não fagocitam células e antígenos, ao invés disso elas capturam e processam o antígeno, apresentando os fragmentos em sua superfície celular em conjunto com os antígenos de histocompatibilidade celular de Classe I e II (MHC), principalmente os de Classe II. As APCs migram para as zonas do tecido linfóide de células T



e B, e apresentam os antígenos as células efetoras e moduladoras do sistema imune (células T, B e NK). Também temos as células dendríticas que formam uma espécie de pseudopodo os quais podem se estender e aumentar a área de contato com os linfócitos T e B. Isto tudo em conjunto com as moléculas de membrana e citocinas são os responsáveis pela ativação específica da resposta imune.

No linfonodo temos a divisão das APC em células dendríticas, que apresentam antígeno, via MHC de Classe II ao linfócito T CD4<sup>+</sup>, e células foliculares dendríticas, as quais apresentam o antígeno no centro germinativo dos linfócitos B. As células B também podem funcionar como APCs. As células dendríticas são leucócitos, derivados de precursores próximos do CD34. As citocinas são importantes em sua maturação, como o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos, no desenvolvimento das células dendríticas, enquanto bloqueiam o crescimento de macrófagos.

As células dendríticas e suas variantes, como as células de Langerhans, são encontradas na pele, vasos linfáticos aferentes, sangue e outros tecidos não linfóides. Nos tecidos linfóides, as células dendríticas são normalmente encontradas na região interfolicular. As células dendríticas, normalmente não possuem um número significativo de receptores para C3 ou para a região Fc da IgG (Fc $\gamma$ ), mas são ricas em moléculas de MHC da classe I e II assim como em moléculas de adesão do tipo CD2, CD11c, CD29, CD54 e CD58. Também, para facilitar o contato com os linfócitos T e seu estímulo, expressa as moléculas CD40 e B7 na membrana.

As células dendríticas foliculares são APCs localizadas no folículo primário (não estimuladas) e folículo secundário (estimuladas). Apesar destas áreas serem ditas zonas de células B, elas apresentam uma minoria de células T, macrófagos e APCs. As APCs ricas em receptores de Fc $\gamma$  as quais ligam e apresentam o antígeno as células B inativas e ativas. As células dendríticas foliculares podem segurar este antígeno por semanas, provavelmente desempenhando um papel importante na manutenção da resposta imune, por estimular células B novas e de memória.

O papel de ativação das APCs nos linfócitos T pode ser dividido em duas fases: o estímulo das células T inativas (resposta primária) e a ativação de células T de memória (resposta secundária). Ambas as células dendríticas, e em pequeno número as células B, podem apresentar antígenos aos linfócitos T. A apresentação efetiva por ambas, não apenas requer o complexo de MHC, mas outro fator estimulatório como o contato célula a célula e a liberação de citocinas.

Finalmente as células B também servem como células apresentadoras de antígenos, isto foi provado *in vitro*. As células B expressam o MHC de Classe II, e tem um receptor específico para antígenos (imunoglobulinas). Estas células B capazes de estimular linfócitos T de uma maneira antígeno específica, são células B7<sup>+</sup>, isto é importante saber pois as células B em repouso (não ativadas), não possuem as proteínas co-estimulatórias de ligação, necessárias para ativar as células T<sub>H</sub>. Quando temos muitas células B7<sup>-</sup>, as células T<sub>H</sub> se tornam incapazes de responder ao estímulo imune,

e isto leva a suspeita de que tais células B7- sejam as responsáveis no papel de indução a tolerância ou anergia a antígenos próprios.

As células dendríticas apresentam o complexo HLA+Ag (MHC II + Ag) ao receptor de célula T (TCR), de forma que há o reconhecimento simultâneo, da célula T reconhecendo o HLA e a célula dendrítica o TCR, ocorrendo assim a ligação entre elas e a subsequente resposta intracelular com a ligação posterior do CD4 ao MHC de classe II ou do CD8 ao MHC de classe I. No entanto, se apenas a ligação TCR/CD4(8) e o antígeno/MHC II(I) ocorre, parece que a célula T se torna incapaz de responder ou se tornar anérgica. Na verdade esta é uma forma de induzir a tolerância a antígenos próprios, especialmente para as células  $T_H$  Th1. A ativação efetiva das células T pelas APC requerem a co-estimulação pelo antígeno B7 das células dendríticas ou dos linfócitos B ligando seus antígenos CD28 ou CTLA-4 à célula T. Quando as células T são estimuladas deste modo, elas passam a co-expressar um ligante (CD40L ou T-BAM) para o antígeno de células B CD40. Apenas quando estes contatos co-estimulatórios ocorrem é que a ativação da célula T ao antígeno ocorre.

### **As células T**

O antígeno TCR (Receptor de Células T) é um dos membros da superfamília das imunoglobulinas só que, diferentemente das imunoglobulinas, o TCR é composto de uma subunidade alfa e beta ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Uma pequena fração das células T expressam uma outra coleção de produtos gênicos do TCR, que são a delta e a gama ( $\delta$  e  $\gamma$ ). Assim como as imunoglobulinas, são necessárias moléculas acessórias para transferir o sinal de ligação do antígeno ao TCR para dentro da célula. As moléculas acessórias mais importantes para esta ativação das células T são os complexos B7-CD28 ou B7-CTLA-4. O complexo TCR-CD3, junto com a ligação ao MHC-CD4 e B7-CD28, geralmente conseguem ativar a célula T, no entanto, foi demonstrado que a adesão de CD2-CD58, CD11a-CD54 e CD4-MHC II ou CD8-MHC I são capazes de aumentar significativamente o estímulo provido pelo TCR e por B7-CD28 ou B7-CTLA-4. Parece que este aumento do sinal estimulatório se deve a ocorrência de uma estabilização celular maior, quando do contato entre estas moléculas.

## **Citocinas e sub-populações de Linfócitos T**

Dentre as sub-populações de linfócitos T, as Th1 e Th2 parecem ser oriundas da mesma célula progenitora, a Th0. As células Th1 secretam interleucina 2 (IL-2),  $\gamma$ -Interferon ( $\gamma$ -IFN), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-12, já as células Th2 são capazes de secretar as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. As células Th1 lançam um sinal estimulatório às células B para que produzam e secretem IgG2a, que inibe a função da população Th2. A IL-12 é uma citocina importante neste processo já que, sem ela, a geração de novas células Th1 é bloqueada. Isto acaba se refletindo também no papel da IL-12 em estimular a produção de IL-1, TNF e  $\gamma$ -IFN, o qual é necessário para a maturação de Th1. IL-12 normalmente é produzida pelos monócitos, macrófagos e células acessórias como decorrência de um estímulo dado pelas infecções por parasitas e bactérias. O  $\gamma$ -IFN exerce um sinal de “feedback” positivo estimulando a produção de mais IL-12. A sub-população Th2 inibe a produção de IgG2a, mas estimula a síntese de IgE e IgG1; a IL-4 também tem participação neste processo. Em resumo IL-4 e IL-10 são capazes de inibir monócitos e macrófagos a produzir IL-12, que deste modo acabam por bloquear a maturação de Th1 e o correr da resposta imune feita por Th1.

## **O estímulo a produção de imunoglobulinas**

### **Ativação**

O primeiro estímulo para que a célula B de início a produção de imunoglobulinas, em geral decorre da ligação do antígeno ao anticorpo preso na membrana da célula B. Caso os antígenos sejam multivalentes, como os polissacarídeos, ocorre a ligação cruzada a imunoglobulina presente na membrana da célula B e ela se torna ativada, independente da ativação pelas células T (estimulação T independente). No entanto, para a maioria dos antígenos, há a necessidade do estímulo pelas células T para que seja iniciada a produção de imunoglobulinas (estímulo T dependente). Para que isto ocorra, há a necessidade de que o antígeno seja apresentado junto com uma molécula de MHC numa APC e que a célula B seja co-estimulada pelo contato celular e por algumas citocinas. Isto é importante como forma de evitar reações autoimunes ou aloimunes. Existem várias formas em que este processo pode ocorrer, a mais comum é a apresentação do MHC II por uma APC para uma célula B na presença do contato da célula B com a T por B7-CD28.

Em geral a ligação cruzada da imunoglobulina presente na membrana da célula B, leva ao aumento do nível de moléculas de adesão em sua membrana (CD25, HLA Dr, CD40, B7) e de um aumento na resposta a citocinas. Parece que o contato mais importante neste processo é o da molécula CD40 com a CD40L da célula T é claro que, o contato de CD4/HLA Dr, CD11c/CD54 e CD2/CD58 são importantes, já que aumentam o estímulo da célula B. Também é importante o contato das APC que ocorre via Antígeno-MHC-Imunoglobulina de Superfície e/ou B-antígeno de superfície-Receptores Fc presentes nas células foliculares dendríticas. Este aumento de contato também ocorre se o sinal for dado pelas células Th1 ou Th2.

## **Proliferação e maturação**

A ativação e proliferação T dependente das células B, inicialmente ocorre nos centros germinativos dos linfonodos, baço e tonsilas. A sequência de ativação das células B nos folículos parece ocorrer do seguinte modo, após a ligação do complexo MHC II-Ag-Ig de superfície e CD40-CD40L, na presença de determinadas citocinas (IL-2, IL-4), as células B começam a proliferar rapidamente. Nesta etapa elas crescem e morfológicamente são denominadas blastos, posteriormente, elas proliferam e se tornam centroblastos, os quais sofrem hipermutação somática nos genes das imunoglobulinas. Os centroblastos então dão origem a células menores, que não se dividem e se denominam centrócitos.

A manutenção da maturação dos centrócitos depende da ligação da sua imunoglobulina de superfície com os complexos de MHC II às células foliculares dendríticas. Quando os centrócitos se ligam via CD40-CD40L e/ou CD23 as IL-4, isso evita que eles entrem em apoptose (morte celular), devido a ativação da síntese proteica do bcl-2 que a mantém. A presença de IL-4/IL-6 se ligando a CD23 também faz com que a célula B amadureça e se transforme no plasmócito que é a célula especializada na síntese e liberação de imunoglobulinas.

Dependendo da IL liberada no processo de ativação da célula B, é que vamos ter a produção de IgG (estimulada por Th1: IL-1,  $\gamma$ -IFN, IL-12) ou IgE (estimulada por Th2: IL-4, IL-6). A população de células Th1 e suas citocinas estimulam as células B a amadurecer e secretar anticorpos IgG2a. Já o  $\gamma$ -IFN inibe a transcrição genica da IgG1, enquanto a IL-4 é responsável pela troca da transcrição genica de IgG1 e IgE. É importante ressaltar que há necessidade de IL-4 e IL-5 para a maturação dos plasmócitos.

Os mecanismos apresentados até o momento da troca de isotipo na síntese de anticorpos são ainda um tanto complicados e controversos e por isso não serão discutidos a fundo aqui. Resumidamente podemos dizer que a troca da cadeia pesada se deve a uma deleção de um segmento de DNA entre regiões constantes de exons e, o novo exon do DNA que codifica a nova cadeia pesada. Isso parece se dar por uma excisão do “loop” do DNA intermediário, acompanhado pela deleção e reanelamento (ligação). Sabe-se que deve existir uma enzima na condução deste processo só que, esta ainda não foi descoberta.

## **VIA CLÁSSICA DO COMPLEMENTO**

Esta via só acontece se tivermos moléculas de anticorpo ligadas ao antígeno, e no mínimo são necessárias duas moléculas de anticorpo. O primeiro componente do complemento ativado é o C1, que ao se ligar à duas moléculas de anticorpo IgG ou uma molécula de IgM pela unidade 7S através da porção Fc da imunoglobulina, passando então a expor suas frações C1q, C1r e C1s e tornar a unidade C1r ativada, passando a ter atividade de esterase. Um detalhe importante nesse processo de ativação de C1 é que há a participação de ions cálcio ( $Ca^{++}$ ), sem ele, não há a manutenção do complexo

trimolecular C1q-C1r-C1s. É bom ressaltar que a via clássica também pode ser ativada pela presença da proteína A dos Estafilococos, pela Proteína C Reativa (PCR) e também pela molécula de DNA. Com esta atividade de esterase C1 cliva os dois próximos componentes da cascata do complemento que são C4 e C2, estes são clivados em C4a e C4b e C2a e C2b respectivamente. C4b e C2 aderem a superfície do antígeno, e próximo de C1, formando assim o complexo C14b2. A fixação de C2 só ocorrerá em C4b se contarmos com a presença dos ions Magnésio ( $Mg^{++}$ ), só então é que C2 será quebrado em C2a e C2b, este último fica em solução. O complexo C4b2a age como uma C3 convertase que cliva C3 em C3a e C3b, deste modo a opsonização e quimiotaxia dos leucócitos é ativada, assim como também ocorre o aumento da permeabilidade vascular. C4b2a tem a capacidade de clivar várias moléculas de C3 em C3a e C3b, sendo que C3b irá se ligar a superfície do antígeno. O complexo C4b2a3b é chamado de C5 convertase, este quebra as moléculas de C5 em C5a e C5b. As moléculas de C5b se ligam também a superfície do antígeno e, em seguida dá início a formação do complexo de ataque a membrana (MAC), assim temos a ligação sucessiva de C6, C7, C8. Finalmente ocorre a ligação de 8 a 18 moléculas de C9 junto a este complexo, formando assim um canal transmembrana que atua como uma unidade lítica.

Os fragmentos C3a e C5a atuam como potentes anafilotoxinas que estimulam os mastócitos a degranularem histamina, a qual é um potente dilatador vascular e contrator da musculatura lisa. Os neutrófilos liberam enzimas hidrolíticas e as plaquetas se agregam, levando a microtrombose, estase sanguínea, formação de edema e destruição tecidual local. C5a também atua como fator quimiotático para polimorfonucleares e macrófagos.

Vemos então que a reação que ocorre é uma reação em cascata, uma vez que em cada fase enzimática ocorrem inúmeras reações na fase seguinte, avolumando a reação, como se fosse um processo energético de uma cascata. O processo reacional vai se avolumando a cada passo que ocorre a reação seguinte.

#### ATIVIDADES DO COMPLEMENTO

Muitas células próprias ou estranhas ao organismo podem sofrer lesões pela ação do complemento. Plaquetas, hemácias, leucócitos, bactérias, quando revestidas por anticorpos específicos ativam o complemento.

Os componentes C3 e C9 são os responsáveis pelo desencadeamento da lesão. No caso dos microrganismos patogênicos, o complemento é de capital importância na destruição das mesmas e na defesa do indivíduo. Logicamente, há uma série de reações indesejáveis, onde o complemento é o responsável. É o caso das reações pós transfusionais em que, a administração de sangue ABO incompatível leva a reações severas como calafrios, tremores, elevação da temperatura e, conseqüentemente, fixação do complemento com lise e liberação da hemoglobina.

Nas anemias auto imunes ocorre, também, hemólise. O anticorpo sensibiliza as hemácias e desencadeia a hemólise. A doença hemolítica do recém-nascido (DHRN) é, frequentemente provocada

por anticorpos para o fator Rh. Há uma série de outros processos em que a participação do complemento é indesejável.

**Complemento e Fagocitose:** hemácias revestidas por anticorpos e complemento têm sido utilizadas para a demonstração da participação do complemento na facilitação da fagocitose. O C3b é o elemento mais envolvido nesse processo. Os polimorfonucleares e macrófagos possuem receptores para C3b em suas membranas, o que promove íntimo contato entre fagócitos e as células a serem ingeridas.

Bactérias em presença do complemento e de seu anticorpo correspondente, são fagocitadas mais facilmente e sofrem lise.

**Complemento e Liberação de Histaminas:** na sequência da reação de fixação do complemento, são liberadas C3a e C5a, em ambas as vias, clássica e alternativa. São proteínas de baixo peso molecular e que promovem a contração da musculatura lisa e podem provocar o aumento da capilaridade celular. Os C3a e C5a são distintos quimicamente e biologicamente, de modo que, quando o músculo não responde mais ao C3a, mostra resposta ativa ao C5a, sugerindo receptores nos mastócitos. Nesse processo há a liberação de histamina que exerce a função de anafilotoxina.

**Complemento e Ação Quimiotática:** os fragmentos C3b e C5a e o C5b67 (Complemento macromolecular) formados durante o processo de fixação do complemento, atraem polimorfonucleares, exercendo ação quimiotática positiva. Se for feito um corte histológico no local em que ocorreu o Fenômeno de Arthus, isto é, no ponto onde se deu a reação de antígeno-anticorpo, envolvendo o complemento, observa-se um acúmulo de polimorfonucleares.

O tratamento de C3a por tripsina inativa a sua capacidade de contrair o músculo liso, permanecendo a sua ação quimiotática. Nesse caso sugerem-se que grupamentos químicos distintos sejam responsáveis por estas atividades.

**Complemento e Produção de Quininas:** As quininas são polipeptídeos com atividade hipotensora e estimulante da musculatura lisa, durante a ativação do complemento. Há sugestões que a quinina produzida pelo complemento seja originada do componente C1 ou C4. O tratamento destes com a C1 esterase dá origem a uma substância de atividade semelhante às quininas.

**Complemento e Doenças Humanas:** o complemento está relacionado à diversas doenças como, a glomerulonefrite aguda e crônica, lupus eritematoso sistêmico, na pan encefalite sub aguda e mesmo na hepatite viral. Já se sabe que há deposição de complexos antígeno-anticorpo-anti-AU, em lesões renais.

**BIOSSÍNTESE DO COMPLEMENTO:** Os locais de síntese dos seus componentes são diversos e determinados para quase todos os componentes, bem como para o inibidor C1.

Componentes do Complemento e locais de síntese:

| Componente | Locais de Síntese   |
|------------|---------------------|
| C1         | epitélio intestinal |
| C2         | macrófagos          |
| C3         | macrófagos          |

|             |                            |
|-------------|----------------------------|
| C4          | fígado (células de Kupfer) |
| C5          | baço                       |
| C6          | fígado                     |
| C7          | baço                       |
| C8          | fígado                     |
| C9          | fígado                     |
| Inibidor C1 | fígado                     |

### **EFEITOS BIOLÓGICOS DOS PRODUTOS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO**

| COMPONENTES E<br>COMPLEXOS ENVOLVIDOS | ATIVIDADES  |
|---------------------------------------|---|
| C1,4                                  | Em associação com IgM, neutralização do vírus Herpes simples  |
| C1,4,2                                | Possível produção de quininas, aumento da permeabilidade vascular   |
| C3b                                   | Facilitação da fagocitose pelos leucócitos. Imunoaderência - C3b sobre hemácias, leucócitos ou plaquetas, terminando por eliminação com a fagocitose. |
| C3a                                   | Quimiotaxia para leucócitos. Anafilaxia (liberação de histamina, contração da musculatura lisa e aumento de permeabilidade capilar).                  |
| C5a                                   | Quimiotaxia para leucócitos. Anafilatoxina.   |
| C5,6,7                                | Quimiotaxia para leucócitos.  |
| C8,9                                  | Efeito citotóxico.  |

## AS IMUNOGLOBULINAS

Também chamadas de anticorpos, são o produto da célula B madura, sintetizados devido a um estímulo antigênico. As imunoglobulinas são constituídas de, no mínimo duas cadeias pesadas (H de Heavy Chain) e duas cadeias leves (L de Low Chain), estas cadeias estão presas entre si por pontes dissulfeto.

As moléculas são subdivididas em classes e subclasses baseado em sua especificidade antigênica das cadeias pesadas. As cadeias pesadas são designadas por letras gregas minúsculas,  $\mu, \gamma, \alpha, \delta, \epsilon$ , e as imunoglobulinas são chamadas de IgM, IgG, IgA, IgD e IgE respectivamente. As três principais classes são a IgG, IgM e IgA e as presentes em menor quantidade são a IgD e IgE (menos de 1% do total de imunoglobulinas). Existem dois tipos de cadeias leves, chamadas de  $\kappa$  e  $\lambda$ , presentes em todos os tipos de imunoglobulinas, mas apenas um tipo está presente em cada molécula de imunoglobulina.

IgG, IgD e IgE apresentam duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, enquanto que a IgM e a IgA são multímeros desta estrutura básica. Pontes dissulfeto e forças não covalentes conferem estabilidade a estrutura da imunoglobulina. A estrutura monomérica básica tem a forma de Y, com uma região chamada de região de dobradiça. A região da dobradiça, é uma região rica em prolina e suscetível a clivagem por enzimas proteolíticas. Tanto a cadeia pesada e leve, possuem uma região constante na porção carboxi terminal e apresentam uma região variável na porção amino terminal. Aproximadamente 60% das moléculas de imunoglobulinas tem a cadeia leve  $\kappa$ , e 40% tem a cadeia leve  $\lambda$ . A cadeia leve  $\lambda$ , apresenta 6 subtipos, estes indo de  $\lambda 1$  a  $\lambda 6$ . As cinco classes de imunoglobulina são chamadas de **isotipos**, baseado na especificidade da cadeia pesada de cada classe de imunoglobulina. Duas classes de imunoglobulina, IgA e IgG foram posteriormente subdivididas em subclasses baseado nas diferenças apresentadas na cadeia pesada. Temos conhecimento de 4 subclasses de imunoglobulinas IgG, designadas como IgG1, IgG2(e recentemente descoberto a IgG2a e IgG2b), IgG3 e IgG4; e 2 subclasses de IgA, também designadas como IgA1 e IgA2.

A digestão da IgG com papaína fornece dois fragmentos chamados de Fab e um chamado de Fc. Cada fragmento Fab possui um sítio para ligação ao antígeno, o fragmento Fc não se liga a antígeno mas é capaz de fixar o complemento e se ligar a receptores de Fc presente nas células. Já ao tratarmos a IgG com pepsina, teremos a imunoglobulina clivada em sua porção carboxi terminal, dando como produto um fragmento com as duas porções Fab ligadas,  $F(ab')_2$ , e um fragmento parcialmente digerido de Fc (pFc'). Os fragmentos  $F(ab')_2$  possuem dois sítios de ligação ao antígeno. As cadeias leves possuem um domínio variável e um constante enquanto que a cadeia pesada possui um domínio variável e de três a quatro domínios constantes.

A cadeia leve das imunoglobulinas tem aproximadamente 24 kD e a cadeia pesada das imunoglobulinas tem um peso molecular compreendido entre 51kD e 71kD, baseado em suas características dividimos as imunoglobulinas em classes. Encontramos aproximadamente 30% de



homologia na sequência de aminoácidos presente na cadeia pesada das cinco classes de imunoglobulinas. A cadeia pesada da IgM é a  $\mu$ , da IgG é a  $\gamma$ , da IgA é a  $\alpha$ , da IgD a  $\delta$  e da IgE a  $\epsilon$ . A cadeia pesada é o principal constituinte da molécula de imunoglobulina. Cada imunoglobulina é constituída de uma cadeia de quatro polipeptídeos monoméricos, o qual consiste de dois polipeptídeos leves e dois pesados. Os dois polipeptídeos pesados são idênticos em qualquer molécula assim como as duas cadeias leves.

As imunoglobulinas possuem ainda regiões denominadas **domínios**, o qual consiste de um polipeptídeo presente tanto na cadeia leve como na pesada e cuja unidade estrutural contém aproximadamente 110 aminoácidos. Os domínios são alças que são ligadas por pontes dissulfeto nas regiões constante e variável das cadeias pesada e leve. As funções das imunoglobulinas estão ligadas a alguns domínios.

A região  $V_H$  corresponde a porção variável da cadeia pesada da imunoglobulina e a  $V_L$ , corresponde a região variável da cadeia leve. Temos ainda dentro destas regiões variáveis, partes hipervariáveis, chamadas de Regiões Hipervariáveis, estas são responsáveis pelo sítio de ligação ao antígeno e pela sua conformação e especificidade.

## ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DAS DIFERENTES CLASSES DE IMUNOGLOBULINAS

### IgG

Corresponde a aproximadamente 85% das imunoglobulinas presente nos adultos. Tem um peso molecular de 154kD com duas cadeias leves de 22.000D e duas pesadas de 55.000D cada. É também a imunoglobulina que dura mais tempo em circulação, em média 23 dias. Tem a capacidade de atravessar a placenta e é o anticorpo envolvido na resposta imune secundária (resposta anamnésica). Esta imunoglobulina possui alta afinidade para ligação a um antígeno específico, assim como de fixar complemento, estimular a quimiotaxia e atuar como opsonina para facilitar a fagocitose. Conforme dito anteriormente, temos 4 subclasses de IgG, todas baseadas nas diferenças de suas cadeias pesadas  $\gamma$ , temos então as cadeias  $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$  e  $\gamma_4$ . Estas diferenças da cadeia pesada se baseiam na diferença que apresentam no número e na posição das pontes dissulfeto que ligam uma cadeia a outra.

### IgM

Corresponde a 5% das imunoglobulinas presentes no indivíduo adulto e possui uma vida média de 5 dias. É uma molécula com estrutura pentamérica, ou seja, possui 5 estruturas básicas das imunoglobulinas, só que estas estão ligadas entre si por pontes dissulfeto e pela Cadeia J, com isso o seu peso molecular é em torno de 900kD. A IgM é a imunoglobulina mais eficiente na fixação do complemento. Só encontramos a IgM em sua forma monomérica quando está ligada na membrana dos

linfócitos B maduros, nesse caso ela apresenta dois componentes adicionais, o domínio transmembrana, composto por aminoácidos hidrofóbicos que ancoram a molécula à membrana citoplasmática, e um domínio citoplasmático. Por ser uma imunoglobulina grande, basicamente a encontramos no interior dos vasos. Tem importância na imunidade para antígenos polissacarídeos oriundos dos microrganismos.

#### IgA

Assim como a IgM, corresponde a 5% das imunoglobulinas presentes em um adulto, possui uma vida média de 6 dias, e seu peso molecular está em torno de 160 kD. Pode ser encontrada na forma monomérica, dimérica, trimérica ou multimérica. Existem duas subclasses de IgA que são a IgA1 e IgA2. Ela pode ser encontrada na circulação e nas secreções corporais, neste último caso ela se apresenta na forma dimérica, com as duas cadeias básicas da imunoglobulina ligadas pela cadeia J e um componente chamado de peça secretória.

#### IgD

Encontrada ligada a membrana de linfócitos B maduros, somente sob a forma monomérica. Seu peso molecular aproximado é de 185kD.

#### IgE

Encontrada sob a forma monomérica na circulação, seu peso molecular é de aproximadamente 200kD. Está implicada nas reações alérgicas, principalmente quando ligada a membrana de mastócitos e basófilos.

Resumidamente podemos dizer que a IgA secretória pode ser encontrada em secreções corporais como saliva, leite, secreções brônquicas e intestinais. IgD e IgM estão geralmente presas a membrana dos linfócitos B a fim de interagir com os antígenos e ativar os linfócitos B. A IgE está implicada com os mecanismos de anafilaxia e a IgG, que é a única imunoglobulina capaz de atravessar a placenta, é a que está presente na circulação sanguínea em maior quantidade.

### A LIGAÇÃO ANTÍGENO-ANTICORPO

O modelo tradicional usado há alguns anos, antes de se conhecer melhor a composição estrutural dos anticorpos não é mais válido. Este modelo antigo dizia que o antígeno se ligava ao anticorpo por um modelo tipo chave-fechadura, hoje em dia já é sabido que a interação que ocorre envolve sítios combinatórios, sendo estabilizada por ligações não covalentes, onde os grupos que interagem devem estar próximos para que estas forças atuem ou seja, devemos ter uma complementariedade entre o epítipo antigênico e o sítio combinatório do anticorpo. As variações que ocorrem nesta complementariedade é que gera diferenças na afinidade, avidéz e especificidade do anticorpo.

Podemos dizer que o anticorpo possui alta afinidade quando a interação das forças moleculares de atração é maior que o das forças de repulsão. A força de interação total entre antígeno e anticorpo é que confere o grau de avidéz e isto também está ligado a especificidade, pois quanto maior a complementariedade entre os sítios combinatórios do anticorpo com o antígeno, maior a sua especificidade.

#### A PARTICIPAÇÃO DOS ANTICORPOS NA REAÇÃO DE FASE AGUDA

A reação de fase aguda também pode ter início quando os anticorpos se ligam a superfície de mastócitos, só que a imunoglobulina que mais participa nessa reação é a IgE, isto porque ela possui um sítio de ligação específico para receptores presentes na superfície de mastócitos. Quando um microrganismo se liga a estes anticorpos ligados a mastócitos, há uma alteração conformacional nos receptores celulares dos mastócitos, que se traduz em um sinal que leva a liberação de mediadores capazes de aumentar a permeabilidade vascular e a quimiotaxia de polimorfonucleares.

Alguns tipos de anticorpos também podem se ligar a membrana de células fagocitárias, de modo que se houver a formação de um complexo antígeno-anticorpo, envolvendo mais de uma molécula de anticorpo, há uma alteração a nível de receptores das células fagocitárias que induzem um sinal ao fagócito, fazendo que ele fagocite o antígeno. Isto ocorre mais rápido do que se o fagócito apenas tivesse um contato íntimo com o antígeno.

Os anticorpos também podem atuar bloqueando algumas reações dos antígenos a ligação com células, por exemplo, um anticorpo dirigido para a hemaglutinina do vírus Influenza, pode bloquear sua ligação a uma célula hospedeira. Outro exemplo, quando os anticorpos se ligam a moléculas de transporte presentes na membrana bacteriana, faz com que esta deixe de captar alguns nutrientes para o seu crescimento. Os anticorpos, também ao se ligarem a toxinas bacterianas, bloqueiam sua ação e evitam que ocorra o dano celular.

#### ANTICORPOS MONOCLONAIS

Os anticorpos monoclonais, em meados dos anos 70 representaram um grande avanço na linha de diagnóstico imunológico dos laboratórios, com eles foi possível aumentar a especificidade dos "kits" e assim, obter resultados mais confiáveis. Os anticorpos monoclonais, são anticorpos que possuem especificidade para apenas um determinado epítipo do antígeno, diferente dos anticorpos policlonais, onde temos varias imunoglobulinas respondendo a diferentes epítipos de uma mesma molécula antigênica. Nossa resposta imunológica normal a um antígeno é uma resposta policlonal, ou seja, há uma estimulação múltipla de vários clones formadores de anticorpos, cujos produtos representam uma mistura de imunoglobulinas.

A síntese de anticorpos monoclonais só é possível em um laboratório especializado, isto apesar de teoricamente ser fácil de ser montado. Os anticorpos monoclonais são sintetizados a partir de um clone de linfócito B ou de plasmócitos capazes de produzir anticorpos para o antígeno desejado.

Só que estes clones devem ser imortais, já que as células B não duram muito, mesmo que sejam mantidos em condições ideais.

A fim de conferir imortalidade aos linfócitos B, se montam os chamados **hibridomas**, que é a hibridização (fusão) de células B com uma célula de mieloma linfocitário. As células de mieloma são escolhidas por terem duas características principais, uma é de não conseguir produzir imunoglobulinas, outra é que não possuem a atividade de Hipoxantina Fosforibosil Transferase (HPRT) ou seja, não tem a capacidade de sintetizar purinas pela via exógena.

Os linfócitos B são fusionados com as células de mieloma usando-se Polietileno Glicol (PEG), deste modo em uma cultura de células passamos a ter linfócitos, células mielóides e hibridomas. Os híbridos sofrem a combinação dos seu genoma com o do linfócito B e adquire um estado diplóide. A seleção dos hibridomas é feita colocando as células tratadas com PEG em um meio contendo Hipoxantina, Aminopterina e Timidina, por isso chamado de meio HAT. O que se faz é esperar a morte natural dos linfócitos, que ocorre entre 1 a 2 semanas, enquanto que as células mielóides morrem porque elas não conseguem usar a Hipoxantina exógena para produzir purinas, e a Aminopterina bloqueia a síntese endógena de purinas e pirimidinas.

Os hibridomas conseguem sobreviver porque conseguem fazer uso da hipoxantina e timidina para produzir as purinas por via exógena, devido a informação genética oriunda dos linfócitos B. Passadas então duas semanas, o meio HAT vai sendo gradativamente substituído por um meio para manutenção celular comum, como o MEM-Eagle.

Posteriormente, quando estas células já estão crescendo em um meio de manutenção comum, é feita a separação destas por diluição. É realizada uma diluição de forma que se obtenha 0,5 células para cada 100 ou 200 $\mu$ L, e esta suspensão é distribuída em uma microplaca, colocando-se justamente de 100 a 200 $\mu$ L por orifício. Futuramente, quando já ocorreu o crescimento de mais hibridomas em cada orifício da microplaca, a suspensão de cada um destes deve ser testada. Normalmente pela metodologia de ELISA, para verificação do tipo de anticorpo produzido ser o desejado.

## **A SÍNTESE DAS IMUNOGLOBULINAS**

Durante a maturação dos linfócitos B, o primeiro rearranjo do DNA celular para a síntese dos anticorpos ocorre com a montagem da cadeia pesada e posteriormente a montagem da cadeia leve, mas para fins didáticos, apresentaremos primeiro a síntese das cadeias leves e posteriormente das pesadas.

Os cromossomas responsáveis pela produção de imunoglobulinas nos humanos são o 14 para as cadeias pesadas, 2 para as cadeias leves  $\kappa$  e 22 para as cadeias leves  $\lambda$ .

### **Síntese das cadeias leves**

Na década de 70, com o emprego das técnicas de DNA recombinante é que se tornou possível estudar os genes responsáveis pela codificação dos anticorpos. Conforme dito anteriormente, a cadeia

leve pode ser constituída pela cadeia  $\lambda$  ou  $\kappa$ , os genes que as codificam estão presentes em cromossomas diferentes. Iremos descrever brevemente como ocorre a síntese de cada uma destas cadeias baseado no modelo experimental descoberto em ratos.

**Síntese da cadeia Lambda:** O segmento genético que codifica a cadeia  $\lambda$  está presente no cromossoma 22 e está arranjado da seguinte forma a partir da posição 5' para 3':

- Apresenta aproximadamente 100 segmentos  $V\lambda$  (que codificam a porção variável),
- 6 segmentos  $J\lambda$  (codificando a Junção) sendo que o segmento  $J\lambda 4$  é um pseudogene, ou seja, é um gene que não é expressado,
- 6 segmentos  $C\lambda$  (que codificam a região constante).

Antes de cada segmento  $V\lambda$  temos também um segmento L chamado de segmento Líder, é ele que codifica o início da fita a ser transcrita, este segmento, codifica peptídeos que, tão logo a molécula de imunoglobulina esteja montada, são clivadas para dar origem a molécula funcional. Todos estes segmentos estão separados por introns (sequências não codificantes de DNA).

Inicialmente o que ocorre é a recombinação do segmento  $L\lambda-V\lambda$  com  $J\lambda$  formando o complexo  $L\lambda-V\lambda-J\lambda$  o qual fica separado do segmento  $C\lambda$  por um intron, e assim dará origem a um transcrito primário de RNA.

Posteriormente temos processo de “splicing” do intron entre a sequência  $L\lambda-V\lambda-J\lambda$  e  $C\lambda$  onde parte da sequência entre  $L\lambda-V\lambda-J\lambda$  e  $C\lambda$  é cortada e posteriormente é feita a adenilação do terminal 3', formando assim a cauda poli-A.

Este transcrito primário dá ao RNAm capacidade de codificar  $L\lambda V\lambda-J\lambda-C\lambda$  quando for traduzido. Após a tradução temos o peptídeo nascente que é processado e glicosilado, sofrendo então o corte do pedaço polipeptídico codificado pela sequência líder.

**Síntese da cadeia Kappa:** Nesse caso, o cromossoma que a codifica é o cromossoma 2, e este dispõe de maior número de regiões V (aproximadamente 350) cada uma precedida de uma sequência  $L\kappa$ , posteriormente 5 genes para  $J\kappa$ , e ao final do cromossoma há apenas um gene que codifica  $C\kappa$ .

Justamente pelo cromossoma que codifica a cadeia  $\kappa$  possuir maior número de genes codificando V é que o número de regiões variáveis possível é maior pois o número de combinações entre  $V\kappa-J\kappa$  passa a ser de aproximadamente 1400. A sequência de montagem da cadeia Kappa ocorre da mesma forma que o da cadeia Lambda.

### Síntese das Cadeias Pesadas

As cadeias pesadas são codificadas pelo cromossoma 14, só que além dos genes codificadores para V e J também há um grupo de genes chamados D (Diversidade), estes segmentos D apresentam variações tanto no número de codons como no número de pares de bases e ainda, mais de um

segmento D pode se unir para dar origem a uma região D. A região D pode ser lida de três formas diferentes sem gerar um “stop codon”, o que lhe atribui a diversidade.

O cromossomo da cadeia pesada descrito até o momento, parece apresentar de 100 a 200 genes para V com seus respectivos genes L na porção 5', 30 genes para D, seis genes funcionais para J, três pseudogenes J e 11 genes para as porções constantes da cadeia pesada ( $C\mu$ ,  $C\delta$ ,  $C\gamma3$ ,  $C\gamma1$ ,  $C\epsilon2$ ,  $C\alpha1$ ,  $C\gamma2b$ ,  $C\gamma2a$ ,  $C\gamma4$ ,  $C\epsilon1$  e  $C\alpha2$ ). São estes genes constantes que irão determinar a classe da imunoglobulina a ser formada.

No processo de montagem da cadeia pesada, primeiro ocorre o rearranjo do DNA de forma que um dos segmentos D e J são ligados, com o corte da sequência de DNA que está entre eles. Em seguida um dos vários segmentos V, junto com o respectivo gene L, é ligado ao complexo DJ formado. Este rearranjo VDJ acontece apenas nas células que darão origem aos linfócitos B, e é o ponto crítico de controle na expressão da imunoglobulina uma vez que apenas o gene V rearranjado é transcrito. As regiões C ainda se mantêm separadas do complexo VDJ por um intron, provavelmente contendo ainda segmentos J não rearranjados.

O transcrito primário de RNA vai ter a mesma organização deste DNA. Não se sabe ainda se todas as regiões constantes são expressas no transcrito primário. Posteriormente o RNA primário transcrito sofre o processo de “splicing”, onde o intron situado entre o complexo VDJ é excluído até o primeiro gene C, o qual é o  $C\mu$ , dando origem a um RNAm funcional para a montagem da cadeia pesada  $\mu$ . Múltiplos nucleotídeos de adenina são adicionados, formando a cauda poli-A, a um dos sítios de poliadenilação localizados na porção 3' do RNA  $C\mu$ .

Os genes codificadores para as outras classes também possuem sítios de poliadenilação, e são utilizados quando estas regiões são expressas. Então após a montagem do RNAm, este é traduzido, dando origem a um polipeptídeo que ainda contém os peptídeos codificados pelo gene L, estes então são cortados durante o processamento e glicosilação da proteína, assim dando origem a cadeia pesada  $\mu$ .

Todo este rearranjo do DNA que dará origem as cadeias pesadas e leves da imunoglobulina, são comandados por recombinases, são enzimas que reconhecem sequências específicas do DNA localizadas na região 3' e 5' de cada exon que será unido e assim, se forma um “loop” do intron de DNA que será cortado.

A troca de classe de imunoglobulina, importante no processo de amadurecimento da resposta imune, parece ser acompanhada ou precedida pela mutação somática. Inicialmente um segmento completo de DNA, o qual inclui a região  $V_H$  recombinada, é lido com as regiões  $\mu$  e  $\gamma$ , sendo transcrito em duas moléculas de RNAm, uma expressando a região constante  $\mu$  e outra expressando a região constante  $\gamma$ . Supõe-se também que segmentos maiores de DNA sejam transcritos juntos, e que o “splicing” diferencial daria origem à outras classes de imunoglobulinas, compartilhando as regiões  $V_H$ . Isto foi observado em células produzindo simultaneamente IgM e IgE.

Parece também que a troca de classe de imunoglobulina é mediada pela recombinação entre cromossomas, nesse caso a semelhança entre as sequências que definirão a classe de imunoglobulina, permitem que ocorra uma recombinação somática entre dois cromossomas. Deste modo, se por exemplo temos dos cromossomas, um chamado de A e outro B, uma parte do cromossoma A rearranjado, que seria cortado em  $C\mu$ , recombina com parte do cromossoma B ainda não rearranjado onde está o gene para  $C\gamma$ . Assim teríamos a troca da IgM pela IgG.

Como vemos, devido a esta recombinação somática que ocorre é que permite a diversidade que aparece nas imunoglobulinas, a associação ao acaso de cadeias leves e pesadas ainda contribui mais para aumentar esta diversidade.

Devemos ter em mente também que o DNA presente em uma célula B que sofreu o rearranjo (recombinação somática), é diferente das demais células do organismo, pois devido as deleções sofridas no DNA, este é menor, no entanto a célula B continua sendo uma célula somática, ou seja capaz de se dividir.

As células tronco hematopoiéticas, assim como qualquer célula não B, tem o DNA correspondente aos genes das imunoglobulinas não rearranjado. A partir do momento que a célula tronco dá origem a uma célula pró-B, já começa a ocorrer o rearranjo dos genes de imunoglobulinas.

### **O controle alélico**

Como cada célula de nosso organismo tem 23 pares de cromossomas homólogos, isto significa que temos 2 pares de cromossomos 2, 14 e 22. Como o linfócito B só produz um tipo de anticorpo, ou seja com um tipo de cadeia leve e um tipo de cadeia pesada isto significa que a expressão dos outros tipos de cadeia pesada é suprimida assim como do segundo tipo de cadeia leve. Por exemplo, o linfócito B produz anticorpos com a cadeia leve  $\lambda$  e com a cadeia pesada  $\gamma$ , suprimindo a expressão dos demais. O que deve estar ocorrendo então é o que chamamos de exclusão alélica, ou seja enquanto um dos genes é expresso o outro é excluído. Isto parece ocorrer da seguinte forma, quando o rearranjo de um dos genes, como por exemplo, o de cadeia pesada é bem sucedido, originando cadeias pesadas funcionais, estas cadeias impedem o rearranjo do cromossomo homólogo e, assim não pode codificar outra cadeia pesada. No caso dos genes das cadeias leves, parece que as cadeias pesadas produzidas irão estimular o gene das cadeias leves a sofrer rearranjo, inicialmente os genes da cadeia  $\kappa$ , se então o rearranjo dos cromossomos 2 é bem sucedido, há o impedimento do cromossoma homólogo e do par de cromossomos 22. Caso este rearranjo não seja bem sucedido, outro cromossomo 2 é rearranjado e, em sequência, o par 22, até que uma cadeia leve funcional seja produzida. Esta então inibirá o rearranjo nos genes ainda não modificados. Caso não haja rearranjo produtivo de cadeias leves ou pesadas a célula entra em apoptose.

### **Produção de imunoglobulinas de membrana**

Os linfócitos B maduros tem de apresentar IgM em sua superfície celular, esta IgM está na forma monomérica e apresenta dois domínios adicionais na porção carboxi terminal, um é o domínio

transmembrana e o outro o citoplasmático. A IgM secretada tem estes dois domínios substituídos por uma peça. Estes dois tipos de IgM se originam devido a um processo alternativo do mesmo transcrito primário de RNA onde um transcrito dará origem a IgM secretória com a cauda na porção carboxi terminal e o outro transcrito dará origem a IgM com os domínios transmembrana e citoplasmático.

### **Troca de classe das imunoglobulinas**

Os linfócitos B assim que estão maduros expressam IgM e IgD em sua membrana, isto se deve ao transcrito primário conter tanto o segmento que expressa a IgM e a IgD, tendo este então dois processamentos para montar uma ou outra imunoglobulina. No entanto quando a resposta imune exige a troca de classe, o rearranjo VDJ pode permanecer e ocorre apenas um novo rearranjo com o segmento C. Outra possibilidade, é do rearranjo VDJ permanecer e ser montado um transcrito primário que expresse os segmentos constantes necessários. Este rearranjo é dependente das citocinas liberadas durante o estímulo imune.

Na resposta secundária, dependendo do estímulo imune, pode ainda vir a ocorrer o rearranjo somático dos segmentos V, desta forma aprimorando a especificidade do anticorpo.

Os linfócitos B maduros, assim que saem da medula óssea permanecem na circulação periférica por alguns dias, morrendo então a menos que sejam recrutados por contato com o antígeno que reconhecem. A partir do estímulo sofrido pela ligação com o antígeno mais aqueles oriundos das células T<sub>H</sub> estes passam a secretar imunoglobulinas.

### **REAÇÕES MEDIADAS POR CÉLULAS**

Estas reações envolvem a resposta imune quando, os anticorpos não são suficientes ou não conseguem ter participação efetiva na ativação imunológica. Esta resposta mediada por células pode ocorrer na presença de maior ou menor quantidade de anticorpos, não existe uma resposta sem a participação de anticorpos. Como exemplo, citamos a formação dos complexos antígeno anticorpo durante uma resposta, em que estes complexos estimulam a liberação de fatores quimiotáticos os quais levam ao aumento do numero de células e inflamação local. Os anticorpos também podem estar envolvidos na ligação dos antígenos às células via os receptores Fc, deste modo modulando a resposta celular. No caso de células fagocitárias e Natural Killer (NK), os anticorpos podem liga-las à seus alvos.

Do mesmo modo não podemos dizer que toda resposta mediada por células é dependente da coordenação dos linfócitos T, muitas das vezes a resposta depende do reconhecimento de partes comuns do microrganismo por receptores que não estão relacionados com receptores antígeno-específico de células T e B.

### **Respostas T independentes**



Vários componentes de microrganismos podem servir de estímulo para que ocorra a quimiotaxia de fagócitos até o ponto de infecção. Algumas endotoxinas bacterianas podem ativar a via alternativa do complemento, promovendo então a formação de C3a e C5a, que tem atividade quimiotática. Outro exemplo, são os Formil peptídeos que algumas bactérias possuem e que agem como quimiotáticos e são agentes estimulantes para fagócitos, uma vez que possuem receptores para estas substâncias.

A fagocitose só ocorre se o microrganismo estiver ligado a superfície da célula fagocitária, é claro que esta ligação é facilitada quando o microrganismo está recoberto pela fração C3b do complemento pois, C3b se liga a receptores CR3 existentes nos fagócitos. Do mesmo modo, se o antígeno está recoberto por moléculas de anticorpo, então o fagócito se liga ao antígeno via receptor de Fc para a imunoglobulina.

Outro mecanismo de ativação da resposta celular independente da ativação das células T, é o da liberação de citocinas pelos macrófagos e outras células. O microrganismo invasor parece ter ou liberar moléculas que fazem este efeito.

Dentre as citocinas liberadas pelos macrófagos, as de maior importância parecem ser o TNF $\alpha$ , o MIF (Fator de Inibição de Macrófagos) e a IL-12. O TNF $\alpha$  age aumentando a capacidade microbicida de macrófagos e neutrófilos, junto com IL-12 ele faz com que as células NK liberem  $\gamma$ -IFN, que leva ao aumento da atividade microbicida dos macrófagos. O TNF $\alpha$  também causa mudanças nas células endoteliais e fagócitos o que leva a um aumento da capacidade de adesão dos fagócitos as paredes dos vasos endoteliais, fazendo que deste modo as células cheguem ao sítio de inflamação. Quanto ao MIF, ele possui a capacidade de atrair mais células ao local onde está o antígeno e desencadear o processo inflamatório, ele também é capaz de aumentar a capacidade de fagocitose de outros macrófagos e neutrófilos, assim como sinalizar células B e T para que entrem em estado de “prontidão”.

### **Respostas mediadas por células T**

As células T encarregadas do principal controle imunológico neste tipo de reação são as CD4+ ou Thelper (T<sub>H</sub>). Diferentes sub populações de células T<sub>H</sub> modulam os vários tipos de cooperação celular e produzem diferentes tipos de citocinas. Efeitos secundários deste tipo de ativação levam a Reação de Hipersensibilidade Tardia com a formação do granuloma de hipersensibilidade ou dano tecidual. As células T encarregadas da supressão do sistema imune são chamadas de células T supressoras, algumas delas liberam citocinas modulatórias como a TGF $\beta$ , que parece ser um supressor de células T.

A partir do momento que uma célula T<sub>H</sub> é ativada (pela apresentação de um antígeno a ela), ela pode determinar qual ou quais mecanismos que serão ativados, dentre estes, temos: a ativação de células CD8+ citotóxicas (T<sub>C</sub>), ativação de mastócitos e eosinófilos, ativação de macrófagos levando a

hipersensibilidade tardia. A via de ativação vai depender de que sub população de linfócitos T ( $T_{H1}$  ou  $T_{H2}$ ) vai ser ativada, e isto depende das citocinas e da concentração local de vários esteroídes e metabólitos da vitamina  $D_3$  presentes no tecido linfóide. Por exemplo, quando um microrganismo leva a liberação de IL-12 e  $\gamma$ -IFN de macrófagos e células NK, a sub população de linfócitos T que será ativada é a  $T_{H1}$ , enquanto que a liberação de IL-4 e IL-10 leva a ativação de  $T_{H2}$ .

No processo agudo ocorre a estimulação das células  $T_{H0}$  que tem a capacidade de liberar uma série de citocinas. No estímulo crônico as sub populações  $T_{H1}$  e  $T_{H2}$  se tornam ativas. Algumas citocinas são liberadas tanto por  $T_{H1}$  quanto  $T_{H2}$  (IL-3, GM-CSF,  $TNF\alpha$ ) enquanto algumas só por  $T_{H1}$  (IL-2,  $\gamma$ IFN) e  $T_{H2}$  (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10). A população  $T_{H1}$  responde a macrófagos, especialmente quando estes apresentam o antígeno. A população  $T_{H2}$  tende a aumentar a produção de eosinófilos e mastócitos e aumentar a produção de anticorpos da classe IgE principalmente; essa população responde melhor quando o antígeno é apresentado por células B. Sabe-se também que uma população de  $T_{H1}$  é capaz de inibir a ação de  $T_{H2}$  e vice versa. O  $\gamma$ -IFN secretado por  $T_{H1}$  inibe  $T_{H2}$ , enquanto que a IL-10 liberada por  $T_{H2}$  inibe a liberação das citocinas de  $T_{H1}$  e talvez das células T citotóxicas e NK.

As células que expressam CD8 na membrana podem apresentar variações na liberação de citocinas, muitas delas liberam as mesmas citocinas que  $T_{H1}$  liberam e outras tem o mesmo repertório de citocinas que  $T_{H2}$ , talvez estas últimas exerçam um papel regulador ou supressor. A diferenciação das células CD8 é influenciada pelas sub populações de células CD4. A atividade citotóxica das células CD8 está presente enquanto as células  $T_{H1}$  estão ativas.

### **Citotoxicidade Mediada por Células**

A citotoxicidade mediada por células pode ser feita por células T citotóxicas, algumas sub populações de células linfóides, e em determinadas circunstâncias por células mielóides. As células citotóxicas só são capazes de lisar células alvo, desde que estejam suficientemente próximas. No entanto nem todas as células citotóxicas operam do mesmo modo, pois existe o comprometimento de diferentes receptores na forma de ativação do mecanismo citotóxico. Existem três principais tipos de interação receptor-ligante:

- Antígenos específicos (como peptídeos virais em células infectadas), são reconhecidos por receptores de MHC das células T citotóxicas. Nesse caso a maioria das células é CD8+, mas também envolve algumas CD4+.
- Determinantes presentes em células tumorais, por exemplo, são reconhecidos por receptores em células NK.
- Um anticorpo já ligado a um determinado antígeno (antígeno viral em uma célula infectada), é reconhecido pelos receptores Fc presentes em células K; a esta forma de reconhecimento chamamos de Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC).

Estes são os principais mecanismos, mas existem outros em que há outras interações ligante-receptor que contribuem na estabilização da ligação entre a célula citotóxica e a célula alvo.

Há um grupo de células citotóxicas capazes de reconhecer peptídeos apresentados por moléculas de MHC presente nas células alvo e que por isso, não depende do reconhecimento de um antígeno ligado a anticorpo. São chamadas de células T citotóxicas MHC restritas, na verdade são uma sub-população de pequenos linfócitos. A maioria destas células é CD8+ e é capaz de reconhecer antígenos associados com MHC de classe I, mas aproximadamente 10% das células T citotóxicas MHC restritas tem CD4+ e reconhecem o MHC de classe II.

O papel mais importante das células T citotóxicas, talvez seja o de eliminar células infectadas por vírus ao fazer o reconhecimento do antígeno apresentado junto com o MHC de classe I.

Temos também um grupo de células citotóxicas que não precisam reconhecer o MHC, entre elas incluem-se as células NK e LAK (Lymphokine Activated Killer), geralmente estão presentes no baço e sangue periférico.

As células NK são derivadas dos grandes linfócitos granulosos (LGL), a maioria das NK são CD3-, CD16+, CD56+ e MHC de classe I+, este último como forma da célula ser reconhecida como própria e não ser lisada.

Quanto as células LAK, sabe-se que em cultura elas são capazes de ter sua atividade citotóxica aumentada quando na presença de IL-2. Elas são derivadas de células precursoras parecidas com as células NK.

Tem-se o conhecimento de que existem células matadoras, mas que não possuem uma função específica, elas possuem CD3+ e CD8+ e apresentam atividade citotóxica dependente do reconhecimento do MHC de classe I, há também uma população que expressa CD3+ e o receptor de células T mas que possui pouca atividade citotóxica e não precisa fazer o reconhecimento do MHC.

### **Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo (ADCC)**

As células que desempenham este papel, possuem receptores para a porção Fc das imunoglobulinas, principalmente IgG, e costumam a se ligar à células alvo recobertas por anticorpos. Os principais alvos deste tipo de células, são as células infectadas por vírus que apresentam antígenos virais em sua superfície, moléculas de MHC e alguns epítomos presentes em tumores. Embora alvo de controvérsias, também é dito que monócitos e polimorfonucleares podem atacar células tumorais recobertas por anticorpos.

Algumas células mieloídes como os monócitos e eosinófilos, tomam parte nesse estímulo celular mediado por anticorpo. Nesse último caso a reação celular ocorre contra parasitos e a classe da anticorpos envolvidos parece ser a IgE. Diante disso levantou-se a possibilidade de que a IgE promove inicialmente os mastócitos a degranularem fatores quimiotáticos para eosinófilos e estes ataquem o parasito em questão. Este tipo de mecanismo parece ser controlado pelas células T<sub>H2</sub>, uma vez que elas liberam IL-4 e IL-5 que tem papel na promoção do aumento da população de eosinófilos, mastócitos e linfócitos B produtores de IgE.

O mecanismo básico pelo qual as células ADCC, T citotóxicas, NK e Linfóides K exercem sua função é bem parecido, este envolve três fases distintas:

1. Ligação da célula com a célula alvo
2. Liberação do conteúdo citotóxico das vesículas, esta etapa é  $Ca^{2+}$  dependente. Nesta etapa a célula alvo sofre alteração de sua estrutura e já se prepara para a morte.
3. Morte da célula alvo

Este modelo simples é baseado na observação de vesículas dos Grandes Linfócitos Granulosos (LGL), células NK e algumas células T citotóxicas, que contém perforina (uma proteína com atividade semelhante a fração C9 do complemento), e serina esterase, envolvida na montagem do processo lítico. Na presença de  $Ca^{2+}$ , os monômeros de perforina se ligam a membrana da célula alvo e se polimerizam formando o canal transmembrana. É bom ressaltar que as células citotóxicas são resistentes a atividade da perforina e por isso podem continuar ativas, esta resistência parece ser conferida pela proteoglicana presente nas vesículas, que se liga e inativa as perforinas. As perforinas terminam por levar a célula alvo a apoptose com a fragmentação do DNA e desintegração celular em pequenos pedaços, que são rapidamente capturados e destruídos por outras células, isto sem provocar um grande processo inflamatório.

Nem todas as células com atividade citotóxica são capazes de produzir perforina e, por isso, sua atividade citotóxica é menor, uma vez que ela deve ter outros mecanismos menos eficazes de destruição da célula alvo.

As vesículas das células T citotóxicas parecem conter  $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$  (Linfotoxina) e fator citotóxico de NK (NKCF), no entanto não se sabe direito o papel destas citocinas uma vez que elas levam de 3 a 4 horas para exercer seu efeito citotóxico.

As células mielóides tem sua atividade citotóxica ainda não totalmente conhecida, sabe-se que junto com a liberação de  $TNF\alpha$  e  $\gamma IFN$  (este último liberado por células T e NK), há um aumento de atividade da ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase da célula alvo, com a conseqüente liberação de radicais livres intracelulares, também ocorre a liberação de radicais livres da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e mudanças na síntese proteica. As células mielóides também são capazes de liberar mediadores tóxicos como oxigênio reativo e intermediários nitrogenados.

### **O papel dos Macrófagos**

Sabe-se que os macrófagos estão envolvidos em praticamente todos os estágios da resposta imune, agindo antes mesmo da resposta mediada pelos linfócitos T. Também é sabido que eles atuam na ativação de células T ao liberar determinadas citocinas e atuam na resposta coordenada pelos linfócitos T, mediando a resposta inflamatória, tumoricida e microbicida.

Muitas das ações dos macrófagos são conhecidas a partir de estudos *in vitro*, onde se descobriu que o  $\gamma IFN$  é capaz de ativar sua capacidade de produção de óxido nítrico enquanto que o  $TNF\alpha$  é capaz de aumentar a sua liberação. Também foi possível saber que os macrófagos são

desativados quando na presença de Prostaglandina E e glicocorticóides. Há alguns anos atrás foi descoberto o Fator Desativador de Macrófagos, encontrado como produto de células tumorais, este fator é capaz de bloquear a atividade do  $\gamma$ IFN.

### **Formação de granuloma**

Quando a resposta mediada por células falha na destruição de um microrganismo por ele ser resistente ao ataque, as células T continuam liberando linfocinas que levam a formação do granuloma. A formação do granuloma é observada, por exemplo, em infecções por *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Leishmania spp* e *Lysteria monocytogenes* e organismos grandes como o ovo de schistosoma.

A característica dos granulomas é conter células derivadas de macrófagos, cuja função ainda não está esclarecida, células epitelióides e células multinucleadas gigantes. Estas células parecem ter mais a função secretória do que fagocitária e, ao que parece elas são o resultado da estimulação crônica dos macrófagos pelas linfocinas.

A análise do granuloma mostra que existem células T CD4+ no centro e, células CD8+ na periferia, sugerindo que as CD4+ tem importância na indução ao acúmulo e ativação de outros linfócitos e macrófagos. Estudos *in vitro* mostram que as linfocinas liberadas por T<sub>H1</sub> e TNF $\alpha$  são essenciais nesse papel. No modelo animal de infecção pelo schistosoma em ratos há a necessidade de células T<sub>H2</sub>.

## **REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE**

A resposta imune pode ser regulada de várias maneiras, veremos brevemente as principais delas, apenas o suficiente para que possamos entender como que isso influencia nos exames laboratoriais.

### **Regulação feita por antígenos**

Células T e B podem ser ativadas por antígenos assim que eles se ligarem a receptores específicos, no caso dos linfócitos T a ligação não se dá com o antígeno mas sim com parte desse que passou por um processamento e foi ligado ao MHC de classe I ou II. A forma com que o antígeno é administrada e a natureza do antígeno também tem profunda relação com a forma da resposta imune. Como exemplo temos a cápsula polissacarídica de bactérias que geralmente induzem a produção de IgM, enquanto que as proteínas induzem a resposta celular e humoral.

Grandes quantidades de antígeno ao invés de produzir a ativação, podem levar ao fenômeno de Tolerância, que pode ser T específica e/ou B específica. Como exemplo, se for administrada uma alta dose de polissacarídeo em um animal, este pode ter induzida sua tolerância a este antígeno.

## **Regulação por anticorpos**

Os mecanismos pelos quais os anticorpos regulam a resposta imune ainda não estão totalmente definidos, sabe-se que os anticorpos são capazes de induzir um controle negativo na resposta imune, isso é observado quando se administra um antígeno junto com IgM específica, neste caso ocorre um estímulo da resposta imune para este antígeno, ao passo que, se for administrada IgG no lugar da IgM ocorre uma supressão na resposta. A aplicação prática deste conhecimento é feita, por exemplo, na aplicação de vacinas para caxumba e sarampo, elas não são administradas em crianças com menos de 7 meses. Isso porque os níveis de IgG oriundas da mãe, permanecem em circulação por até 6 meses após nascimento e, com administração da vacina nesse período geraria uma resposta inadequada, por não haver o estímulo a produção de mais anticorpos. Outro exemplo está nos casos em que há a incompatibilidade de Rh. A administração de anticorpos para Rh na mãe Rh-, evita que ela seja sensibilizada pelas hemácias Rh+ da criança no momento do parto, removendo as poucas hemácias que por ventura cheguem a mãe através da ativação da cascata do complemento.

Os imunocomplexos também podem aumentar ou diminuir a resposta imune, as imunoglobulinas G e M podem modular a resposta via receptores de Fc e a formação de um imunocomplexo com o imunógeno. Um exemplo disso está em pacientes com tumores malignos, onde foi postulado que os imunocomplexos circulantes de anticorpos e células tumorais são capazes de suprimir a resposta imune. Já a formação de imunocomplexos como o que ocorre com a proteína A de estafilococos e anticorpo, estimulam a resposta imune por desencadear a via clássica e alternada do complemento.

## **Regulação por linfócitos**

Conforme dito anteriormente, dependendo da sub-população de linfócitos T ativada ( $T_{H1}$  ou  $T_{H2}$ ), a resposta ocorre de forma diferente. Há também a evidência de que as células T podem fazer a supressão da resposta imune.

As células CD4+ podem evitar que ocorra a autoimunidade, embora não se conheça o mecanismo pelo qual elas fazem isso. Sabe-se também que a liberação de citocinas como TGF $\beta$ , IL-4 e IL-10 podem suprimir a resposta imune parcial ou totalmente.

A produção de citocinas pelas diferentes sub-populações de linfócitos  $T_H$  CD4+, mostra porque ocorre a indução na produção de IgE, também a regulação cruzada das sub-populações de linfócitos T mostra que citocinas como o  $\gamma$ IFN secretado por células  $T_{H1}$  pode inibir a resposta de  $T_{H2}$ . A IL-10 liberada por  $T_{H2}$  faz a supressão da expressão de B7 e produção de IL-12 por parte das células APC, o que também acaba por inibir a ativação de  $T_{H1}$ . No entanto parece que a função fisiológica de  $T_{H2}$  é mesmo de regular a resposta, conforme modelo realizado em ratos de laboratório, em que ao se remover a população  $T_{H2}$ , o rato tinha a resposta imune exacerbada.

Já as células CD8+ parecem desempenhar o papel de transferir a resistência e a tolerância, este efeito parece ser mediado pela TGF $\beta$ .

## **Regulação neuroendócrina**

Em condições de estresse pode ocorrer a supressão da resposta imune, como por exemplo a maior dificuldade de uma pessoa se recuperar de uma infecção. A regulação feita pelo sistema nervoso central (SNC), pode ocorrer sob dois aspectos, numa devido a maioria dos tecidos linfóides e vasos sanguíneos terem enervação simpática, acaba influenciando na regulação dos linfócitos. Também o sistema nervoso controla de forma direta ou indireta a liberação de vários hormônios, envolvendo peptídeos pituitários e hormônios esteroídais adrenais em particular, corticosteróides, hormônio do crescimento, tiroxina e adrenalina. As células nervosas costumam apresentar receptores para produtos do sistema imune, assim como os linfócitos apresentam receptores para vários hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo-se alguns para as catecolaminas (adrenalina e nor adrenalina), encefalinas, endorfinas, substância P e peptídeo intestinal vasoativo (VIP), a resposta varia entre os diferentes linfócitos e monócitos. Como exemplo temos a prolactina regulando a função linfocitária, em condições de estresse há a liberação de corticosteróides, endorfinas e encefalinas as quais tem efeito imunossupressivo. Foi evidenciado também que os linfócitos podem responder a corticotrofina, liberando um fator que as faz gerar seu próprio ACTH, o qual é capaz de ativar a liberação de corticosteróides. A substância P parece ter papel nas reações de hipersensibilidade como a artrite e a asma, ao ser liberada pelo sistema nervoso, parece atuar em cima das juntas e do trato respiratório perpetuando o processo inflamatório e, pelo menos *in vitro* ela parece atuar na quimiotaxia de macrófagos e fazer com que mastócitos degranulem. Outro exemplo, encontramos nas células como os macrófagos, que quando ativados liberam IL-1, esta age no hipotálamo produzindo a febre.

## **Controle genético**

Estudos realizados com diferentes grupos populacionais tem demonstrado que a resposta imunológica pode variar entre eles por um fator genético. Um dos exemplos está em famílias que são suscetíveis ao *Corynebacterium diphtheriae*, isto devido a uma característica intrínseca deles. Outro exemplo está na susceptibilidade de algumas famílias de Japoneses descendentes da ilha de Okinawa ao HTLV; também tem-se conhecimento de grupos suscetíveis ao *Mycobacterium tuberculosis*, assim como outros suscetíveis ao vírus da hepatite B e por isso incapazes de montar uma resposta contra estes agentes. Parte dessa resposta parece ser determinada pelos genes que controlam a montagem do MHC de classe II pois, de acordo com sua estrutura ele poderá ter maior ou menor afinidade por determinados peptídeos. Mas há também a influência de outros genes não ligados ao MHC que parecem influenciar, como exemplo temos a Imunodeficiência Severa Combinada (SCID) que ocorre devido a falta do gene da recombinase, outro exemplo está na Deficiência da Adesão Leucocitária, promovida por mutações na subunidade da  $\beta_2$  integrina, o que leva a falha na expressão de LFA-1, CR-3 e CR-4.

## **O FENÔMENO DA TOLERÂNCIA**

A tolerância imunológica é um fenômeno que o organismo se torna incapaz de responder para determinado antígeno. A auto-tolerância é a mais importante de todas pois é aquela em que o organismo aprende a não produzir uma resposta imune contra si.

Não é a estrutura de uma molécula que irá induzir o fenômeno da tolerância e sim fatores como o tempo que os linfócitos entraram em contato com os epítomos, o local de encontro, a natureza das células que apresentaram os epítomos e a produção de fatores co-estimulatórios por estas células.

A tolerância pode ser dividida em dois grupos, a saber, a tolerância central e a tolerância periférica. Entende-se por tolerância central aquela que ocorre durante a maturação das células T no timo e, das células B na medula óssea, já a tolerância periférica, é aquela que ocorre nos tecidos periféricos.

Após as células pró-T saírem da medula, elas chegam ao timo e, é aí que as células T se desenvolvem a partir de precursores em que não foi feito o rearranjo dos genes do Receptor de Célula T (TCR). Estes genes são rearranjados durante o desenvolvimento dos linfócitos tímicos, de forma que os linfócitos T possam expressar TCRs que os permita reconhecer produtos de degradação antigênica ou peptídeos quando estes são apresentados junto com a molécula de MHC. Da mesma forma como ocorre uma alta proliferação de linfócitos T no timo, também ocorre uma alta taxa de mortalidade destes, a maioria CD4+ e CD8+, tudo isso faz parte do processo de seleção dos timócitos. As células que não são destruídas, sobrevivem porque possuem algum grau de afinidade com regiões polimórficas do MHC. Os timócitos se encontram com células corticais epiteliais que lhe apresentam moléculas de MHC, se estas forem capazes de se ligar, presume-se que seja dado um sinal para que estejam protegidas da morte celular. Essa seleção positiva garante que as células T amadureçam e sejam capazes de reconhecer os peptídeos de ligação das moléculas de MHC assim se tornando tolerantes ao próprio MHC. A seleção positiva no entanto, não consegue evitar a diferenciação de células T expressando TCR de alta afinidade por peptídeos próprios e por moléculas de MHC. Deve haver algum processo de seleção negativa para estas moléculas. Um dos processos prováveis, envolve a ligação das moléculas Fas do linfócito T com a FasL expressa por algumas células presentes no timo, no entanto, este processo da interação Fas-FasL parece ocorrer com maior frequência na tolerância periférica.

Como tanto o processo de seleção positiva e negativa envolvem o reconhecimento de peptídeos próprios associados com MHC, parece que os sinais dados através do mesmo TCR leva a seleção celular de acordo com a afinidade de ligação do TCR com seu epítomo e a concentração do mesmo. Quanto mais forte for a ligação com o epítomo, será dado o sinal para a seleção negativa. A existência de vários sinais diferentes para cada processo seletivo é provavelmente a razão pela qual os co-receptores de CD8 são essenciais para a seleção positiva, mas não necessária para a seleção negativa a menos que a afinidade do TCR pelo peptídeo esteja baixa.

A seleção negativa depende de uma série de fatores, os quais incluem o desenvolvimento da célula T a acessar o antígeno self, a combinação do TCR e moléculas acessórias como a CD8 ou CD4



para o complexo peptídico que compõe o MHC próprio e a identificação e deleção das células. A seleção negativa não requer células APC, é geralmente realizada por células dendríticas do timo ou por macrófagos presentes na junção córtico medular e são ricas em MHC da classe I e II deste modo, elas podem se ligar a células T que tem alta afinidade por peptídeos próprios.

Há suspeita de que outras células também possam estar envolvidas nesse processo, inclusive se acredita que os próprios timócitos tomem parte neste processo.

Existe também um grupo de células especializadas, em inglês chamadas de “veto cells”, que expressam seus próprios epítomos e emitem um sinal negativo que mata o clone auto-reativo. Em condições fisiológicas, o sinal dado por estas células veto, ocorre quando uma célula T que expressa o TCR para o epítomo próprio se liga a célula veto que expressa os epítomos próprios. Para que o efeito da célula veto ocorra o TCR deve se ligar ao epítomo próprio que está associado com o MHC de classe I presente na célula veto, enquanto o CD8 da célula veto se liga ao MHC de classe I presente na célula T deste modo, assim que essa ligação ocorre a célula T é morta.

As células T que escapam do processo de tolerância central, ainda podem sofrer o processo de seleção periférica, neste caso, existem pelo menos três tipos de processos conhecidos, são eles:

1. Deleção clonal pela indução a morte celular
2. Anergia clonal
3. Supressão periférica por células T

No processo de deleção clonal pela ativação da morte celular, um dos prováveis fatores para este, parece ser o da ligação das moléculas Fas-FasL. Sabe-se que várias células além dos linfócitos expressam o Fas (CD95), que é um membro da família de receptores do TCR, o ligante do Fas, é a molécula FasL, que homóloga ao TNF, este é expresso por células T ativadas. A partir do momento em que uma célula T expressando o Fas se liga a célula T com o FasL, é dado um sinal para que a célula T com o Fas entre em apoptose, eliminando-se assim a célula T autoreativa. Ao que parece devem ocorrer outras interações entre outros receptores para que haja a indução da apoptose da célula auto reativa, alguns autores falam que o estímulo repetitivo das células T auto reativas com o antígeno próprio, levaria estas células T a ficarem no estado ativo e assim expressarem mais Fas, o que as levaria mais facilmente a reagirem com a célula T expressando o FasL. Sabe-se até o momento, que ratos que não expressam células com o FasL, sofrem de uma doença auto imune semelhante ao Lupus Eritematoso Sistêmico (SLE), só que com uma intensa linfoproliferação.

O processo de Anergia Clonal, envolve a inativação prolongada ou irreversível dos linfócitos T, esta indução ocorre sob certas circunstâncias. Como sabemos, as células T se tornam ativas a um determinado antígeno quando estas são apresentadas a ela via MHC e há a presença do sinal co-estimulatório como a ligação do CD28 da célula T ao B7 da célula apresentadora de antígeno. Se a célula apresentadora de antígeno não é capaz ou, se ela não expressa B7, a célula T então se tornará anérgica a este antígeno. Posteriormente, mesmo que a célula anérgica a determinado antígeno, venha

a sofrer a apresentação de um antígeno para o qual ela é anérgica por uma APC profissional, expressando B7, ela continuará anérgica.

Na supressão periférica por células T, esta parece ocorrer por ação de células  $T_{H2}$  liberando algumas citocinas em cima de uma determinada célula  $T_{H1}$  auto reativa, pois ao que parece os auto antígenos, são capazes de fazer as células  $T_{H2}$  expressarem um resposta seletiva de supressão a favor do próprio.

### **Tolerância das células B aos antígenos próprios**

Quando se fala de tolerância das células B a nível de medula óssea, parece que o processo de seleção é parecido com aquele que ocorre com as células T no timo, ou seja, quando as células B que estão em desenvolvimento encontram um antígeno de membrana e se ligam a este ainda na medula, elas entram em apoptose, mas isso não evita que saiam células B auto reativas da medula pois é possível encontrar células B com receptores para colágeno, tireoglobulina e DNA no sangue periférico de algumas pessoas.

Embora a tolerância das células B possa ser comandada pelas células T, em determinadas ocasiões as células B podem se tornar tolerantes sem esta interferência. Um exemplo são alguns microrganismos que apresentam reação cruzada com epítomos reativos das células T e apresentam epítomos que são capazes de estimular células B. Tais antígenos são capazes de provocar um forte estímulo na produção de anticorpos a antígenos próprios. Além disso os receptores de imunoglobulinas em células B maduras estimuladas podem sofrer hipermutação e por isso podem se tornar anti-self reativas num estágio tardio.

A tolerância deve ser imposta as células B durante o seu desenvolvimento e após o estímulo antigênico nos tecidos linfóides secundários, e ao que parece, é aí que as células B que reagem com antígenos próprios são excluídas.

As células B também podem sofrer o processo de anergia clonal, neste caso, parece que se elas encontram um determinado antígeno e não encontram a célula T específica para fazer a apresentação do mesmo, o complexo antígeno-receptor é suprimido e a partir daí esta célula B nunca mais irá expressar a imunoglobulina de superfície para este antígeno assim como nunca mais será estimulada pela célula T para que produza imunoglobulinas para este antígeno que ela foi inibida.

As células B também podem se tornar anérgicas quando expostas a grandes quantidades de antígenos monoméricos solúveis. Parece que a supressão ocorre quando o antígeno se liga a IgM presente na membrana do linfócito B. Esse mecanismo provavelmente não tem a participação das células T supressoras ou de células B anti idiotípicas.

As células B anérgicas podem voltar a responder desde que sofram o estímulo pelas células  $T_H$ , este estímulo é realizado via CD40 (presente nas células B) com os receptores presentes nas células T e também por receptores de IgD. Por outro lado a expressão das moléculas B7 na célula B é prejudicada, este defeito pode ser superado se as células B sofrerem o estímulo por citocinas como a IL-4 e/ou ativadores policlonais como os lipopolissacarídeos.

Baixas concentrações de antígeno também pode levar a tolerância, basta que estes entrem em contato com células B imaturas, o que leva ao processo de aborto clonal.

Outro processo que pode levar as células B a se tornarem tolerantes é o que se chama de **exaustão clonal**, neste caso o imunógeno é capaz de ativar todos os clones de linfócitos B existentes para ele. Isto leva a maturação dos linfócitos B e a produção de anticorpos para o antígeno em questão, o que acaba levando, depois de um determinado tempo, a exaustão das células B, o que enfraquece a resposta imune para este antígeno.

## **REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE**

Chamamos de reações de hipersensibilidade aquelas que ocorrem de forma exagerada ou de forma inapropriada. São reações oriundas de uma resposta normal, mas que em algum momento se processam de forma indevida e algumas vezes promove um processo inflamatório ou causa lesão tecidual. Estas reações não aparecem no primeiro contato do indivíduo com o antígeno, mas sempre num contato posterior.

Gell e Coombs descreveram quatro tipos de reações de hipersensibilidade, assim classificadas como I, II, III e IV, mas na verdade algumas das vezes temos a manifestação de mais de um tipo de reação de hipersensibilidade em conjunto. As três primeiras reações são reações dependentes de anticorpos e a última é mediada pelas células T e macrófagos.

A reação do tipo I ocorre quando a IgE é produzida e normalmente se dirige a antígenos inócuos como pólen, ácaros e pelo de animais. A liberação de mediadores farmacológicos por parte de mastócitos sensibilizados produz uma reação inflamatória aguda com sintomas como asma e rinite.

A reação do Tipo II, ou reação citotóxica dependente de anticorpo ocorre quando o anticorpo se liga a um antígeno próprio ou estranho presente nas células e leva a fagocitose deste, via atividade matadora das células ou via lise mediada pelo complemento.

A reação do Tipo III ocorre quando há a formação de imunocomplexos em grande quantidade e que não conseguem ser eliminados pelas células do sistema retículo endotelial, levando a reações como a doença do soro.

Por fim, a reação do tipo IV, também chamada de hipersensibilidade tardia, ocorre quando antígenos, como o bacilo da tuberculose, são capturados por macrófagos e não conseguem ser destruídos. Neste processo há o estímulo de células T que passam a liberar citocinas as quais mediam as respostas inflamatórias.

### **Hipersensibilidade do Tipo I**

É caracterizada como uma reação alérgica que ocorre imediatamente após o contato com o antígeno ou alérgeno. Seus sintomas clínicos foram descritos em 1923 por Coca e Cooke, os quais incluíam asma, eczema, febre, urticária e alergia a comida. Geralmente ela ocorre em pessoas que apresentam algum histórico familiar de alergia também.

As reações do Tipo I, são dependentes de IgE ligadas a mastócitos ou basófilos, pois a partir do momento em que a IgE se liga ao antígeno, ela sensibiliza os mastócitos a degranularem, desta forma levando ao processo inflamatório. Ao que parece, quando os mastócitos são ativados há a liberação de citocinas como a IL-3, IL-4, que atuam nos mastócitos, outras capazes de ativar os linfócitos B a produzirem e secretarem IgE; IL-5, IL-8 e IL-9, que parecem ativar a quimiotaxia e ativação de células inflamatórias ao sítio de inflamação.

A produção da IgE depende da apresentação do antígeno por uma APC e da cooperação entre células B e T<sub>H2</sub>. Assim que a IgE é produzida ela cai na circulação e se liga a receptores específicos para ela, presentes em basófilos e mastócitos. Aliás está é uma característica da IgE, ela se liga a mastócitos e basófilos via o receptor de Fc presente nestas células. Apesar de a IgE durar alguns dias, os mastócitos e basófilos permanecem sensibilizados para a IgE por meses, isto devido a alta afinidade que a IgE apresenta para o receptor FcεRI, o qual evita que a IgE seja destruída por proteases séricas. Só como curiosidade, as células também apresentam um receptor de Fc, denominado de FcεRII, só que este tem baixa afinidade pela IgE.

Em manifestações alérgicas e infecções parasitárias, os níveis de IgE estão sempre elevados, mas as reações alérgicas não se manifestam apenas pela elevação sérica da IgE. Sabe-se que a produção de IgE depende da coordenação das células T<sub>H2</sub>, pois ela libera citocinas como a IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que ativam a célula B a fazer a troca de classe de imunoglobulina e assim passar a produzir IgE. A IL-5 liberada também é capaz de promover o aumento do número de eosinófilos, levando a eosinofilia tão característica nos processos alérgicos.

Os mastócitos que são as células envolvidas neste processo, são classificados em dois tipos, os mastócitos do tecido conectivo (CTMC) e os mastócitos das mucosas (MMC), cada uma delas apresenta características morfológicas próprias assim como proteases características, que não serão descritas aqui por não ser de nosso interesse.

Existem outras células que podem se ligar a IgE e com isso ter sua ação citotóxica aumentada no combate a parasitos como os schistosomas. Estas células podem ser sensibilizadas por complexos imunes circulantes e com isso contribuir no processo alérgico já que elas contém uma variedade de mediadores inflamatórios capazes de promover a reação alérgica. Estas células podem ser o próprio linfócito B, células T, macrófagos, células de Langerhan e células foliculares dendríticas as quais, se ligam a IgE via o receptor FcεRIIb.

A degranulação dos mastócitos e basófilos ocorre a partir do momento em que as moléculas de IgE se ligam ao antígeno e promovem a agregação dos receptores de Fcε, isto promove o aumento da entrada de íons Ca<sup>++</sup> dentro da célula, resultando na degranulação. Esta degranulação também pode ocorrer se houver a ligação cruzada de lectinas (como a concavalina A), com a região Fc da IgE, desta forma agregando os receptores Fcε. Isto explica porque algumas pessoas tem urticária quando entram em contato com algumas plantas, pois pode ser que estas tenham grande quantidade de lectinas.

Devemos ressaltar que existem outras substâncias capazes de fazer os mastócitos e basófilos degranularem como os fatores C3a e C5a do complemento, drogas como o ACTH sintético, codeína, morfina e ionóforos de cálcio (por facilitarem a entrada de  $Ca^{++}$  na célula).

O influxo de cálcio nos mastócitos induzido pelo antígeno tem dois efeitos principais, um é que ocorre a exocitose do conteúdo dos grânulos com a liberação de mediadores pré formados, sendo que a histamina é o mais conhecido, outro é que ocorre a indução da síntese de novos mediadores formados a partir do ácido araquidônico, levando a produção de prostaglandinas e leucotrienos, os quais tem efeito direto nos tecidos locais. Nos pulmões eles levam a broncoconstrição, edema de mucosas e hipersecreção, levando a asma.

Atualmente é dito que existem diferentes populações de mastócitos produzindo diferentes tipos de mediadores. Como prova disto, citamos os anti-histamínicos, que são eficazes nas rinites e urticárias, mas não são eficientes na asma, onde os leucócitos tem um papel mais importante.

Algumas drogas podem bloquear a liberação de mediadores, seja pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc, como a isoprenalina que estimula os receptores  $\beta$  adrenérgicos, ou por evitar a quebra do AMPc pela fosfodiesterase como age a teofilina. O modo de ação do cromoglicato de sódio prevenindo os mastócitos de degranularem ainda não está esclarecido mas parece envolver o mecanismo de entrada de cálcio na célula, e também parece afetar a liberação de mediadores por outras células.

### **Diagnóstico *in vitro***

Os métodos de diagnóstico para a hipersensibilidade do Tipo I empregados nas análises clínicas não são muitos, em geral eles são analisados em conjunto com testes *in vivo* realizados no paciente. Como nosso objetivo é o estudo laboratorial, descreveremos de forma breve, os testes *in vitro*.

### **Dosagem da IgE sérica total**

Em geral na hipersensibilidade do tipo I, a IgE sérica está aumentada em pacientes que apresentam alergia a inalantes no entanto a quantidade de IgE sérica depende de fatores como idade, sexo, fumo, histórico familiar e presença de processos infecciosos como parasitoses. A IgE sérica é expressa em Unidades Internacionais (UI), cada UI equivale a 2,4 nanogramas de IgE, sendo que os valores de referência se baseiam na observação populacional, portanto não há uma normatização dos mesmos. A tabela abaixo, mostra os níveis séricos de IgE observados em pessoas normais de acordo com a idade.

| IDADE | VARIAÇÃO (UI/ml) | MÉDIA GEOMÉTRICA (+/- 2DP/UI/ml) Desvio Padrão |
|-------|------------------|--|
| 0 dia | <0,1 - 0,5       | 0,22 (0,04 – 1,28)                             |

|              |             |                                      |
|--------------|-------------|--------------------------------------|
| 6 semanas    | <0,1 – 2,8  | 0,69 (0,08 – 6,12)                   |
| 3 meses      | 0,3 – 3,1   | 0,82 (0,18 – 3,76)                   |
| 6 meses      | 0,9 – 28,0  | 2,68 (0,44 – 16,26)                  |
| 9 meses      | 0,7 – 8,1   | 2,36 (0,76 – 7,31)                   |
| 1 ano        | 1,1 – 10,2  | 3,49 (0,80 – 15,22)                  |
| 2 anos       | 1,1 – 49,0  | 3,03 (0,31 – 29,48)                  |
| 3 anos       | 0,5 – 7,7   | 1,80 (0,19 – 16,86)                  |
| 4 anos       | 2,4 – 34,8  | 8,58 (1,07 – 68,86)                  |
| 7 anos       | 1,6 – 60,0  | 12,89 (1,03 – 161,32)                |
| 10 anos      | 0,3 – 215,0 | 23,66 (0,98 – 570,61)                |
| 14 anos      | 1,9 – 159,0 | 20,07 (2,06 – 195,18)                |
| 18 – 83 anos | 1,0 – 178,0 | 21,20 (valores normais 10 –20 UI/ml) |

Em geral os testes para a dosagem total de IgE no soro são baseados na metodologia de ELISA, mas também dispomos da metodologia de quimioluminescência só que a sua popularização só será possível quando estiver a preços mais acessíveis. O princípio básico da maioria dos testes compreende o uso de um anticorpo específico para IgE fixado em um suporte onde é colocado o soro do paciente e feita a incubação. Posteriormente, é feita a lavagem do suporte para que os anticorpos não ligados sejam removidos, e em seguida é adicionado um outro anticorpo específico para IgE marcado que se ligará a outra porção da IgE. De acordo com a reação que é feita a leitura é realizada em um aparelho apropriado que lançara os resultados em UI/ml.

#### **Testes sorológicos específicos para dosagem de IgE**

Ultimamente dispomos de vários testes para dosagem de IgEs específicas no soro, todos tem quase o mesmo princípio que é de fixar uma porção do antígeno purificado a um suporte. Posteriormente o soro do paciente é colocado em contato com este antígeno para que ocorra a ligação antígeno anticorpo. Toda IgE que não for específica para o antígeno não se ligara, e logo na etapa seguinte, que é a de lavagem, será desprezada. Posteriormente, é acrescentado o conjugado, que é um anticorpo específico para IgE ligado a alguma substância reveladora ou passível de revelação como a peroxidase, Iodo 125 ou substâncias derivadas do luminol. O conjugado então se liga ao complexo antígeno anticorpo formado, se ligando apenas às IgEs, todo o excesso que não se ligar é removido com uma lavagem posterior.

Dos testes disponíveis temos os de Radioimunoensaio, que já estão caindo em desuso devido aos problemas que os materiais radioativos apresentam, o teste de ELISA e suas variações e os testes de Quimioluminescência.

Todos estes testes apresentam boa sensibilidade, no entanto o que apresenta maior sensibilidade e permite quantificar a IgE com maior exatidão é o teste que emprega a quimioluminescência.

## **REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE TIPO II**

As reações do tipo II são mediadas por anticorpos da classe IgG e IgM que se ligam a células ou tecidos específicos com isso, o dano causado se restringe as células adjacentes ao antígeno. As reações do tipo II diferem do tipo III porque, nesta última a reação ocorre com antígenos solúveis presentes no plasma, formando imunocomplexos que acabam por se depositar de modo não específico em determinados tecidos e órgãos.

Os mecanismos pelos quais a reação do tipo II ocorre, se dá inicialmente pela ligação do anticorpo a célula alvo, desencadeando a ativação da via clássica do complemento, com isso, os fragmentos C3a e C5a do complemento atraem macrófagos e polimorfonucleares ao local, assim como estimula mastócitos e basófilos a liberar substâncias que irão atrair mais células ao sítio de reação. A via clássica do complemento também promove a deposição de C3b, C3bi e C3d na membrana da célula alvo, facilitando assim sua fagocitose ou destruição por células matadoras. Ainda com relação a via clássica do complemento, pode se observar a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) que leva a lise da célula alvo.

As células que participam deste processo são macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células K (Killer), que se ligam ao anticorpo complexado com a célula alvo, via o receptor de Fc ou via os fatores C3b, C3bi e C3d do complemento depositados na membrana da célula alvo. A ligação do anticorpo via receptor de Fc, estimula as células fagocitárias a produzirem mais leucotrienos e prostaglandinas, que terminam por aumentar a resposta inflamatória. Quininas e moléculas quimiotáticas como o C5a, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e peptídeos da fibrina também contribuem nesse processo de quimiotaxia.

Diferentes classes de anticorpos produzem graus variáveis na capacidade de induzir esta reação, dependendo da afinidade com que se liga a C1q ou com a capacidade de se ligar ao receptor de Fc das células participantes da reação. Componentes do complemento ou IgG agem como opsoninas ao se ligarem ao antígeno, com isso as células fagocitárias fagocitam com maior facilidade. As opsoninas, além de aumentar a atividade fagocitária, potencializar a capacidade dos fagócitos de produzir intermediários do oxigênio reativo, também promovem o aumento da capacidade de destruição do patógeno assim aumentando o dano imunopatológico. Isso pode ser observado nos neutrófilos do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, onde a capacidade deles produzirem superóxido é maior do que a dos neutrófilos encontrados na circulação. É suposto que isso ocorra devido a ativação dos neutrófilos presentes na junta por mediadores como os complexos imunes e fragmentos do complemento.

Os mecanismos pelos quais as células efectoras destroem a célula alvo na reação do tipo II é idêntico ao que acontece na destruição de microrganismos só que, como a célula não consegue fagocitar algo maior que ela, os neutrófilos fazem a exocitose de seu conteúdo lisosomal, deste modo lesando a célula alvo e as células adjacentes. Em algumas reações como a que acontece com os eosinófilos ao reagir com os Schistosomas, a exocitose do conteúdo dos grânulos é benéfica, mas quando o alvo é o tecido do hospedeiro que foi sensibilizado com anticorpos o dano tecidual é inevitável.

As células K também podem se ligar a células recobertas com anticorpo via receptor de Fc, a partir daí elas degranulam citotoxinas capazes de destruir vários tipos de células, o mecanismo pelo qual elas atuam parece ser idêntico ao das células T citotóxicas. No entanto a maior ou menor atividade da célula K parece depender da quantidade de antígeno expresso na superfície da célula alvo.

### **Algumas formas de expressão da reação de Hipersensibilidade do Tipo II**

#### **Reação contra hemácias e plaquetas**

Estas reações são as mais comuns de serem observadas, elas podem ocorrer em circunstâncias como, a transfusão sanguínea incompatível, onde a pessoa que recebe as hemácias é sensibilizada pelos antígenos presentes na superfície desta; na Doença Hemolítica do Recém Nascido, é outra das formas de expressão deste tipo de hipersensibilidade, onde a mulher grávida é sensibilizada pelas hemácias fetais; e também nas Anemias Hemolíticas Autoimunes onde o indivíduo é sensibilizado pelos próprios eritrócitos.

Com relação as plaquetas, ela aparece no Lupus Eritematoso Sistêmico, onde elas promovem a trombocitopenia e reações com neutrófilos e linfócitos.

#### **Reações Transfusionais**

Estas reações ocorrem quando o receptor possui anticorpos para as hemácias do doador. São conhecidos mais de 20 grupos sanguíneos, o que gera mais de 200 variantes genéticas. Cada grupo sanguíneo consiste de um locus no gene que é capaz de expressar um antígeno na membrana da hemácias a algumas células do sangue. Em cada sistema existem dois ou mais fenótipos. No sistema ABO encontramos 4 fenótipos, A, AB, B e O o que corresponde aos 4 grupos sanguíneos. Uma pessoa com determinado grupo sanguíneo é capaz de reconhecer eritrócitos não próprios e por isso é capaz de montar anticorpos para estas hemácias com antígenos alogênicos. Os grupos A, B, AB, O e Rh são fortes imunógenos, seus epítomos aparecem em vários tipos celulares e estão localizados em unidades de carboidrato de glicoproteínas. A maioria das pessoas desenvolve anticorpos para os grupos alogênicos sem que tenham tido contato com hemácias não próprias, isto porque uma série de microrganismos expressa antígenos parecidos com os do grupo ABO.

Já o sistema Rhesus é de extrema importância pois ele é a principal causa da Doença Hemolítica do Recém Nascido. Os antígenos Rhesus são proteínas lipídio dependentes distribuídas na superfície celular.



Existem outros grupos sanguíneos mais raros como os epítomos do sistema MN, que são expressos na porção N-terminal glicosilada da glicoforina A que é uma glicoproteína presente na membrana da hemácia. A antigenicidade é determinada pelos aminoácidos 1 e 5. Associado ao sistema MN temos também os antígenos Ss, que são expressos pela glicoforina B. De modo geral pode-se dizer que as reações transfusionais causadas por estes grupos menores são mais raras, a menos que, o receptor seja submetido a transfusões repetidas com estes grupos.

A forma mais simples de se saber se o sangue de uma pessoa é compatível ou não com outro, é a reação de prova cruzada, nesta reação misturamos o sangue do doador com o do receptor, se houver a presença de anticorpos para o sistema ABO alogênico será possível observar a aglutinação de hemácias. Deve-se tomar cuidado com os grupos sanguíneos menos comuns e mais fracos pois estes causam aglutinação mais branda, só perceptível com o auxílio de um microscópio ou por vezes só detectável com o Teste de Coombs. Se uma pessoa é transfusionada com o sangue total, faz-se necessário verificar se o soro do paciente não apresenta anticorpos para o sangue do receptor.

A transfusão com sangue incompatível leva a uma reação imediata com sintomas clínicos como febre, hipotensão, náusea, vômito e dor abdominal. A gravidade da reação depende da quantidade de hemácias administrada.

Os anticorpos para o sistema ABO são geralmente da classe IgM, mas também temos a participação da IgG onde, as células sensibilizadas com esta classe são destruídas pelas células fagocitárias do fígado e baço, não podemos esquecer que também há a participação do sistema complemento. A destruição das hemácias pode levar ao choque circulatório e a necrose tubular aguda do fígado.

A reação hiperaguda de órgãos transplantados, é outra que se deve a formação de anticorpos para o órgão doado, ela é observada em tecidos que são revascularizados logo após o transplante, como no caso de transplante de fígado. As reações mais severas que ocorrem na rejeição de transplante se devem aos antígenos do grupo ABO e/ou das moléculas do MHC expressos nas células, onde o dano tecidual é feito pelo sistema complemento nas veias sanguíneas e também devido ao recrutamento e ativação de neutrófilos e plaquetas.

### **Doença Hemolítica do Recém Nascido**

Esta doença ocorre devido a formação de anticorpos maternos, da classe IgG, que reagem com as hemácias do feto. Estes anticorpos, são produzidos na primeira vez no momento do parto que uma mãe Rh-, tem um filho Rh+. Por esse motivo o primeiro filho não apresenta a Doença Hemolítica, pois a mãe só é sensibilizada no momento do parto. Na Segunda vez que esta mãe tiver uma criança Rh+, os anticorpos IgG para as hemácias Rh+, atravessarão a placenta e reagirão com as hemácias fetais assim, as levando a destruição. O antígeno mais comumente envolvido nesta doença é o Rhesus D (RhD), mas ele também pode envolver o sistema Kell (antígeno K) aliás, as reações mais comuns hoje em dia se devem ao antígeno K pois este é o menos lembrado, pois ao se falar em Rh sempre se pensa no antígeno D que é o mais comum.

## **Anemias Hemolíticas Autoimunes**

Este tipo de doença parece ocorrer espontaneamente com a pessoa produzindo anticorpos contra si mesma. Pode-se suspeitar de uma anemia hemolítica autoimune se obtivermos resultado positivo para o teste indireto para antiglobulinas., este teste identifica anticorpos presentes para as hemácias do paciente. O teste indireto para antiglobulinas pode ser usado para detecção de anticorpos para as hemácias em transfusões sanguíneas erradas e também no diagnóstico da Doença Hemolítica do Recém Nascido.

As doenças Hemolíticas Autoimunes podem se divididas em três tipos, dependendo da forma como elas se apresentam. Elas podem ser devido a presença de anticorpos autoreativos que reagem com as hemácias acima de 37°C, pode ser devido a reação de anticorpos capazes de reagir com as hemácias abaixo dos 37°C ou ainda, pode ser devido a reação de anticorpos para drogas fixadas na membrana das hemácias.

### **Reações com autoanticorpos reativos a quente (37°C ou mais)**

Esse tipo de reação normalmente ocorre com anticorpos formados para o sistema Rh. Eles são diferentes dos anticorpos formados para as transfusões incompatíveis pois são formados para epítomos diferentes. É claro que existem anticorpos reativos a quente para outro grupo de hemácias, mas eles são muito raros. A maioria das anemias hemolíticas tem causa desconhecida, mas algumas são associadas com outras doenças autoimunes. Este tipo de anemia parece ocorrer como o resultado de uma limpeza dos eritrócitos sensibilizados por macrófagos do baço.

### **Reações com anticorpos reativos a frio (37°C ou menos)**

Os anticorpos responsáveis por este tipo de reação normalmente estão presentes em maior quantidade que os anticorpos reativos à quente. Eles geralmente são anticorpos da classe IgM, e por isso capazes de ativar fortemente o complemento. Em geral são anticorpos reativos para o grupo sanguíneo Ii. Estes epítomos I e i, são expressos como resultado de uma glicosilação incompleta do core polissacarídico, na verdade eles são os precursores polissacarídicos que darão origem aos epítomos do sistema ABO.

A reação dos anticorpos com as hemácias se dá na circulação periférica, principalmente no inverno, pois a temperatura das extremidades corporais geralmente fica abaixo dos 37°C. Em alguns casos pode levar a necrose periférica devido a formação de microtrombos nos capilares. A anemia severa também está relacionada com a capacidade do anticorpo fixar o complemento.

A maioria das reações deste tipo são observadas em pessoas idosas, não se sabe o motivo disto, sabe-se apenas que o número de clones de autoanticorpos é limitado. Algumas vezes ela ocorre após uma infecção por *Mycoplasma pneumoniae*, talvez porque este tipo de microrganismo induza a

formação de uma grande variedade de anticorpos. Supõe-se inclusive que devido a reação cruzada com epítomos de algumas bactérias é que essa reação possa ser desencadeada.

### **Reações à drogas ligadas às hemácias**

Este tipo de reação ocorre devido a anticorpos ligado à drogas que por sua vez estão aderidas à membrana das hemácias, ou devido a quebra do mecanismo de auto tolerância.

Drogas ou seus metabólitos podem levar a reações de hipersensibilidade contra hemácias ou plaquetas e isto parece ocorrer de diversos modos, dentre estes, destacamos a ligação da droga as células sanguíneas com a formação de anticorpos para esta droga. Isto foi observado nos casos de Trombocitopenia Purpúrica onde após a administração de Serdormida ocorria a destruição das plaquetas. A administração de drogas como Penicilinas, Quininas e Sulfonamidas pode levar ao desenvolvimento das anemias hemolíticas. Também pode ocorrer devido a formação de imunocomplexos adsorvidos na membrana de hemácias, e conseqüente dano devido ao complemento. Outra das formas de ativação da anemia hemolítica se deve a droga induzir a reação alérgica e por isso são formados anticorpos para os antígenos eritrocitários. Isso foi observado em pacientes em que se administrou  $\alpha$ -metildopa, só que esta reação cessa a partir do momento que a administração do medicamento é suspensa.

### **Reações envolvendo neutrófilos e linfócitos**

Neste caso os anticorpos formados são altamente específicos, isso é observado nos casos de Lupus Eritematoso Sistêmico, no entanto eles pouco contribuem no quadro do Lupus.

### **Anticorpos para plaquetas**

A maioria dos casos em que se observa a formação de anticorpos para plaquetas é na trombocitose purpúrica idiopática. A trombocitose purpúrica idiopática é uma doença em que a remoção das plaquetas da circulação é acelerada pelos macrófagos do baço, e a remoção se dá pela aderência aos receptores destas células.

Também costuma ocorrer a formação de anticorpos para plaquetas após as infecções por bactérias ou vírus, mas também pode estar associado com doenças autoimunes como o Lupus Eritematoso. No caso do Lupus Eritematoso, pode-se detectar anticorpos para a cardiolipina aderidos as plaquetas. Os autoanticorpos para a cardiolipina e outros fosfolipídios podem inibir a coagulação, e por isso estar em alguns casos associado com a trombose de veias e abortos recorrentes.

### **Reações contra tecidos**

Em geral esta reação ocorre em processos autoimunes, a molécula reconhecida como antígeno é alguma proteína da membrana celular. Exemplos deste tipo de reação ocorrem na Síndrome de Goodpasture, Pênfigo e na Miastenia Gravis.

Na Síndrome de Goodpasture observamos a presença de anticorpos capazes de reagir com uma glicoproteína da membrana de células basais do glomérulo. Normalmente a classe de anticorpo envolvida é a IgG e em pelo menos 50% dos pacientes com esta síndrome, há a participação de

anticorpos fixadores do complemento. O resultado desta reação leva a necrose severa e a deposição de fibrina nos glomérulos. Mas esta síndrome pode também envolver os pulmões, isto porque há a presença de antígenos nas células pulmonares que reagem cruzadamente com os anticorpos para as células dos glomérulos.

No Pênfigo temos a produção de anticorpos para a molécula intracelular de adesão o que causa um sério comprometimento da pele e mucosas com a formação de bolhas. Os pacientes apresentam autoanticorpos para uma das proteínas do desmossoma, o que leva a formação de junções entre as células epidérmicas. Os anticorpos acabam por separar as células uma das outras levando a formação da epidermite.

Na Miastenia Gravis encontramos a fraqueza muscular ocorre devido a presença de anticorpos para os receptores da acetil colina presentes na superfície da membrana celular. A maioria dos anticorpos envolvidos nesta doença também são da classe IgG.

Nem sempre as doenças autoimunes envolvem a reação de hipersensibilidade do tipo II, por exemplo, no caso em que a diabetes é causada por uma doença autoimune, embora se detectem anticorpos da classe IgG para as células pancreáticas, a maior parte dos danos imunopatológicos são causados por células T autoreativas. Também nos casos em que detectamos anticorpos para moléculas intercelulares, se supõe que primeiro deva ter havido uma ruptura da célula para então dar origem a estes anticorpos.

## **TESTE DE COOMBS**

O Teste de Coombs é uma prova bem sensível que revela a presença de quantidades pequenas de anticorpo, sendo executada de duas modalidades: Direta e Indireta. A primeira destina-se a pesquisa de anticorpos fixados às hemácias fetais durante a gravidez e a segunda pesquisa os anticorpos que a mãe desenvolveu para o sangue da criança.

### **COOMBS DIRETO**

Essa é a melhor reação que se dispõe até o momento para que laboratórios de pequeno e médio porte possam diagnosticar a eritroblastose fetal e, é também, valiosa embora mais difícil no diagnóstico de anemias hemolíticas adquiridas. Para se realizar este teste necessita-se do soro de Coombs. No comércio podem-se encontrar soros de Coombs ativos para componentes anti gama e anti não gama.

Material necessário:

- Tubos de ensaio 75x70mm
- Solução de NaCl a 0,85%
- Soro de Coombs
- Micropipeta de 50µl
- Sangue do paciente
- Centrífuga clínica de até 3000 rpm

- Pipetas de 1,0 ml graduada em décimos

#### Método

1. Colher o sangue do paciente com anticoagulante, lava-lo 3 vezes com salina e fazer uma suspensão a 5% com a salina.
2. Tomar dois tubos, os numerando como 1 e 2, colocar neles 50µl de suspensão de hemácias a 5%.
3. Adicionar 2 gotas do soro de Coombs no tubo 1 e homogeneizar os tubos.
4. Centrifugar a 1000 rpm por 2 minutos.
5. Ler a reação rodando o tubo entre os dedos para ressuspender o botão de hemácias.

Resultado: Presença de aglutinação no tubo 1 e ausência de aglutinação no tubo 2 – Prova positiva

Caso a hemaglutinação não seja macroscopicamente visível, coloca-se uma gota da amostra sobre uma lâmina de vidro e examina-se ao microscópio. O resultado é dado conforme a intensidade da aglutinação em:

Aglutinação forte

Grandes grupos aglutinados

Pequenos grupos aglutinados

Raros grupos aglutinados

Traços – grupos de 4 a 5 hemácias aglutinadas

Observação: O tubo 2 é o controle, ele não deve apresentar aglutinação nunca.

#### **COOMBS INDIRETO**

Esta reação é usada para a detecção de anticorpos no soro do paciente.

#### Material:

- Tubos de ensaio 75x70mm
- Soro de Coombs
- Micropipeta de 50µl
- Solução salina de 0,85%
- Suspensão de glóbulos vermelhos normais O Rh positivo lavados e suspensos a 5% em salina.
- Albumina bovina a 20% em salina.

#### Técnica:

1. Separar o soro do sangue antes de completar 24 horas de colhido e colocar 50µl em cada um de dois tubos de ensaio, numerando-os como 1 e 2.
2. Acrescentar 50µl de suspensão de hemácias em cada tubo e homogeneizar.
3. Adicionar 50µl de albumina bovina 20% no tubo 2 e incubar a 37°C por 15<sup>a</sup> 20 minutos.

4. Lavar 3 vezes com salina, desprezando o sobrenadante completamente após a última centrifugação.
5. Acrescentar 50µl do soro de Coombs sobre os glóbulos lavados e misturar.
6. Esperar cerca de 10 minutos e centrifugar a 1000 rpm por 1 minuto.
7. Ressuspender, delicadamente, os glóbulos vermelhos observando a hemaglutinação.

Resultado:

A ausência de aglutinação indica a prova negativa ou ausência de anticorpos circulantes para o antígeno (hemácias).

Se houver aglutinação em qualquer um dos tubos, a prova de Coombs é positiva. Deve-se usar o maior número de hemácias com antigenicidade diferente para se identificar a especificidade do anticorpo.

Pode-se também determinar o título de anticorpos, procedendo-se diluições sucessivas tais como 1:2, 1:4, ... 1:128. Repete-se o teste com cada diluição. Considera-se o título como a maior diluição do soro, onde se verifica a hemaglutinação.

As reações falso positivas podem ser encontradas quando:

- O soro estiver contaminado com bactérias.
- A centrifugação for excessiva.
- Os reticulócitos ultrapassam a 15%. A siderofilina que acompanha os reticulócitos pode reagir com a anti-siderofilina, que pode ser encontrada no soro de Coombs.

As reações podem ser falso negativas quando:

- Usamos tubos sujos.
- Lavagem insuficiente das hemácias.
- Usamos antissoros inativos.
- Usamos antisoro contaminado com soro humano.
- Incubamos em temperatura diferente de 37°C por tempo inferior a 15 minutos.

Observação: Podemos encontrar a prova de Coombs direta negativa ou indireta positiva na incompatibilidade de grupo sanguíneo (por gestação ou transfusão). Na ausência de transfusão anterior a 2 ou 3 meses, a prova direta positiva (com a indireta positiva ou negativa) indica a presença de anticorpo dirigido para as próprias hemácias do paciente. Suspeita-se, nesse caso, a presença de crioaglutinininas.

## **PESQUISA DE ANTICORPOS IRREGULARES**

Material:

- Tubos de ensaio 75X70mm
- Micropipeta de 50µl e 100µl
- Suspensão de glóbulos vermelhos normais O Rh positivo lavados e suspensos a 5% em salina

- Solução salina 0,85%
- Solução de Poli Etileno Glicol (PEG)
- Soro de Coombs

Técnica:

1. Separar um tubo e identifica-lo.
2. Colocar no tubo 50µl do soro do paciente.
3. Colocar 50µl da suspensão de glóbulos vermelhos
4. Centrifugar por 1 minuto a 1000 rpm.
5. Ressuspender delicadamente as hemácias observando a presença de aglutinação e/ou hemólise.
6. Acrescentar 100µl de PEG no tubo e homogeneizar.
7. Incubar em banho maria a 37°C por 15 minutos.
8. Observar a presença de hemólise no sobrenadante.
9. Lavar 4 vezes com salina, decantando totalmente o sobrenadante de forma a garantir a retirada completa do PEG.
10. Adicionar 50µl do soro de Coombs no tubo.
11. Centrifugar por 1 minuto a 1000 rpm.
12. Ressuspender as hemácias delicadamente observando a presença de aglutinação e/ou hemólise.

Resultado: A presença de aglutinação e/ou hemólise no tubo em qualquer uma das fases é indicativa de reação positiva.

A ausência de hemólise e/ou aglutinação no tubo em todas as fases é indicativa de reação negativa.

Observação: O PEG é usado como forma de aumentar a sensibilidade da reação antígeno anticorpo quando se adiciona o soro de Coombs.

Esta técnica auxilia no diagnóstico da doença hemolítica autoimune, nas discrepâncias do sistema ABO, em provas cruzadas incompatíveis, no estudo da incompatibilidade entre a mãe e o feto, e nas investigações transfusionais hemolíticas.

### **REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE DO TIPO III**

A Reação de Hipersensibilidade do Tipo III é também conhecida como a Doença dos Imunocomplexos. Ela ocorre quando o complexo antígeno-anticorpo formado não é removido pelas células fagocitárias, deste modo o complexo acaba se depositando em algumas regiões do organismo, onde sofrerá ação do sistema complemento e de algumas células efectoras. O local de deposição dos imunocomplexos é em parte determinado pela localização do antígeno nos tecidos e em parte pela forma como eles se depositam.

As doenças dos imunocomplexos pode ser dividida de modo genérico em três grupos: Imunocomplexos formados devido a uma infecção persistente, imunocomplexos devido a uma doença autoimune e imunocomplexos devido a inalação de material antigênico.

No caso de uma infecção persistente os efeitos combinados de uma infecção persistente com baixa replicação antigênica e também, devido a fraca resposta dos anticorpos, leva a formação de imunocomplexos e a deposição destes nos tecidos. As doenças as quais podemos incluir neste processo são: lepra, malária, dengue hemorrágica, hepatites virais e a endocardite estafilocócica.

Nas doenças autoimunes o processo é na verdade uma complicação da doença devido a produção contínua de anticorpos para antígenos próprios. Conforme o número de imunocomplexos no sangue vai aumentando, os sistemas responsáveis pela remoção destes (monócitos, eritrócitos e via do complemento), ficam sobrecarregados e os complexos vão se depositando nos tecidos. As doenças em que observamos isto ocorrer com maior frequência são na artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e poliomiosite.

Com relação a inalação de material antigênico, os imunocomplexos são formados na superfície corporal logo após a exposição ao antígeno. Tais reações são mais observadas nos pulmões após exposições repetidas ao antígeno. Em geral os antígenos são fungos, pólen e outros materiais oriundos de plantas e materiais animais. Os exemplos típicos descritos na literatura são o da Doença do Feno ou Doença Pulmonar do Fazendeiro e a Doença Pulmonar dos Criadores de Pombos. Nestas doenças encontramos a presença de anticorpos circulantes para actinomicetos ou anticorpos para antígenos do pombo. Em ambas as doenças encontramos o quadro de alveolite alérgica e ela, geralmente ocorre após repetidas exposições ao antígeno. Nesse caso o anticorpo envolvido é da classe IgG e não da IgE como ocorre na reação do tipo I. Neste caso quando o antígeno entra no organismo por inalação ocorre a formação de imunocomplexos locais nos alvéolos levando ao processo inflamatório e fibrose. A precipitação dos anticorpos para actinomicetos é encontrada em 90% dos pacientes com a Doença Pulmonar dos Fazendeiros. No entanto ela também é observada em algumas pessoas sem a doença e que não apresentam a sintomatologia típica, o que sugere que há o envolvimento de outros fatores tais como as Reações de Hipersensibilidade do Tipo IV.

### **Mecanismos da Reação do Tipo III**

Os imunocomplexos são capazes de dar início a uma série de processos inflamatórios, entre eles a interação com o sistema complemento, gerando fragmentos C3a e C5a, estas frações estimulam a liberação de aminas vasoativas como a histamina e 5-hidroxitriptamina, e também fatores quimiotáticos para mastócitos e basófilos, não esquecendo que C5a também apresenta esta função quimiotática. Os macrófagos também são estimulados a liberar citocinas como o TNF $\alpha$  e IL-1. Além disso, os complexos interagem diretamente com basófilos e plaquetas, via receptor de Fc, induzindo a liberação de aminas vasoativas. As aminas vasoativas liberadas pelas plaquetas, basófilos e mastócitos



promovem a retração das células endoteliais deste modo aumentando a permeabilidade vascular e permitindo que ocorra a deposição do complexo imune na parede dos vasos, este complexo por sua vez continua a estimular a formação de mais C3a e C5a.

As plaquetas também se agregam no colágeno da membrana basal ajudado pela interação da região Fc do complexo imune depositado, formando assim microtrombos. As plaquetas agregadas continuam a produzir aminas e a estimular a produção de C3a e C5a, além disso como elas liberam fatores de crescimento celular, parece que estão envolvidas na proliferação celular.

Os polimorfonucleares também são atraídos para o sítio inflamatório por C5a, eles tem o papel de fagocitar os imunocomplexos só que não conseguem, pois os imunocomplexos estão aderidos a paredes dos vasos. Por esse motivo eles fazem a exocitose de suas enzimas. As enzimas dos polimorfonucleares, no soro, são rapidamente inativadas devido a presença de inibidores neste no entanto, quando nos tecidos as enzimas acabam por destruir o tecido adjacente ao imunocomplexo pois os inibidores quase não estão presentes.

### **A Doença do Soro**

Essa doença também é causada por complexos imunes circulantes que se depositam nas paredes dos vasos e tecidos levando a doenças inflamatórias como a glomerulonefrite e artrite. A doença do soro é na verdade uma complicação da soroterapia, onde doses maciças de anticorpos para antígenos como o veneno de ofídios e a toxina do bacilo diftérico acabam por estimular o sistema imune a montar anticorpos, que reagirão com estes que foram aplicados como parte de um tratamento. Isto porque os anticorpos usados na soroterapia são geralmente de origem animal assim, quando se aplica um soro anti-ofídico em um paciente, como este é produzido em equinos, o paciente acaba por montar anticorpos para as proteínas dos equinos.

Esta reação ocorre por excesso de antígeno, e como os imunocomplexos formados são pequenos eles levam muito tempo circulando até que sejam fagocitados pelos monócitos. A formação dos imunocomplexos é seguida de uma queda abrupta dos componentes do sistema complemento. A sintomatologia clínica da doença do soro se deve a deposição dos imunocomplexos e da fração C3 na membrana basal de pequenos vasos. Quanto maior a quantidade de anticorpos formados, mais cresce o tamanho do imunocomplexo e isso facilita a sua destruição.

Na reação de Arthus foi observado que o complemento é importante para que a reação se desenvolva, pois ele é que atrai os neutrófilos para o sítio de inflamação. O TNF $\alpha$  age aumentando a reação mediada por células, tanto assim, que se for feito o tratamento com anticorpos para TNF, verifica-se que a sintomatologia clínica da Reação de Arthus diminui.

A remoção dos imunocomplexos depende deste estar recoberto por C3b para que monócitos, principalmente do fígado e baço, façam a fagocitose. Os eritrócitos também são importantes neste processo pois eles possuem em sua membrana o receptor de C3b, o CR1, com isso eles carregam os

imunocomplexos opsonizados até o fígado e baço onde os complexos são removidos pelos macrófagos teciduais. No entanto, neste processo a maior parte do CR1 é também removida e por isso, nos casos em que há a formação contínua dos imunocomplexos, a eficiência de sua remoção é diminuída. Os imunocomplexos aderidos as hemácias também podem ser liberados na circulação devido a ação enzimática do Fator I, o qual cliva C3b ligado a membrana da hemácia em C3dg, que é um fragmento menor deste modo os imunocomplexos acabam sendo removidos por células fagocitárias que apresentam o receptor para a porção Fc dos anticorpos.

Em pacientes com baixos níveis de complemento, principalmente da via clássica, a ligação dos imunocomplexos as hemácias é pequena. Parece que a deficiência do complemento se deve ao esgotamento causado pela doença dos imunocomplexos ou por um fator hereditário como no caso da deficiência de C2. Com isso esses imunocomplexos circulantes passam pelo fígado e acabam sendo liberados, desta forma acabam se depositando em tecidos como a pele, rins e músculos, aonde eles promovem reações inflamatórias.

O tamanho dos imunocomplexos também influencia na deposição destes, em geral quanto maior ele for, mais rapidamente ele é eliminado, geralmente em minutos, enquanto que os menores podem persistir por dias. Isso se deve a capacidade dos imunocomplexos maiores fixarem melhor o complemento e por isso se ligar melhor as hemácias. Os grandes complexos são também liberados mais lentamente das hemácias pela ação do Fator I.

A classe do anticorpo também tem participação na remoção dos complexos circulantes pois anticorpos da classe IgG por se ligarem melhor as hemácias do que os da classe IgA, são liberados mais lentamente assim dificilmente estes irão se depositar em órgãos como rins, pulmões e cérebro.

Quando as células fagocitárias estão saturadas, ocorre um aumento do número de imunocomplexos circulantes e conseqüente aumento da deposição destes complexos em locais como os glomérulos renais e outros órgãos.

A deposição dos imunocomplexos em determinados tecidos parece ocorrer devido ao aumento da permeabilidade vascular, a qual se deve a ação de mastócitos, basófilos e plaquetas liberando as aminas vasoativas. Tanto isto é verdade que se for administrado um anti-histamínico em animais com a hipersensibilidade, o efeito inflamatório diminui. Mas a deposição dos imunocomplexos parece ocorrer também em locais onde a pressão sanguínea é elevada e há alta turbulência como na bifurcação de artérias e em filtros vasculares como no plexo coróide e no corpo ciliar dos olhos.

Algumas vezes os imunocomplexos se depositam em determinados órgãos como no caso do Lupus Eritematoso Sistêmico, onde a deposição ocorre nos rins, e no caso da Artrite Reumatóide em que a deposição se dá nas juntas. É provável que o complexo antigênico formado promova alguma especificidade a que órgão irá se ligar. Uma evidência deste fato é que em ratos ao se administrar uma endotoxina ocorre a liberação de DNA, o qual se liga a membrana basal dos glomérulos. Posteriormente é que ocorre a formação de anticorpos para o DNA que irá se ligar ao local em que o DNA se encontra e aí ocorre a formação do complexo imune. Também a carga do complexo formado

parece ser importante pois complexos com carga positiva parecem se depositar na membrana basal dos glomérulos que apresentam carga negativa.

### **Deteção dos imunocomplexos**

Os imunocomplexos depositados podem ser pesquisados com o auxílio da imunofluorescência dos tecidos em que a reação está ocorrendo. A pesquisa pode ser feita para a pesquisa de determinada classe de imunoglobulina ou do complemento. De acordo com o padrão de fluorescência observado pode-se dizer se o órgão está muito ou pouco comprometido. Por exemplo, em pacientes com a deposição contínua de IgG sub-epitelial como nos pacientes com glomerulonefrite o prognóstico é ruim, já nos pacientes em que os complexos estão localizados no mesângio o prognóstico é melhor. Nem todos os imunocomplexos dão origem a uma resposta inflamatória, no Lupus Eritematoso Sistêmico por exemplo, pode-se encontrar complexos depositados na pele com aparência normal.

No caso de complexos circulantes pode-se fazer a pesquisa dos complexos ligados a hemácias e dos complexos livres no plasma. Como os complexos ligados as hemácias são menos lesivos que os complexos livres circulantes, normalmente se procura pelos últimos. O problema de se dosar os complexos livres está justamente na ação que o Fator I exerce nas hemácias liberando os complexos, por isso todo cuidado deve ser tomado no momento da coleta do sangue, com a separação imediata do plasma das células sanguíneas, tudo com a finalidade de tornar o resultado o mais próximo do real possível.

A precipitação dos complexos com Polietilenoglicol (PEG) e a estimativa de quanto de IgG foi precipitado é normalmente usado para identificar as IgGs de alto peso molecular. O PEG promove a agregação dos imunocomplexos; por isso o soro do paciente ao ser centrifugado, tem os imunocomplexos precipitados. O precipitado então pode ser quantificado por técnicas como a imunodifusão radial ou nefelometria.

Os complexos circulantes também podem ser identificados pela sua afinidade pelo complemento C1q, onde C1q está fixado em um suporte sólido, onde se adiciona o soro do paciente e em seguida um conjugado para imunoglobulinas marcado para que a leitura seja feita em um aparelho.

Outros receptores também podem ser usados para se ligar aos imunocomplexos como o receptor C3 de células B tumorais (células RAJI), ou receptor Fc de plaquetas.

Deve-se tomar cuidado com a dosagem feita com pacientes suspeitos de terem doenças autoimunes pois muitas das vezes estes apresentam autoanticorpos para os componentes do sistema de teste utilizado. No Lupus Eritematoso Sistêmico por exemplo, os paciente produzem anticorpos para linfócitos e DNA, que se ligam as células RAJI, dando resultados falso positivos para a formação de imunocomplexos. Do mesmo modo anticorpos para C1q são encontrados em pacientes com Doenças do Tecido Conectivo, pois C1q tem estrutura semelhante ao do colágeno, com isso aumenta a possibilidade de se obter resultados falso positivos.

Algumas das metodologias não específicas para antígenos para a deteção de imunocomplexos circulantes são apresentados na tabela constante da página seguinte.



## **Métodos não específicos para antígenos para a detecção de imunocomplexos circulantes**

---

### **MÉTODOS BASEADOS NAS PROPRIEDADES FÍSICAS**

Técnicas dependentes do tamanho e densidade

Ultracentrifugação analítica

Centrifugação com gradiente de sacarose

Filtração em gel

Ultrafiltração

Eletroforese e eletrofocalização

Técnicas dependentes de precipitação

Precipitação com PEG

Crioprecipitação

Métodos baseados nas características biológicas

Técnicas dependentes do complemento

Teste de consumo do microcomplemento

Técnicas C1q dependentes

Precipitação em gel de C1q

Teste do desvio de C1q

Ensaio C1q-PEG (C1qBA)

Ensaio C1qSP

Técnicas C3 dependentes

Ensaio de células RAJI

Conglutinina

Ensaio de fase sólida anti C3

Técnicas Fc dependentes

Técnicas antiglobulinas

Testes RF

Ligação a proteína A do estafilococo

Técnicas celulares

Teste de agregação plaquetária

Teste de inibição da citotoxicidade celular dependente de anticorpo

Liberação de enzimas de mastócitos e eosinófilos

Ensaio de inibição de macrófagos

Testes de inibição de rosetas

Coloração intracitoplasmática de leucócitos polimorfonucleares

---

## CONGLUTINAÇÃO E IMUNOCONGLUTINAÇÃO

A conglutinação é outra reação na qual, além da formação complexo Ag-Ac é indispensável haver a fixação do complemento.

Fundamento: Hemácias sensibilizadas por hemolisina, aglutinam-se fortemente em presença de soro bovino, uma vez que, o mesmo contém uma substância protéica designada conglutinina (K), contida na fração euglobulina.

Esta fração pode ser isolada e purificada por adsorção ao Zimozam e  $Ca^{++}$  e posterior eluição pelo sequestro de  $Ca^{++}$  por EDTA (Ácido etileno diaminotetra acético). Seu peso molecular é de 75.000 e o coeficiente de sedimentação de 7,8S. É termoestável a  $56^{\circ}C$ , resistente à ação do mercaptoetanol, da neuraminidase e da papaína, mas perde sua atividade pela ação da tripsina e da pepsina.

Os complexos Ag-Ac, após à fixação do complemento, são aglutinadas por ação da conglutinina sobre o complemento fixado.

A reação de conglutinação se faz na presença de soro de cavalo que fornece C1, C4, C2 e C3, porém se este for deficiente de outros componentes, não se verifica hemólise.

### MÉTODO DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO CONGLUTINANTE

(Segundo Coombs e Cols.)

1 - Preparar diluições sucessivas do soro inativado, em que se deseja pesquisar o anticorpo.

2 - Adicionar o antígeno (estreptococos, salmonela, riquetsia, ou o que se desejar) previamente diluído, usando uma dose fixa. Normalmente usar diluições tendo a turvação correspondente ao 2º tubo de Escala de Mac Farland. Se o soro contiver o anticorpo do antígeno correspondente ao antígeno, haverá formação do complexo Ag-Ac.

3 - Adicionar o complemento de cavalo. Se as partículas antigênicas não forem sensíveis à lise, pode-se usar complemento de cobaia. Forma-se, neste caso o Complexo Ag-C.

4 - Adicionar a conglutinina (K), ou seja soro bovino que a contém. Se for usado o soro de boi, este deve ser inativado. A K é resistente à inativação.

5 - Incubar a  $37^{\circ}C$  por 30 minutos.

6 - Ler o teste e verificar se houve ou não conglutinação. Se o soro contiver anticorpos vamos ter conglutinação até determinada diluição. Esta corresponde ao título da reação.

Há um componente sérico denominado de mobilidade beta, importante para a reação que é chamado de *fator ativador de conglutinogênio* (KAF).

$AcAgC1,3b,2a,4b + KAF + K + Ca^{++}$  Conglutinação.

Tudo indica que a conglutinina desempenha um papel na resistência às infecções acelerando o processo de fagocitose.

**Observação:** Este teste tem pouca aplicabilidade na prática, visto que há uma variação enorme de reações para pesquisa de anticorpos mais eficientes.

## IMUNOCONGLUTININAS

As chamadas congulininas, são predominantemente, da classe das IgM e são encontradas em muitas espécies de animais.

Estes anticorpos reagem com C3 e C4, fixados. Formam-se por aloimunização e autoimunização, durante os processos reumáticos, infecções crônicas e doenças auto-imunes. As imunocongulininas não necessitam de  $Ca^{++}$  para que a reação ocorra. Podem ser do tipo IgM ou IgG, anti C3 e C4, mas aquelas produzidas pelos processos autoimunes continuam sob a forma IgM, mesmo após um longo período de estimulação. Pode-se estimular sua produção em animais inoculando-se bactérias combinadas com anticorpos heterólogos, os quais reagem com complemento do animal inoculado que expõem ou modificam determinantes do C3 e C4.

A titulação das imunocongulininas (IK) se faz por congulinização. As imunocongulininas possuem propriedades opsonizantes, isto é, estimuladoras de fagocitose.

## TITULAÇÃO DAS IMUNOCONGLUTININAS

1 - Preparar uma suspensão a 2% de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina (do mesmo modo que se faz na fixação do complemento).

2 - Tomar um tubo 13 x 100 mm e colocar dentro do mesmo 2 ml de hemácias sensibilizadas, 0,2 ml de soro de cavalo sem inativar e 0,2 ml de soro de cavalo inativado. O uso do soro fresco de cavalo é para se ter um excesso de C4. Temos assim a seguinte reação:



Há, no caso, excesso de C4.

3 - Em uma microplaca, fazer diluições sucessivas do soro inativado, que se quer determinar o título de congulinina. Para isto, separar uma fileira da placa, adicionar 20  $\mu$ l de solução salina a cada um de 10 orifícios, previamente, marcados. Adicionar 20  $\mu$ l do soro no primeiro orifício e diluir sucessivamente a 1:2, 1:4, ... até 1:256, desprezando os 20  $\mu$ l últimos. Separar dois orifícios para controle do sistema do item 2.

4 - Adicionar 20  $\mu$ l da mistura (item 2), nas diluições do soro até 1:256 e nos dois orifícios controles. Agitar levemente, esperar cerca de 10 minutos, centrifugar a 500 rpm, agitar levemente e ler observando até que diluição ocorrerá aglutinação.

A hemaglutinação é causada pelos anticorpos para C3 e C4, isto é, IK.

**Reação negativa:** ausência de aglutinação

**Reação positiva:** presença de aglutinação.

O título conglutinante é dado pela recíproca da maior diluição do soro em que ocorre hemaglutinação.

#### **HIPERSENSIBILIDADE TIPO IV**

De acordo com a classificação de Gell & Coombs, esta reação é aquela que leva mais de 12 horas para que se desenvolvam os sintomas clínicos, e envolvem reações mediadas por células em detrimento a reação mediada por anticorpos. Claro que esta definição é muito abrangente, pois há casos, como na reação tardia de uma resposta feita por IgE, que envolve além dos anticorpos a resposta controlada por células  $T_H$ .

Diferente das outras reações de hipersensibilidade, a reação do tipo IV não pode ser transferida de um animal para o outro via soro, mas pode ser transferida pelas células T. Ela está associada com a proteção conferida pelas células T mas nem sempre corre em paralelo com ela. Nem sempre há correlação entre a Reação de Hipersensibilidade do Tipo IV e imunidade protetora. As células T responsáveis pela reação do tipo IV foram especificamente sensibilizadas por um encontro prévio e agem recrutando outras células para o sítio da reação.

São classificados três tipos de reação de hipersensibilidade do Tipo IV, são elas, a Hipersensibilidade de contato, a Reação tuberculínica e a Reação granulomatosa. Tanto a hipersensibilidade de contato quanto a Reação tuberculínica, ocorrem num período de 48 a 72 horas ao passo que, a Reação granulomatosa ocorre num período de 21 a 28 dias em média. Na reação granulomatosa, os granulomas formados se devem a agregação e a proliferação dos macrófagos, e esta pode durar semanas.

Devemos lembrar que a reação do Tipo IV pode ocorrer junto com as outras reações de hipersensibilidade, assim como pode ser oriunda da complicação de uma delas.

#### **HIPERSENSIBILIDADE DE CONTATO**

A hipersensibilidade de contato é caracterizada por eczemas na região de contato com o produto alergênico. Substâncias irritantes para a pele agem de modo diferente do processo desencadeado na reação do tipo IV embora por vezes a reação clínica seja muito parecida.

As porções dos alergenos que desencadeiam a reação do tipo IV, chamadas de Haptenos, são substâncias tão pequenas (apresentando o peso molecular inferior a 1kDa), que por si só não são capazes de desencadear a resposta imune, ou seja não são substâncias imunogênicas. Estas substâncias tem a capacidade de penetrar na pele e se conjugar, geralmente de forma covalente, com as proteínas orgânicas.

Existem dois tipos de células principais que participam no desencadear da resposta do tipo IV, são elas as células de Langerhan e os Queratinócitos. Como a hipersensibilidade de contato é



inicialmente uma reação epidérmica, as células de Langerhan são as principais células apresentadoras de antígeno envolvidas a apresentação. As células de Langerhan apresentam os receptores CD1, o MHC de classe II e os receptores de Fc em sua membrana. Em estudos realizados *in vitro* foi demonstrado que as células de Langerhan, agem melhor como APC do que os monócitos.

Os queratinócitos expressam as moléculas de MHC de classe II e ICAM-1 em sua membrana, elas tomam parte da integridade estrutural da epiderme. Estas células podem liberar citocinas como a IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, GM-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$ , TGF $\alpha$  e TGF $\beta$ . A IL-3 liberada pode ativar as células de Langerhan, co-estimular a resposta proliferativa, recrutar mastócitos e induzir a secreção de citocinas com ação imunossupressora como a IL-10 e TGF- $\beta$ , que diminuem a resposta imune e induzem a anergia clonal em células T<sub>H1</sub>.

Os queratinócitos podem ser ativados por uma série de estímulos, incluindo-se alérgenos e substâncias irritantes. Os queratinócitos ativados produzem citocinas estimulatórias como TNF $\alpha$  e GM-CSF, os quais ativam as células de Langerhan.

### **O desencadear da Hipersensibilidade de Contato**

Para a reação de contato ocorrer é necessária uma primeira etapa de sensibilização, que leva de 10 a 14 dias, nesta etapa o hapteno absorvido combina com uma proteína e aí é fagocitado pela célula de Langerhan, a qual migrará da epiderme até a região paracortical dos linfonodos regionais. Nos linfonodos elas apresentam o hapteno em associação com o MHC de classe II aos linfócitos CD4<sup>+</sup>, dando assim origem a uma população de células T CD4<sup>+</sup> de memória.

Em uma segunda fase, ao se entrar em contato com o alérgeno de novo, este causa uma pequena diminuição do número de células de Langerhan da epiderme, as quais irão se deslocar e apresentar o antígeno na pele e linfonodos às células T CD4<sup>+</sup> de memória. As células T CD4<sup>+</sup> então passam a liberar  $\gamma$ -IFN o qual induz a expressão de ICAM-1 e moléculas de MHC de classe II na membrana de queratinócitos e células endoteliais dos capilares dérmicos. Ocorre também a ativação dos queratinócitos que liberam citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e GM-CSF. Células T CD4<sup>+</sup> sem especificidade antigênica acabam sendo atraídas pela ação das citocinas e podem se ligar aos queratinócitos via ICAM-1 e MHC de classe II. A degranulação e a liberação de citocinas por mastócitos ocorre logo após contato com o alérgeno. O TNF- $\alpha$  e a IL-1 liberados pelas células, principalmente pelos macrófagos, são potentes indutores da molécula endotelial de adesão. As citocinas liberadas produzem um sinal quimiotático para macrófagos chegarem até a junção dermo-epitelial e epiderme. Os macrófagos chegam a derme e epiderme em torno de 48 horas pós contato sendo que o pico de células presentes no local de inflamação se dá entre 48 e 72 horas. A maioria dos linfócitos presentes nesta reação são CD4<sup>+</sup> com poucos CD8<sup>+</sup>. Após o pico máximo da reação ela começa a ser suprimida pela ação de eicosanóides como a Prostaglandina E (PGE), produzida por macrófagos e queratinócitos ativados. A PGE inibe a produção de IL-1 e IL-2; ao mesmo tempo, ao que parece, a célula T se liga aos queratinócitos e assim o hapteno ligado ao MHC de classe II sofre a

degradação por enzimas celulares. A supressão é mediada por vários fatores, entre estes, destacam-se a liberação de linfocinas inibitórias evitando o espalhamento da reação; a liberação de TGF $\beta$  pelos mastócitos, queratinócitos ativados e linfócitos, inibindo e bloqueando os efeitos proliferativos das IL-1 e IL-2; a própria IL-1 liberada pelos queratinócitos, após contato deste com o alérgeno, atua inibindo o metabolismo oxidativo dos macrófagos e diminuindo a produção dos mediadores pró-inflamatórios; a IL-10 suprimindo a expressão das moléculas de classe II, a produção de citocinas e a proliferação dos linfócitos T<sub>H</sub>1 específicos. Em ratos foi observado ainda que a irradiação por raios ultra violeta, inibem a dermatite de contato, induzindo um inibidor específico da IL-1.

Foi observado que as reações a alérgenos e substâncias irritantes são parecidas, já que as duas substâncias podem lesar as células de Langerhan e, ao mesmo tempo induzir a liberação de citocinas com isso, outras células de Langerhan podem ser estimuladas a se tornarem potentes APC as quais migrarão até os linfonodos e darão início a resposta imune. A sinalização por TNF $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN e GM-CSF ocorre em pelo menos meia hora após contato com a substância alérgica ou irritante, sendo que se observa um aumento da produção de RNAm codificando GM-CSF nas primeiras duas horas pós contato. Alguns produtos químicos podem ainda induzir a expressão de ELAM-1 e VCAM-1 em torno de duas horas após contato e ainda induzir a expressão de ICAM-1 cerca de 8 horas depois. ICAM-1 é o ligante de LFA-1 que pode ser encontrado em células linfóides e mielóides, e também é importante para manter estas células na pele.

As células T de memória decorrentes do estímulo promovido pelas APC nesta reação ficam nos capilares dérmicos, e por isso o desencadear da reação, quando do segundo contato com o alérgeno, é mais eficiente na produção de sintomas clínicos.

### **REAÇÃO TUBERCULÍNICA**

Esta forma de hipersensibilidade é observada quando se inocula por via sub-cutânea um antígeno solúvel, como o bacilo da tuberculose (proteínas da bactéria morta). Na região em que foi injetado o antígeno, se observa a formação de um edema em torno de 48 horas pós inoculação. Reações semelhantes podem ser observadas quando se administra antígenos solúveis de microrganismos como *Mycobacterium leprae* e *Leishmania tropica* em pessoas sensibilizadas. Por este motivo o teste de sensibilidade cutânea é utilizado para saber se uma pessoa foi exposta previamente a um determinado antígeno. Esta forma de hipersensibilidade também pode ser induzida por antígenos que não sejam oriundos de microrganismos como o berílio e o zircônio.

A reação tuberculínica envolve vários tipos celulares, mas os monócitos são os principais participantes desta. Logo após a inoculação do antígeno, ocorre a ativação de células T específicas, que passam a secretar citocinas como o TNF $\alpha$  e TNF $\beta$  que atuam nas células endoteliais e dos vasos, as induzindo a expressar moléculas de adesão como a E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1. Estas moléculas se ligam a receptores presentes nos leucócitos, assim os recrutando para o sítio da reação. Nas primeiras 4 horas pós inoculação se observa o influxo de neutrófilos, que vão sendo aos poucos

substituídos por macrófagos e células T nas 10 horas seguintes. Este infiltrado celular vai aumentando de forma que acaba rompendo o feixe de colágeno da derme, esta reação atinge o seu pico máximo em 48 horas pós inoculação. Encontramos tanto células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, sendo que existe quase o dobro de células CD4<sup>+</sup>, também são encontradas células CD1<sup>+</sup> como as células de Langerhan e células tipo Langerhan neste infiltrado.

Os macrófagos constituem aproximadamente 80% das células presentes no infiltrado, sendo que os macrófagos e linfócitos presentes expressam o MHC de classe II o que contribui para aumentar a eficiência de macrófagos e de células apresentadoras de antígenos. Os queratinócitos presentes apresentam as moléculas HLA-DR no período compreendido entre 48 e 96 horas após o aparecimento do infiltrado linfocitário.

Provavelmente os macrófagos são as principais células apresentadoras de antígeno nesse tipo de reação, muito embora células CD1<sup>+</sup> também estejam presentes. Também a forma como as células de Langerham e outras circulam entre a derme e os linfonodos é parecida com a que ocorre na hipersensibilidade de contato.

A reação tuberculínica se resolve sozinha em cerca de 5 a 7 dias, no entanto se o antígeno persistir no local, pode haver o desenvolvimento de uma reação granulomatosa. A infiltração sub-epitelial com basófilos não é característica deste tipo de reação no entanto, ela pode ser observada em algumas reações de hipersensibilidade e testes cutâneos em que são usadas proteínas heterólogas.

## **HIPERSENSIBILIDADE GRANULOMATOSA**

Esta reação é resultante da persistência de microrganismos ou partículas as quais os macrófagos não conseguem destruir. Em determinadas situações ela também pode ser oriunda de imunocomplexos persistentes como os que aparecem nas alveolites. Este processo resulta na formação de granuloma de células epiteliais.

Histologicamente ele difere do que se observa na reação tuberculínica, no entanto ele é o resultado da sensibilização por microrganismos como o *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*. A reação granulomatosa também pode ocorrer como resultado a um corpo estranho presente no organismo, como o que ocorre nas pessoas que trabalham na indústria de amianto, desenvolvendo a formação de granulomas nos pulmões devido a inalação do pó do amianto, e também uma série de outras substâncias que os macrófagos são incapazes de digerir. Nesse caso temos o que se chama de granuloma não imunológico, pois não encontramos a presença de linfócitos nele.

As células mais importantes neste tipo de granuloma são as células epitelióides e as células gigantes. As células epitelióides são oriundas de macrófagos ativados num processo crônico em que há a liberação contínua de citocinas e TNF, que potencializam a formação do processo inflamatório. Quanto as células gigantes, elas se originam da fusão de células epitelióides, algumas vezes são classificadas como células de Langerhan gigantes, embora não tenham características comuns com

elas. Ao que parece as células gigantes podem ser oriundas de um estágio terminal de diferenciação de monócitos e/ou macrófagos.

O granuloma oriundo de uma ativação imune tem a participação de células epitelióides e macrófagos na região central, sendo que, algumas vezes tem a participação de células gigantes. Em doenças como a tuberculose a área central do granuloma pode ser uma zona de necrose, com a destruição completa das estruturas celulares. A região central de macrófagos e células epitelióides é circundada por uma camada de linfócitos, onde ocorre a deposição de fibras de colágeno levando a formação de uma considerável zona de fibrose, ocasionada pela proliferação de fibroblastos e aumento da síntese de colágeno. Como exemplo de reação granulomatosa temos a reação de Mitsuda observada contra os antígenos do *M. leprae*.

### **As Reações Celulares**

Em experimentos executados em ratos foi demonstrado que células T expressando o TCR $\alpha\beta$  são as que desencadeiam a resposta imune frente a infecção bacteriana. As células T sensibilizadas com o antígeno apropriado e por células apresentadoras de antígeno, entram num processo de transformação linfoblastóide, onde ocorre o aumento da síntese de DNA, antes de entrar em divisão. Após as células T serem estimuladas por células APC, elas liberam uma série de citocinas capazes de atrair e ativar macrófagos, dentre as citocinas, temos o  $\gamma$ -IFN, linfotoxina, IL-3 e GM-CSF. Numa infecção por bactérias, temos os macrófagos liberando IL-12 fazendo com que os linfócitos T aumentem a liberação das citocinas que já estão sendo liberadas. Essa IL-12 é capaz de estimular a população de linfócitos T<sub>H1</sub> e suprimir a de linfócitos T<sub>H2</sub>. As reações granulomatosas podem ser ativadas ainda pela liberação de TNF oriundo dos macrófagos, que acabam sendo a fonte de auto ampliação da reação, com a transformação dos macrófagos em células epitelióides, e nos casos em que o antígeno não pode ser destruído as células vão se fusionando, dando origem as células gigantes que envolvem o antígeno.

As reações do tipo IV também podem envolver os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os quais lesam as células mais pela sua ação citotóxica. Como exemplo temos a ação do pentadecatecol, que é uma substância solúvel em lipídeos, e pode atravessar a membrana celular e assim modificar as proteínas intracelulares. Estas proteínas modificadas dão origem a peptídeos modificados no citossol, os quais são translocados pelo retículo endoplasmático e chegam a superfície celular através do MHC de classe I. Estas moléculas são então reconhecidas pelas células T CD8<sup>+</sup> as quais matam a célula modificada fazendo a exocitose de enzimas como a perforina. Também as células CD8 liberam  $\gamma$ -IFN que ajuda na formação da hipersensibilidade tardia.

### **Algumas situações em que observamos a Reação do Tipo IV**

Existem várias doenças em que observamos isto, a maioria se deve a agentes infecciosos como micobactérias, protozoários e fungos, embora isso também seja observado em doenças como a

Sarcoidose onde não há um agente infeccioso estabelecido para tal. As doenças mais comuns em que esta reação se apresenta são: Lepra, Tuberculose, Esquistossomose, Sarcoidose, Doença de Crohn. Há uma situação que não é doença, mas incomoda bastante as pessoas que é a picada de insetos, inicialmente a reação que ocorre pode ser do tipo I, por ser mediada por IgE, mas a evolução da resposta imune leva a uma reação de hipersensibilidade tardia com a formação de granuloma como o observado na reação tuberculínica.

Uma característica comum nestas infecções é que o agente infeccioso é persistente e promove o estímulo antigênico crônico. A ativação dos macrófagos pelos linfócitos pode limitar a infecção só que, o estímulo contínuo leva a destruição tecidual devido a liberação de produtos oriundos dos macrófagos como o oxigênio reativo e intermediários das hidrolases. Embora a reação de hipersensibilidade seja induzida pelos linfócitos T ativados, nem sempre a reação é controlada, de forma que a imunidade protetora e a reação de hipersensibilidade tardia nem sempre acontecem ao mesmo tempo. Por este motivo é que algumas pessoas que tem hipersensibilidade tardia não apresentam proteção ao mesmo antígeno que as levou a desenvolver esta hipersensibilidade.

Um dos exemplos que podemos citar é a lepra. A lepra é dividida em 3 tipos, tuberculoíde, intermediária e lepromatosa. Na lepra tuberculoíde a pele apresenta pequenas áreas hipopigmentadas que tem um intenso infiltrado de leucócitos e células epitelióides, mas sem a presença do bacilo, já na lepra lepromatosa se observam múltiplas lesões confluentes que apresentam numerosos bacilos, macrófagos e alguns linfócitos. Já a lepra intermediária, como o próprio nome diz, apresenta características tanto da lepra tuberculoíde quanto da lepromatosa. Na lepra tuberculoíde a imunidade protetora está normalmente associada com a imunidade mediada por células, só que esta vai declinando a medida que a doença caminha para o quadro lepromatoso, com a produção de anticorpos não protetores para o *M. leprae*.

Na lepra intermediária a reação se apresenta com o quadro típico de hipersensibilidade do tipo IV, sendo que nela as lesões hipopigmentadas de pele contendo o bacilo, se tornam inchadas e inflamadas, porque o organismo é incapaz de montar a reação de hipersensibilidade tardia. Nestas lesões observa-se o infiltrado de linfócitos secretando  $\gamma$ -IFN. Esse processo ocorre nos nervos periféricos, onde as células de Schwann contém o *M. leprae*; o que é a causa mais importante da destruição nervosa nesta doença.

Outro exemplo, é a tuberculose, nela observa-se um balanço entre os efeitos dos macrófagos ativados controlando a infecção e/ou causando danos teciduais nos órgãos infectados. Nos pulmões a reação granulomatosa leva a formação de “buracos” (necrose caseosa), que contribuem para o espalhamento da bactéria. As reações são frequentemente acompanhadas de fibrose extensa. Observa-se na região central do granuloma a presença de uma área de necrose, circundada por células epitelióides e células gigantes com células mononucleares na região periférica.

No caso da esquistossomose a reação granulomatosa se processa contra o ovo dos esquistossomas, levando a formação do granuloma ao redor do mesmo.

Na Sarcoidose, a causa exata da doença é desconhecida, sabe-se que é uma doença crônica, com quadro clínico algumas vezes parecido com o da lepra, onde macrófagos se acumulam em vários tecidos como pulmões, linfonodos, ossos, tecido nervoso, e pele, formando o granuloma, frequentemente acompanhado de fibrose. Essa doença acomete mais o tecido linfóide, promovendo o edema dos linfonodos. Até o momento não se encontrou um agente infeccioso para tal doença, mas há a desconfiança de que alguma micobactéria possa estar envolvida com ela pois a patologia é semelhante.

A doença de Crohn também é uma doença em que não há a participação de um agente infeccioso, ela acomete o colo e o íleo, as vezes mais na porção terminal do íleo e por isso também chamada inicialmente de ileíte terminal. Hoje em dia já é sabido que esta doença pode acometer qualquer porção do trato alimentar. Esta doença, nos Estados Unidos pelo menos, tem acometido mais a adolescentes e pessoas por volta dos 20 anos de idade, com maior incidência em pessoas do sexo feminino, mas isto não impede que ela ocorra em qualquer idade. Nela temos a presença de os linfócitos e macrófagos se acumulando em várias camadas do intestino, levando a formação do granuloma e fibrose. Esta reação parece começar com a infiltração de neutrófilos na camada epitelial, recobrando então o intestino com agregados de linfócitos, o que leva a infiltração destes nas criptas e a posterior formação da fístula. Esta reação granulomatosa leva a diminuição do diâmetro interno do intestino e a formação de fístulas que chegam até outros órgãos.

## **REAÇÕES IMUNOLÓGICAS A VÍRUS**

Os vírus são parasitos intracelulares obrigatórios, constituídos por RNA ou DNA, e fazem uso do maquinário celular para a montagem de novos vírus. Temos também os prions que são apenas proteínas infectantes, geralmente associadas com doenças neurológicas nos seres humanos e em animais (como a Doença da Vaca Louca nos bovinos ou a Doença de Creutzfeld-Jakob nos humanos). Os vírus, dependendo do tipo, podem promover a doença de várias formas, como uma infecção aguda que o próprio organismo consegue debelar, como no caso da gripe promovida por vírus influenza; como uma infecção latente e persistente, conforme o observado nas infecções pelo vírus Herpes simples e citomegalovírus ou como uma infecção persistente, em que o organismo não consegue montar uma resposta eficaz no combate ao agente viral como é observado nas infecções por vírus da Hepatite B e C.

No caso dos prions, não há o estágio agudo, estes agentes persistem como uma infecção lenta, que dura por anos sem induzir uma resposta imune.

A resposta inicial que o organismo monta contra os vírus faz parte das defesas inatas, como a liberação de interferon, ativação de células NK e macrófagos. O interferon é liberado pelas células que estão infectadas por vírus, este interferon pode ser o  $\alpha$  ou  $\beta$ , o qual ativa mecanismos antivirais nas células vizinhas. Além disso, na resposta inflamatória aguda, como há a liberação de  $\gamma$ -interferon, interleucina-1 e fator de necrose tumoral (TNF), estes agem induzindo a expressão de ICAM-1, que acaba por facilitar a interação das células T e as células apresentadoras de antígenos (Rueckert, R.R., 1996).

Antes de falarmos mais sobre a ação do interferon é bom lembrar que existem três tipos de interferon, o  $\alpha$ -IFN que é liberado principalmente pelos linfócitos, o  $\beta$ -IFN que é produzido mais pelos fibroblastos e por fim o  $\gamma$ -IFN que é liberado mais por linfócitos e macrófagos. Pois bem, os interferons ativam uma série de genes dos quais dois exercem atividade antiviral direta, um deles promove a atividade de uma proteína quinase que tem a propriedade de inibir a fosforilação e bloquear a translação proteica; e o outro de produzir a 2'5'-oligoadenilato sintetase que ativa uma endonuclease latente capaz de degradar o RNA viral.

Existem outros mecanismos mais específicos como a ativação do gene Mx, que inibe a transcrição primária dos genes do vírus influenza, mas não tem ação sobre outros vírus. O  $\gamma$ -IFN também aumenta a eficiência da resposta imune adaptativa, estimulando o aumento na expressão das moléculas de MHC de classe I e II e promover a ativação de macrófagos e células NK.

### **O Papel das Células NK**

As células NK se tornam ativas em aproximadamente 2 dias após o início da infecção viral, elas são mais eficientes nas infecções por vírus da família Herpesviridae, mais especificamente para os citomegalovírus (CMV). Não se sabe que moléculas da célula infectada por um vírus que a NK reconhece, no entanto há uma correlação inversa entre MHC de classe I e a ação da NK. Isto é curioso uma vez que várias famílias de vírus inibem a expressão do MHC de classe I, talvez como uma forma de escapar do reconhecimento efetuado pelas células T. O  $\gamma$ -IFN é capaz de ativar a função das células NK assim como de guiá-la ao sítio de infecção. Numa fase mais avançada da resposta imune, as NK atuam exercendo sua atividade matadora pela citotoxicidade dependente de anticorpo.

### **Participação das células T e B**

Aos poucos a resposta imune vai se adaptando e envolve além das células T citotóxicas, envolve também células T<sub>H</sub>, células B e plasmócitos. Os plasmócitos produzem anticorpos que são os principais responsáveis por evitar a propagação do vírus. Estes anticorpos são montados para as proteínas virais existentes nas células infectadas, também temos anticorpos para as glicoproteínas virais atuando contra o envelope viral ou partes deste expressos nas células hospedeiras. Auxiliando o papel dos anticorpos, temos a participação da via clássica do complemento que atua tanto nas

partículas virais livres como nas células que estão replicando vírus. No entanto para que o complemento ataque a membrana de uma célula infectada, há a necessidade de que hajam pelo menos  $5 \times 10^6$  partículas na membrana celular. Por outro lado as células NK conseguem atuar em células com apenas  $10^3$  moléculas de IgG ligadas ao antígeno viral presente na membrana celular, elas se ligam a IgG via o receptor Fc $\gamma$ RIII (CD16), destruindo a célula hospedeira por um mecanismo dependente de perforina.

As células T apresentam uma série de funções na infecção por vírus, na verdade a maior parte da resposta feita pelas células B produtoras de anticorpo é timo dependente, e por isso requer a participação de células CD4<sup>+</sup> para que haja a troca de isotipo das imunoglobulinas a serem produzidas e para a maturação. As células T CD4<sup>+</sup> também atuam na indução de células CD8<sup>+</sup> citotóxicas e no recrutamento e ativação de macrófagos ao sítio de infecção.

Durante a replicação do vírus em uma célula, qualquer proteína viral pode ser processada e incorporada ao MHC de classe I, isto acaba levando as células T a reconhecerem a célula infectada. Um exemplo disto ocorre na replicação do citomegalovírus (CMV) em que a expressão de sua proteína imediata precoce, a pp63, acaba estimulando a resposta mediada por células T, ao ser montada junto como o MHC de classe I.

As células CD4<sup>+</sup> são importantes na medida em que podem recrutar macrófagos do mesmo modo em que fazem na reação de hipersensibilidade do Tipo IV e assim acelerar a destruição das partículas virais. Citocinas como o  $\gamma$ -IFN liberadas pelas células T são capazes de ativar monócitos que por sua vez liberam TNF que também possui ação antiviral.

No sarampo ocorre a indução de células T CD4<sup>+</sup>, que são capazes de reconhecer e matar células infectadas apresentando o MHC de classe II, isto parece ocorrer devido a via de apresentação do antígeno, em que há a fagocitose, degradação e apresentação a célula T pelas células apresentadoras de antígeno.

A resposta imune nem sempre é eficiente pois os vírus desenvolvem mecanismos de escapar, a mais comum delas é a variação antigênica como é observado nos vírus Influenza A, que tem alta taxa de mutação. A mutação viral ocorre justamente nas porções antigênicas que seriam reconhecidas por anticorpos específicos, nos vírus influenza isto ocorre na hemaglutinina e na neuraminidase que embora sejam imunogênicas, não servem para a produção de vacinas devido a mutação que ocorre.

Em outros casos como os anticorpos conseguem remover os vírus da circulação, isto pode fazer com que os vírus possam permanecer no interior das células como a se proteger da ação dos anticorpos, assim levando a infecção intracelular persistente. Como exemplo temos os herpesvírus e os citomegalovírus, que apenas saem das células quando o sistema imune está deficiente. Só que os herpesvírus e citomegalovírus ainda apresentam glicoproteínas que atuam como receptores para a porção Fc da IgG, com isso o anticorpo se liga ao vírus como se ligaria a uma célula fagocitária, e acaba não tendo a propriedade de desencadear o complemento ou ainda, ativar a fagocitose.



Vírus como o Epstein-Barr e Adenovírus conseguem fazer com que a célula monte pequenas moléculas de RNA que competem com a proteína quinase e deste modo inibem a ativação do  $\gamma$ -IFN. Além disso os Adenovírus e CMV induzem a codificação de proteínas que são capazes de inibir o transporte das moléculas de MHC de classe I a membrana celular, deste modo os vírus escapam do reconhecimento feito pelas células T.

Alguns vírus possuem genes que codificam receptores homólogos aos de citocinas, quando não codificam citocinas. Formas solúveis dos receptores de IL-1 $\beta$ , TNF e  $\gamma$ -IFN, são liberadas pelas células infectadas e com isso inibem a atividade destas citocinas. Como exemplo temos o vírus Epstein-Barr que codifica uma proteína homóloga a IL-10 e que exerce a mesma função da IL-10 *in vitro*.

Durante infecções crônicas ocorre a formação de imunocomplexos nos fluidos corporais ou na superfície de células como é o caso das infecções pelo vírus da hepatite B ou CMV. Nestes casos os anticorpos são ineficazes na presença de grandes quantidades de vírus, com isso estes imunocomplexos são depositados no fígado ou vasos sanguíneos, onde ocorre a resposta inflamatória que leva a destruição tecidual.

Em casos como o vírus da Dengue, os anticorpos acabam se ligando aos vírus formando um imunocomplexo que se liga via Fc ao macrófago e desta forma o vírus consegue entrar na célula que irá replica-lo mais facilmente. Além disso estes imunocomplexos formados com o vírus da Dengue promovem a ativação do complemento que acaba lesando o tecido onde ele está, isto leva ao mecanismo que desencadeia a febre hemorrágica e a síndrome do choque observada na dengue.

Outro mecanismo que alguns vírus apresentam para resistir as defesas orgânicas, é que eles possuem a capacidade de infectar células do sistema imune como linfócitos ou macrófagos, como ocorre na SIDA. Enquanto a célula está num estágio não ativado o vírus permanece em seu estágio latente, no momento que a célula é ativada, os vírus entram em replicação. Temos vários exemplos disto, como os vírus Epstein Barr tem tropismo pelos linfócitos B; HTLV, HIV, vírus do Sarampo, Vírus do Herpes Humano tipo VI infectam linfócitos T e HIV e CMV infectando macrófagos.

No caso do HIV, a doença se caracteriza por um longo período de latência do vírus, onde não ocorre qualquer resposta imunológica. O HIV entra no linfócito T CD4<sup>+</sup> se ligando via gp120 (uma glicoproteína do envelope do HIV) ao CD4 do linfócito. O HIV também pode entrar em outras células ao se ligar via gp120 ou por estar ligado a anticorpos em células como macrófagos, e células apresentadoras de antígeno.

Durante o período de latência do HIV, parece existir um provírus, integrado ao DNA do hospedeiro sem que ocorra qualquer transcrição do mesmo. Ao que parece o TNF e a IL-6 liberada no estímulo da resposta imune pode servir como sinal para o início da transcrição viral, podendo assim ocorrer a contaminação de outras células e consequente liberação de mais citocinas. A eliminação do

HIV não ocorre por uma série de fatores, mas os mais importantes deles se deve a alta mutação que o vírus sofre e a progressiva imunodeficiência que ocorre devido a destruição das células T CD4<sup>+</sup>.

Alguns vírus podem ainda induzir a doenças autoimunes, podendo ser devido a lesão induzida por estes ou por simular determinadas moléculas parecidas com as próprias. A lesão induzida por vírus se deve a própria resposta inflamatória que ocorre, levando a lesão tecidual constante, e expondo proteínas oriundas do interior das células, o que leva a produção de anticorpos para estas.

Quanto aos vírus que expressam proteínas semelhantes a proteínas próprias, quando estas são processadas e apresentadas as células T, ocorre a quebra da tolerância imunológica com a consequente produção de anticorpos às proteínas próprias.

## **IMUNIDADE A BACTÉRIAS**

A imunidade a bactérias está relacionada a estrutura do microrganismo invasor e ao seu mecanismo de patogenicidade. Baseado nisso há diferenças entre a resposta imune que ocorre entre bactérias Gram positivas, Gram negativas, micobactérias e espiroquetas. No caso de bactérias Gram negativas estas são mais suscetíveis a ação do sistema complemento e a ação de células citotóxicas, já nos demais tipos de bactéria há a necessidade de que sejam fagocitadas para que sejam mortas. Quando a bactéria apresenta fímbrias, flagelos ou estão recobertas pela cápsula, estas estruturas podem impedir ou dificultar a ação das células fagocitárias e do complemento, mas podem ser atingidas pelos anticorpos.

As bactérias podem ainda estimular o sistema imune via toxinas, sem invadir o organismo, neste caso a ação é feita pelas toxinas bacterianas ou apenas invadindo o organismo. Em geral, ocorre a invasão da bactéria ao organismo com a liberação de endo e exotoxinas bacterianas.

Conforme já discutido anteriormente, as primeiras barreiras a entrada de bactérias no organismo, são compostas pelas defesas inespecíficas como a pele íntegra, o ácido estomacal, os ácidos graxos presentes na pele, pH do trato urinário, a flora bacteriana normal, etc.

A segunda linha de defesa compreende o reconhecimento de alguns componentes bacterianos comuns pelo sistema de defesa inato. Este tipo de reconhecimento é de largo espectro, e ocorrem antes que células T específicas e anticorpos específicos sejam montados, observamos isso ocorrer com vários tipos de cocos. Estes mecanismos envolvem o reconhecimento de moléculas comuns a todas as bactérias por células como as NK, granulócitos e monócitos, também temos a participação da proteína C reativa, que ao se ligar a superfície de algumas bactérias é capaz de desencadear o sistema complemento. A ativação do sistema complemento leva a produção dos fatores C3a e C5a que acabam por ativar a degranulação de mastócitos e basófilos, assim como chamar neutrófilos para o sítio de infecção. Com a histamina e leucotrieno liberados pelos mastócitos temos o aumento da permeabilidade vascular, também com a secreção de IL-8, pelos mastócitos atuando junto com os fatores quimiotáticos do complemento, temos mais células chegando ao local.

O complemento consegue ser eficaz na destruição de bactérias que apresentam uma bi-camada lipídica, como é o caso das bactérias Gram negativas, pois esta é sensível ao MAC (complexo de ataque a membrana). A ativação do MAC leva a degranulação de mastócitos e a contração da musculatura lisa, assim como a atração e ativação de neutrófilos.

As células NK quando estimuladas por IL-12 ou TNF, passam a liberar  $\gamma$ -IFN, que acaba ativando mais macrófagos.

Quando as barreiras inespecíficas são vencidas pela bactéria, entra em ação a resposta mediada por anticorpos. Os anticorpos são muito importantes quando se trata da neutralização de toxinas bacterianas, pois a mesma é executada quando o anticorpo se liga a porção da toxina que normalmente se ligaria na célula. Da mesma forma os anticorpos podem se ligar a toxinas ou enzimas presentes na matriz extracelular da bactéria, impedindo assim o espalhamento da bactéria e as vezes interferindo com a motilidade bacteriana ao se ligar ao flagelo.

Anticorpos da classe IgA podem ter papel importante em evitar a entrada de bactérias nas mucosas, pois ao se ligar a bactéria, impede que esta consiga se aderir as células epiteliais. Por exemplo, anticorpos para a proteína M dos estreptococos do grupo A são específicos para os estreptococos de garganta. Alguns anticorpos também são capazes de bloquear a captação de ferro e outros nutrientes ao se ligar a determinados sítios da membrana bacteriana.

No entanto a função mais importante dos anticorpos, é a de ativar a via clássica do complemento pois quando a bactéria não é destruída por este, ela é mais facilmente fagocitada por estar opsonizada por C3b.

No entanto algumas bactérias podem escapar do sistema complemento por serem fracos ativadores ou porque a estrutura bacteriana que é atacada pelo complemento está longe da bactéria, como é o caso das cadeias longas do antígeno O presentes no lipopolisacarídeo (LPS). Outras bactérias já conseguem se livrar do complemento porque possuem mecanismos de faze-lo como no caso em que C3b ao se depositar na capsula de bactérias ricas em ácido siálico, este é inativado pelo fator H e I presentes no plasma, por serem atraídos pela cápsula. Como exemplo temos as bactérias como *Neisseria meningitidis*, *E. coli* e os estreptococos do grupo B. No caso dos estreptococos do grupo A, a proteína M é um aceptor para o fator H, deste modo o complexo C3bB é facilmente dissociado, além disso ela possui um gene que codifica uma protease para C5a.

Células fagocitárias também atuam capturando bactérias, aliás, a maioria das bactérias Gram negativas podem ser mortas pelo contato com as células NK ou T citotóxicas. Provavelmente isto ocorre por um mecanismo que lisa a bi camada lipídica que compõe a membrana.

A ligação das células fagocitárias as bactérias pode ocorrer de várias maneiras:

- Ligação a lectinas presentes na superfície bacteriana
- Ligação da bactéria a lectinas presentes nos fagócitos
- Ligação ao complemento depositado na membrana da bactéria

- Ligação aos anticorpos ligados ao microrganismo via Fc.

Assim que o microrganismo é fagocitado ele é exposto a uma série de mecanismos que poderão destruí-lo, um deles é a produção de intermediários do oxigênio reativo, onde uma enzima presente na membrana da célula fagocitária é capaz de reduzir o oxigênio ( $O_2$ ) no anion superóxido ( $\sim O_2^-$ ), que tem efeito tóxico sobre a bactéria. Também temos a produção de produtos intermediários nitrogenados, que resultam na produção do óxido nítrico que é tóxico para bactérias e células tumorais. Para a produção destes intermediários nitrogenados, os macrófagos precisam ser ativados pelo  $\gamma$ -IFN e pelo TNF.

Existem ainda proteínas catiônicas com propriedades parecidas com a dos antibióticos como os peptídeos catiônicos da cisteína e arginina presentes nos grânulos de neutrófilos. Estas proteínas são capazes de formar canais iônicos permeáveis na camada bi-lipídica das bactérias, sendo mais eficientes no pH 7,0. Há também proteínas catiônicas que atuam em pH diferente como a Catepsina G e a Azurocidina, que tem eficácia contra as bactérias Gram negativas.

Não podemos esquecer que os fagolisossomos também apresentam um pH alcalino assim que o microrganismo é fagocitado, sendo que esse pH depois de algum tempo se torna ácido. Alguns microrganismos morrem apenas devido a baixa do pH outros ainda precisam sofrer a ação de enzimas lisossomais que atuam no pH baixo.

Algumas bactérias Gram negativas morrem pela ação da lisozima que atua na camada de peptidoglicana. Substâncias como lactoferrina (produzida por neutrófilos) também tem sua participação uma vez que estas se ligam ao ferro e o tornam indisponível para as bactérias.

Alguns produtos microbianos podem estimular os monócitos e macrófagos sem a participação dos linfócitos, mas também podem ser ativados por citocinas liberadas pelas células NK.

Das linfocinas liberadas por células T a mais importante na ativação dos fagócitos talvez seja o  $\gamma$ -IFN. O  $\gamma$ -IFN também tem o papel de potencializar os mecanismos oxigênio dependente e oxigênio independente das células fagocitárias. As linfocinas possuem dois efeitos principais, um de ativar e outro de atrair fagócitos isso pode ocorrer de forma diferente dependendo da bactéria, por exemplo, no caso da infecção por *L. monocytogenes*, é a ativação celular que ocorre primeiro para que a célula fagocitária consiga destruir a bactéria via ativação dos produtos do oxigênio reativo, já nas infecções por *M. tuberculosis*, é mais importante a mobilização de células ao redor da bactéria já que esta é resistente a fagocitose e por isso é mais importante para o organismo fazer sua imobilização.

Nem sempre as defesas celulares são eficientes, tanto assim que alguns microrganismos conseguem escapar do fagossomo indo para o citoplasma do fagócito. Outras bactérias como o *M. leprae* conseguem fazer que as células não fagocitárias, e portanto sem atividade antibactericida, as removam da circulação antes que elas sejam encontradas por células fagocitárias profissionais ou sofram a ação de outros mecanismos capazes de destruí-las. Para que as bactérias então sejam alcançadas elas tem de ser expulsas destas células, e quem consegue fazer isso são as células T

citotóxicas, elas matam a célula contendo a bactéria ao reconhecer qualquer alteração no receptores de membrana expressos (principalmente o MHC).

Um grande número de células T apresentando os receptores  $\gamma\delta$  se proliferam nas infecções bacterianas, não se sabe ainda qual o papel exato delas nas infecções sabe-se apenas que elas tem ação citotóxica nas células infectadas.

Fibroblastos também podem participar no combate aos microrganismos provavelmente produzindo derivados nitrogenados.

No entanto quando a resposta imune é exacerbada, podem ocorrer reações indesejáveis como é o caso do **choque provocado por exotoxinas**, que acontece devido a produção maciça de citocinas em resposta a liberação de produtos bacterianos liberados durante episódios septicêmicos. A exotoxina (LPS) de bactérias Gram-negativas geralmente está implicada neste quadro de choque, mas também pode ocorrer com bactérias Gram-positivas. Essa síndrome do choque tóxico pode levar o indivíduo infectado a ter febre, colapso circulatório, coagulação intravascular e necrose hemorrágica, que leva a falha de múltiplos órgãos, como ocorre nas infecções causadas por *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre das Montanhas Rochosas.

Existe um fenômeno que acontece quando a bactéria é capaz de causar necrose hemorrágica devido a reação sistêmica que ocorre envolvendo o sistema circulatório, promovendo coagulação intravascular difusa e trombose. A endotoxina (LPS) é o componente ativo que dispara este mecanismo, promovendo mudanças endoteliais, deposição de fibrina, acúmulo e degranulação de neutrófilos e plaquetas, sendo que os mediadores desta reação são o  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN, IL-12 e IL-1. Este fenômeno é chamado de **Reação de Shwartzman**, e é observado na meningite meningocócica onde num primeiro episódio de septicemia temos o espalhamento dos sítios inflamatórios que são pequenos e subclínicos mas que permanecem sensíveis a ação das citocinas. Num segundo momento em que ocorre um novo episódio de septicemia ocorre o desencadeamento de uma resposta inflamatória mais forte com grande produção de citocinas que levam ao desenvolvimento de necrose nestes sítios.

Além do fenômeno de Shwartzman, temos em alguns casos como na infecção por micobactérias o desenvolvimento da reação de hipersensibilidade tardia, mediada por células T, a qual acaba levando a necrose tecidual na região central do processo celular, conforme já descrito na reação do tipo IV.

As bactérias também podem apresentar o que se chama de Superantígenos, eles tem a capacidade de se ligar diretamente as regiões variáveis das cadeias  $\beta$  dos receptores de antígeno de certos subsets de células T, e além disso fazer a ligação cruzada destes com o MHC de células apresentadoras de antígenos. Como resultado disso as células T são ativadas sem que haja o processamento e a apresentação do antígeno como peptídeos ligados ao MHC. Estes superantígenos podem ser encontrados nos estafilococos, estreptococos, micoplasmas e outras bactérias. Eles são os

responsáveis pela liberação maciça de citocinas e linfocinas o que acaba estimulando uma grande quantidade de sub populações de células T.

As bactérias também podem apresentar o que se chama de Proteínas do Choque Térmico, elas tem papel na captura, empacotamento e transporte de algumas moléculas. As sequências de aminoácidos destas proteínas são extremamente conservadas e existe a especulação de que tais proteínas, por serem semelhantes as proteínas humanas possam estar envolvidas com o desencadeamento da autoimunidade. Elas também parecem ser o alvo da imunidade protetora de vários microrganismos, e ainda parece que as células T podem reconhecer quais proteínas são do patógeno.

## IMUNIDADE A FUNGOS

São classificados quatro tipos de infecção por fungos, embora se saiba pouco sobre os mecanismos precisos de como o sistema imune reage neste tipo de infecção, parece que as reações são parecidas com aquelas que acontecem com as bactérias. As principais categorias das infecções por fungo são:

- Micoses superficiais: são produzidas por fungos chamados de dermatófitos, e estão normalmente restritas aos componentes não celulares queratinizados da pele, cabelo e unhas.
- Micoses subcutâneas: é causada por fungos saprofitos que podem causar a formação de nódulos crônicos e úlceras em tecidos subcutâneos seguido de trauma, como exemplo temos a cromomicose, esporotricose e micetoma.
- Micoses respiratórias: fungos saprófitos do solo podem provocar infecções subclínicas ou agudas dos pulmões, ou ainda lesões granulomatosas. Como exemplo temos a histoplasmose e coccideomicose.
- Candidiases: Produzido pela *Candida albicans*, que normalmente é um comensal e geralmente causa infecções superficiais na pele e mucosas.

Ao que parece as infecções fúngicas são controladas por reações mediadas por células, isto é observado nas infecções cutâneas em que elas são auto limitadas. A resistência é baseada na reação de hipersensibilidade do tipo IV uma vez que alguns pacientes a apresentam frente a antígenos fúngicos. As doenças crônicas parecem ser o resultado da falta ou da falha na montagem da Reação do tipo IV. A imunidade por células T parece estar envolvida em outras infecções fúngicas já que a resistência pode ser transferida via células T. Supõe-se que as células T liberem citocinas que sejam capazes de ativar macrófagos a destruir fungos. Nas micoses respiratórias, o quadro da resposta imune é parecido com o observado na lepra, onde há um infiltrado de linfócitos, células epitelióides e gigantes ao redor do fungo, tentando imobiliza-lo.

A candidiase costuma aparecer como resultado de um distúrbio fisiológico do organismo, seja por stress, uso de drogas imunossupressivas ou no caso de doenças que perturbam o sistema imune

como a AIDS, deficiências imunes e doenças autoimunes. Isso prova que o sistema imune está em combate permanente, evitando que o fungo se espalhe.

Há evidências de que neutrófilos e polimorfonucleares estejam envolvidos na imunidade em alguns processos respiratórios como na mucormicose. É possível que proteínas catiônicas sejam importantes no processo de proteção contra o fungo, uma vez que pacientes com fagócitos apresentando a deficiência no metabolismo da redução do oxigênio conseguem matar o levedos e hifas normalmente. No entanto o metabolismo do óxido nítrico é importante na defesa contra o *Cryptococcus*, e este metabolismo parece ser importante no combate a vários fungos.

## **RESPOSTA IMUNE A PARASITOS**

As infecções parasitárias podem estimular várias formas de resposta imune, ela pode ser mediada por anticorpos, mediada por células ou envolver ambos os tipos de resposta, tudo depende do parasita envolvido.

Parasitas como os protozoários, por serem maiores que vírus e bactérias, apresentam uma grande quantidade e variedade de antígenos. Alguns protozoários ainda podem apresentar alterações em seus antígenos de superfície dependendo do estágio de desenvolvimento destes, deste modo, temos respostas imunes estágio específicas. Como exemplo temos a Malária, onde o esporozoíta (forma infectante oriunda do mosquito), que induz a montagem de anticorpos que não são capazes de reagir com os merozoítas (forma infectante das hemácias). Os protozoários ainda apresentam diferentes formas de entrada nas células do hospedeiro, na Malária, os merozoítas tem a capacidade de se ligar a receptores presentes nas hemácias e usar uma organela própria, contendo enzimas, para fazer a entrada (as roptrias). Outro exemplo são as *Leishmania spp.* que habitam os macrófagos, usando os receptores do complemento para fazer com que as células as fagocitem, além disso elas podem entrar nas células usando o receptor manose-fucose presente na superfície do macrófago.

A resistência que algumas pessoas apresentam as infecções por determinados parasitas parece ser determinada por um fator genético, pois, foi observado que algumas pessoas carregando alguns genes de MHC tinham menor capacidade de montar anticorpos para alguns peptídeos do esporozoíta da malária porque suas células T não eram sensibilizadas. Também foi observado que a população negra do oeste da África é mais resistente a malária do que a população de origem caucasiana pois a primeira possui alguns antígenos de HLA que a última não possui. Outra observação feita na população africana, é que algumas pessoas não apresentam o antígeno Duffy nos seus eritrócitos, com isso elas são resistentes a infecção pelo *Plasmodium vivax*, já que este usa este antígeno como receptor para fazer sua entrada na célula.

O desenvolvimento da imunidade depende da interação que ocorre entre várias células e dos vários tipos de células que atuam secretando os vários mediadores presentes na resposta imune. Pode-se dizer que os anticorpos são mais eficientes contra os parasitas presentes no sangue e tecidos e que a resposta mediada por células atua nos parasitas intracelulares. No entanto o tipo de resposta capaz de

conferir proteção varia conforme o parasita. Por exemplo, o anticorpo juntamente com a ação do complemento pode lesar alguns parasitas extracelulares, mas tem uma ação mais eficaz quando tem a participação de células efetoras. Na Malária, por exemplo, anticorpos conseguem evitar que as formas extracelulares consigam entrar nas células, e a resposta mediada por células consegue evitar o desenvolvimento da doença nos hepatócitos.

### **Os mecanismos de ação do sistema imune**

O sistema complemento é de novo importante no processo de defesa inespecífica, mas também há a participação de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas na primeira linha de defesa. Na infecção pelo *S. mansoni* por exemplo, este entra através da pele, e o primeiro bloqueio é realizado por macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Outro exemplo está na malária e na infecção produzida por tripanossomídeos, os mesmos são removidos da circulação pelas células fagocitárias do fígado e baço. Os macrófagos ainda liberam citocinas como a IL-1, IL-12 e TNF $\alpha$  e fatores estimuladores de colônia que aumentam a atividade do sistema imunológico ativando e promovendo a proliferação de células. A liberação de citocinas como a IL-10, IL-12, prostaglandinas e TGF $\beta$  podem ter ação anti-inflamatória e imunossupressora.

Os macrófagos são importantes na defesa contra pequenos parasitos, no entanto elas liberam vários fatores citotóxicos capazes de destruir os parasitas sem os fagocitar. Quando ativados por citocinas, os macrófagos podem matar pequenos parasitas como os presentes nos estágios eritrocitários da malária, assim como os grandes, como os esquistossomas. Os macrófagos ainda podem atuar da mesma forma que as células matadoras através da citotoxicidade dependente de anticorpo, ao encontrar o parasito recoberto com IgE ou IgG aumentando ainda mais a eficiência contra parasitas como os esquistossomas. Eles também liberam citocinas como TNF $\alpha$  e IL-1 que interage com outras células, como por exemplo com os hepatócitos, os fazendo se tornar resistentes aos parasitos da malária.

Os intermediários do oxigênio reativo são gerados pelos macrófagos e granulócitos após a fagocitose de parasitos da malária e outros como os *T. cruzi*, *T. gondii*, *Leishmania spp.* como forma de destruir estes parasitas. Também quando ativados por citocinas os macrófagos liberam mais superóxido e peróxido de hidrogênio que os macrófagos não ativados, assim como seu mecanismo de produção de oxigênio reativo é aumentado.

A síntese de óxido nítrico pelos macrófagos é estimulada por citocinas como  $\gamma$ IFN e TNF $\alpha$ , e é bastante aumentada quando o estímulo é feito pelos dois. O óxido nítrico também pode ser produzido por células epiteliais e contribui para a resistência do hospedeiro que em doenças como a leishmaniose, esquistossomose e malária e ainda, é uma das formas de controle.

Todas as funções dos macrófagos efetores são ampliadas logo que a infecção tem início sem que haja a atuação das células T pois células como as NK podem liberar  $\gamma$ IFN quando estimulado pela IL-12 liberada pelo macrófago. Mais ainda, os macrófagos secretam TNF $\alpha$ , em resposta a alguns



produtos parasitários como fosfolipídios contendo antígenos dos parasitas da malária, e isto ativa mais macrófagos. Embora o TNF $\alpha$  também possa ser secretado por outras células, os macrófagos ainda são os principais responsáveis por sua produção. O TNF $\alpha$  ainda ativa outras células como eosinófilos e plaquetas a matar as larvas do *S. mansoni*, sendo que o  $\gamma$ -IFN ainda pode aumentar mais esta atividade.

Os neutrófilos também tem a capacidade de matar pequenos parasitas com mecanismos que os macrófagos também apresentam como os mecanismos oxigênio dependente e oxigênio independente, incluindo a produção de óxido nítrico. No entanto os neutrófilos possuem uma atividade respiratória mais intensa do que os macrófagos e seus grânulos secretórios contém proteínas altamente citotóxicas. Os neutrófilos podem ser ativados por citocinas como  $\gamma$ IFN, TNF $\alpha$ , e GM-CSF. A destruição extracelular por neutrófilos é mediada por peróxido de hidrogênio enquanto que os componentes liberados pelos grânulos estão envolvidos na destruição intracelular. Os neutrófilos também possuem receptores para Fc e complemento e por isso participam da resposta citotóxica mediada por anticorpos, como ocorre na infecção pelo *S. mansoni*. Deste modo eles são mais destrutivos que os eosinófilos contra várias espécies de nematódeos .

Os eosinófilos participam mais nas infecções por vermes, parece que eles estão envolvidos na defesa contra os estágios teciduais dos parasitas que são muito grandes para ser fagocitados. A reação realizada pela IgE que força a degranulação dos mastócitos promove a atração dos eosinófilos ao sítio onde está o parasita e ainda amplifica sua atividade antiparasitária. No entanto nem sempre os eosinófilos conseguem evitar que o parasita promova a infecção, mas podem limitar a mesma.

Os eosinófilos podem matar os helmintos por mecanismos oxigênio dependente ou oxigênio independentes e mesmo não tendo a mesma capacidade de fazer a fagocitose que os neutrófilos, eles podem degranular em resposta a alteração de sua membrana. Além disso eles podem ser ativados por citocinas como o TNF $\alpha$  e GM-CSF. No entanto a maioria das atividades dos eosinófilos são controladas por mecanismos antígeno específicos como no reconhecimento que eles fazem das IgE ligadas a antígenos, procedendo assim a degranulação sobre este. Os eosinófilos possuem ainda uma proteína chamada de Proteína Básica Principal (MBP) que ajuda a destruir os esquistossomas.

Ainda em alguns processos parasitários, como na infecção pelo esquistossoma, pode haver a participação em conjunto de eosinófilos e mastócitos, onde os produtos liberados pelos mastócitos promovem o aumento da atividade dos eosinófilos. Os antígenos é que causariam a degranulação dos mastócitos, sem que houvesse a participação da IgE, e os produtos liberados promoveriam a atração e o aumento da atividade dos eosinófilos no sítio de infecção.

A participação das plaquetas pode se dar contra vários tipos parasitários, dentre estes se destaca a ação contra a forma larvária do *T. gondii* e *T. cruzi*. Assim como outras células do sistema imune, sua atividade citotóxica é aumentada pela ação das citocinas como  $\gamma$ IFN e TNF $\alpha$ . Assim como os macrófagos e outras células do sistema imune, as plaquetas apresentam o receptor Fc $\epsilon$  em sua

membrana, com isso elas também podem exercer a atividade citotóxica dependente de anticorpo quando se liga a IgE.

Na resposta parasitária as células T controlam o desenvolvimento da imunidade, isso pode ser observado na malária onde a monocitose e o aumento do baço é acompanhado do aumento do número de células T dependentes. Outro exemplo inclui o acúmulo de macrófagos nos granulomas que se formam em torno do ovo no fígado infectado pelo esquistossoma, também se observa a eosinofilia em infecções por helmintos, e o recrutamento de eosinófilos e mastócitos para a mucosa intestinal nas infestações por vermes. Os mastócitos e os eosinófilos são importantes neste controle das infestações por vermes e helmintos, só que eles costumam proliferar melhor quando sofrem ação de citocinas liberadas pelas células T, como as IL-3, GM-CSF e IL-5.

No entanto o aumento da liberação de IL-3 pode ser prejudicial ao hospedeiro, na medida que este pode causar a exacerbação da resposta imune e assim aumentar a disseminação dos parasitas.

O tipo de célula T responsável para o controle da infecção varia de acordo com o parasita e com o estágio da infecção e ainda, depende do tipo de citocina que está sendo liberada. Por exemplo, células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, protegem o hospedeiro contra diferentes fases da infecção por *Plasmodium*, as células CD4<sup>+</sup> atuam no estágio em que o parasita se encontra no interior das hemácias, enquanto as células CD8<sup>+</sup> atuam no estágio em que o parasita se encontra no fígado. As células CD8<sup>+</sup> atuam em dois estágios diferentes, em um deles ela libera  $\gamma$ IFN que inibe a multiplicação dos parasitas nos hepatócitos, e destroem os hepatócitos infectados. Os hepatócitos expressam o MHC de classe I, mas não o MHC de classe II, logo as células CD4<sup>+</sup> não tem a capacidade de as reconhecer, do mesmo modo, como os eritrócitos não expressam o MHC de classe I, as células CD8<sup>+</sup> não tem a capacidade de fazer o reconhecimento destas.

A resposta imune contra o *T. cruzi* e *T. gondii*, não depende apenas das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, mas também de células NK e da produção de anticorpos. As células NK são estimuladas pela IL-12 secretada pelos macrófagos, e uma vez ativados eles liberam  $\gamma$ IFN.

As infecções crônicas estão associadas a baixa produção de  $\gamma$ IFN e isso mostra porque os pacientes com SIDA são facilmente infectados e sucumbem na infecção por *T. gondii*, já que a população de células CD4<sup>+</sup> está sendo destruída.

Conforme já dito anteriormente, as células T<sub>H</sub> podem ser divididas em T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub>, no estágio inicial da infecção temos quase que o equilíbrio entre as duas populações, e a população que irá prevalecer, será determinada pelo tempo e pelo curso que a infecção tomará e também do agente parasitário em questão. Na malária, por exemplo, as células T<sub>H1</sub> atuam diminuindo a parasitemia dos esporozoítas do *P. vivax*.

A população de linfócitos T<sub>H1</sub> ao liberar  $\gamma$ IFN promove a ativação de macrófagos a matar protozoários como o *T. cruzi* e *T. gondii*, assim como aumenta a atividade contra outros parasitas.

Em pessoas com a Leishmaniose cutânea difusa e Leishmaniose visceral progressiva, as mesmas se caracterizam pelo grande produção de IL-10, que é produzida pela população de  $T_{H2}$  e que por isso inibe a população  $T_{H1}$ , e talvez por isso a infecção não seja tão bem controlada pelo sistema imune. Estudos *in vitro* demonstraram que a IL-4 inibe a atividade do  $\gamma$ IFN, e isto evita que os monócitos sejam ativados contra a *L. donovani*. Isto sugere que se usarmos IL-12 como terapia na Leishmaniose, ela possa exercer ação antagonista sobre as IL-4, IL-10 e TGF $\beta$ , ativando também, de forma indireta, a ação da população  $T_{H1}$ .

Na infestação por vermes, a principal característica da resposta imune é a produção de IgE e a eosinofilia, ambas dependem da ação das citocinas liberada pelos linfócitos  $T_{H2}$ . No entanto se observa uma certa contribuição dos linfócitos  $T_{H1}$ , que ainda não foi bem esclarecida.

Na esquistossomose a resposta promovida pela população de linfócitos  $T_{H2}$  parece ser importante na resistência a reinfeção quando o paciente foi submetido ao tratamento com drogas. A resposta pela população  $T_{H2}$  parece ser estimulada pelos ovos do esquistossoma.

Em algumas infecções parasitárias o sistema imune não consegue destruir o parasita, neste caso o ocorre a formação do granuloma, com células se aglomerando ao redor do mesmo. Isto é observado na esquistossomose, onde ocorre a formação do granuloma ao redor do ovo, esta reação é dependente de linfócitos  $T_{H1}$ , e é uma resposta local crônica mediada por células, onde há a participação de citocinas como o TNF $\alpha$  e o  $\gamma$ IFN. Os macrófagos acumulam e liberam fatores do fibrinogênio que estimulam a formação do tecido granulomatoso e acabam levando a fibrose. Na esquistossomose a formação do granuloma ocorre em resposta a liberação de um antígeno solúvel secretado ao redor do ovo que ficou preso no fígado. Embora essa reação pudesse beneficiar o hospedeiro, isolando o fígado da ação das toxinas secretadas pelo ovo, ela acaba sendo a causa patológica da doença, promovendo reações irreversíveis no fígado e a perda de sua função. Tanto essa reação é controlada por células T, que na sua ausência não se observa a formação do granuloma.

As células  $T_{H2}$  também são importantes para expulsar os vermes do intestino, pois elas ativam os mastócitos a liberarem produtos que interagem com os eosinófilos, os quais contribuem no processo de expulsão do verme. As células  $T_{H2}$  podem induzir os linfócitos B (via IL-4 e IL-5) a produzir anticorpos da classe IgE e ainda a proliferação de mastócitos (via IL-3, IL-4, IL-9 e IL-10) e ainda a hiperplasia das células secretoras de muco. Os vermes acabam sendo lesados pela ação dos anticorpos junto com a degranulação dos mastócitos sensibilizados pela IgE. Os mastócitos degranulam histamina que aumenta a permeabilidade do epitélio intestinal e com isto permite que o complemento e os anticorpos presentes no plasma cheguem à luz intestinal, além disso eles podem promover o aumento do peristaltismo intestinal, como forma de expulsar o parasito.

Vários parasitos podem promover uma hipergamaglobulinemia não específica, a qual pode ser devido a liberação de substâncias dos parasitos, que atuam como mitógenos das células B. Como exemplo, os níveis de imunoglobulinas IgM se mostra aumentado na tripanosomiase e na malária e

IgG na malária e na leishmaniose visceral. Quando temos a produção de anticorpos específicos, temos estes atuando de diferentes maneiras contra o antígeno, como exemplos, temos os anticorpos atuando diretamente sobre o parasita o promovendo a ação do complemento sobre este, como ocorre na malária contra os esporozoítas ou na doença de chagas, diretamente sobre os tripanosomas; os anticorpos também podem neutralizar a ação do parasita bloqueando sua ligação à célula hospedeira, como acontece com os merozoítas, que só entram nos eritrócitos via roptria, à qual é bloqueada pelos anticorpos; pode ocorrer também o aumento da fagocitose feita pelos macrófagos, a qual é aumentada quando há também a participação do complemento, via a interação dos anticorpos com o receptor Fc dos macrófagos e do complemento com o receptor para C3; também temos o mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos, muito eficaz nas infecções promovidas por *T. cruzi*, *S. mansoni* e alguns vermes filarióides, nesse caso células como macrófagos, neutrófilos e eosinófilos se ligam aos parasitos recobertos por anticorpos via receptor de Fc ou de C3 e fazem a exocitose em cima do parasita. Foi observado que dependendo do tipo de anticorpo envolvido a resposta é diferente, como exemplo citamos a esquistossomose, onde a resistência é conferida por anticorpos da classe IgE, e a IgG4 parece bloquear a ação da IgE. Isto é muito observado em crianças, pois elas apresentam alta produção de IgG4 e com isso ficam susceptíveis a reinfecções pelo esquistossoma

Por vezes fica difícil diferenciar entre uma resposta mediada por células e por uma resposta mediada por anticorpos, como ocorre na esquistossomose, onde temos a atuação de ambas as respostas. Nela o anticorpo é capaz de se ligar ao ovo e ativar o complemento, bem como a resposta mediada por células como macrófagos, neutrófilos, plaquetas e eosinófilos. Os macrófagos e neutrófilos atuam provavelmente pela liberação de oxigênio reativo e metabólitos do óxido nítrico, e os eosinófilos atuam liberando a MBP. Esta ação celular é ainda potencializada pelas citocinas como a TGF $\alpha$ . Ainda os anticorpos podem sensibilizar os mastócitos a fazerem a degranulação de mediadores inflamatórios, incluindo os que ativam eosinófilos.

### **Mecanismos de Escape dos parasitas**

Parasitas como a *Leishmania* podem escapar do sistema imune usando os receptores do complemento para entrar nos macrófagos e assim escapar do metabolismo oxidativo dos mesmos. Outro exemplo em que o sistema imune às vezes é benéfico ao parasita, está em que o TNF $\alpha$  estimula o *S. mansoni* a produzir mais ovos.

Alguns parasitas também podem resistir à ação do sistema complemento, como é o caso das *Leishmania*, onde a *L. donovani* por ser resistente ao complemento se espalha com facilidade nas vísceras. No caso do *T. cruzi*, ele consegue escapar da ação do complemento porque em sua membrana existe uma glicoproteína que possui atividade semelhante ao Fator Acelerador de Decaimento (DAF), parece que os esquistossomas também possuem uma molécula similar ao DAF.

Os parasitas intracelulares conseguem escapar da destruição de vários modos, por exemplo, os que vivem no interior de macrófagos conseguem escapar da ação dos metabólitos de oxigênio e

enzimas lisosomais, isso é observado no *T. gondii*, que consegue evitar a degradação pelos metabólitos do oxigênio e com a *Leishmania*, que entra na célula ao se ligar aos receptores do complemento e assim escapar da ação do fagossoma. Além disso a *Leishmania* possui enzimas que inibem a produção dos metabólitos do oxigênio, como a superóxido desmutase que a protege dos radicais do oxigênio, e ainda apresenta uma camada de Lipofosfoglicana (LPG) que atua como um escudo contra os metabólitos do oxigênio e ao ataque enzimático. Ainda, uma glicoproteína, a Gp63 atua inibindo a ação das enzimas lisosomais do macrófago. A *Leishmania spp.* também consegue inibir ou diminuir a expressão das moléculas de MHC da classe II dos macrófagos de onde elas estão, com isso a capacidade destas células estimularem as células T<sub>H</sub>, é diminuída.

Alguns parasitas podem ainda se “esconder” do sistema imune através de variações antigênicas, como se observa nos parasitas causadores da malária. Outros parasitas, como é o caso dos esquistossomas, podem adquirir uma camada de antígenos do hospedeiro, de forma que o sistema imune não consegue os reconhecer. Os esquistossomas poderiam se cobrir com moléculas do grupo sanguíneo A e B assim como moléculas de MHC de classe II.

Outros parasitas como algumas espécies de protozoários, como a *Entamoeba histolytica*, e alguns helmintos podem escapar do ataque do sistema imune formando cistos protetores.

Os parasitas também podem apresentar características físicas que lhe conferem proteção, como é o caso dos esquistossomose, que tem uma fina camada que os protege de substâncias tóxicas lançadas pelas células efectoras do hospedeiro, nos nematódeos, a sua membrana frouxa pode ser descartada quando está sob o ataque do sistema imune, cestódeos podem escapar do ataque de neutrófilos secretando um inibidor da elastase, o que faz parar a atração destas células.

Vários parasitas podem resistir ao ataque do metabolismo oxidativo, como as filária presentes nos linfonodos, onde elas secretam uma glutatona peróxidase, os esquistossomose tem em sua membrana uma glutatona S transferase.

Alguns nematódeos e trematódeos podem evitar a ação de imunoglobulinas secretando proteases que clivam a imunoglobulina, removendo a porção Fc.

Os parasitas também podem apresentar atividade imunossupressora, pois alguns podem destruir células linfóides ou o próprio tecido linfóide devido a liberação de um fator linfocitotóxico, ou por interferir com a função dos macrófagos. Os macrófagos podem ser recobertos com polissacarídeos e glicoconjugados que os vermes liberam e assim saturam o macrófago, interferindo com seu processamento. Na malária, por exemplo, os macrófagos acumulam a **hemozoína**, que é um produto de degradação da hemoglobina, a qual interfere com suas funções. Muitos produtos parasitários são capazes de estimular os macrófagos a liberar as prostaglandinas e outras moléculas imunossupressoras as quais interferem com a resposta inflamatória. Outras vezes os próprios vermes liberam prostaglandinas, como é o caso de algumas filárias e cestódeos.

Antígenos solúveis liberados em grandes quantidades pelos parasitas podem atrapalhar a resposta imune uma vez que elas agem como um mecanismo de “distração” para este. Um exemplo

disso está no antígeno solúvel S ou nos antígenos termo resistentes do *P. falciparum*, que se ligam aos anticorpos e assim permitem que o parasita escape. Também muitos dos antígenos de membrana são liberados sob a forma solúvel, como é o caso do LPG liberado pela *Leishmania* e vários antígenos de superfície liberados pelos esquistossomas.

A supressão antigênica também ocorre por supressão da resposta da Hipersensibilidade do tipo IV, afetando os linfócitos T CD4<sup>+</sup> assim como o balanço entre as populações T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub>. Na Leishmaniose, foi observado que as culturas de células T de pacientes com a *L. donovani* não eram capazes de secretar IL-2 ou  $\gamma$ IFN quando cultivadas com o antígeno específico. A expressão do MHC de classe II assim como a secreção de IL-1 se apresenta diminuída, e a secreção de prostaglandinas está aumentada.

Na filariose as células T<sub>H1</sub> não proliferam em resposta a antígenos específicos e a resposta realizada por anticorpos permanece intacta. Na verdade o que se observa nos pacientes altamente infectados com filarias e esquistossomas é que há grandes quantidades de IgG4, a qual tem efeito bloqueador sobre a ação da IgE. Ainda na esquistossomose, anticorpos da classe IgM e IgG2 produzidos para alguns carboidratos dos esquistossoma, são capazes de inibir as funções citotóxicas dos granulócitos e estão correlacionados com a susceptibilidade a reinfecção.

A IL-2 produzida por linfócitos T<sub>H1</sub> pode mostrar-se deficiente em algumas infecções por protozoários como ocorre na malária, e na doença de chagas, isto parece se dever a interferência que o parasita pode executar nos receptores da IL-2.

### **Consequências imunopatológicas das infecções parasitárias**

As respostas imunológicas algumas vezes ao invés de serem benéficas podem prejudicar o hospedeiro. Na Leishmaniose visceral o aumento da atividade dos macrófagos e linfócitos no fígado e baço leva a hepatomegalia e esplenomegalia. Na esquistossomose, a resposta imunopatológica se deve a formação dos granulomas ao redor dos ovos, comandados pelas células T.

A IgE produzida nas infestações por vermes podem levar uma grande quantidade de mastócitos a degranularem, levando a produção do choque anafilático, como observado no rompimento do cisto hidático na infecção pelo *E. granulosus*.

Pode ocorrer a formação de autoanticorpos como observado nas tripanosomioses e na malária, provavelmente devido a ativação policlonal, com isso acabam sendo produzidos anticorpos para as hemácias, linfócitos e DNA. Pode ainda ocorrer a produção de anticorpos para os parasitas, mas que reagem cruzadamente com os tecidos do hospedeiro, como exemplo, temos a cardiomiopatia, aumento do esfôago e o megacolon observados na Doença de Chagas, que se deve a ação de anticorpos no gânglio nervoso e das células T que reagem cruzadamente com o *T. cruzi*.

A produção em excesso de algumas citocinas pode contribuir para as manifestações clínicas de algumas doenças um exemplo disto está na malária aguda, onde temos febre, anemia, diarreia e alterações pulmonares provavelmente devido a ação do TNF $\alpha$ .

Algumas vezes o poder imunossupressivo de alguns parasitas é tão intenso que torna o hospedeiro susceptível a infecções por vírus e bactérias.

## PRINCÍPIO DOS IMUNOENSAIOS

As técnicas imunológicas se baseiam na reação entre o antígeno e o anticorpo, e baseado neste princípio, qualquer molécula que se comporte como um antígeno pode ser identificada por estas técnicas.

Nas reações de precipitação uma das características da reação entre o antígeno e o anticorpo, é que o complexo formado entre o antígeno e o anticorpo se precipita em proporções combinadas ou próximo a zona de equivalência. Isso é melhor observado na reação de precipitina, onde um antígeno e um anticorpo são misturados em solução, tendo a concentração de anticorpo fixa, vai se aumentando aos poucos a quantidade de antígeno. Aos poucos o número total de imunocomplexos vai aumentando e depois começa a diminuir. Se for feito um gráfico da reação de precipitina, teremos este dividido em três zonas diferentes, numa primeira etapa, temos o excesso de anticorpo, nesse caso a quantidade de antígeno é insuficiente para se complexar com todos os anticorpos, logo não observamos a precipitação. Em uma segunda etapa, temos quantidades equivalentes de antígeno e anticorpo, logo ocorre a precipitação de todo antígeno e anticorpo presente. Por fim, numa terceira etapa, temos mais antígeno do que anticorpo, e isto leva a redução do volume precipitado, pois ocorre a solubilização do complexo antígeno anticorpo formado devido ao excesso de antígeno presente. Este fenômeno ocorre *in vitro* com todas as reações que envolvam a formação do complexo antígeno-anticorpo, e por isso, as vezes obtemos resultados falso negativos, quando não diluímos um soro o suficiente, pois ocorre um fenômeno chamado de **pró zona**, onde há tanto anticorpo, que a reação frente a um antígeno não ocorre de maneira adequada, que permita ser visualizada.

A maioria dos imunoenaios pode ser dividida em dois grandes grupos, são eles os métodos competitivos e os métodos não competitivos.

Nos métodos competitivos, a substância a ser analisada (analito) e uma substância igual a que será analisada só que marcada (marcador), são misturadas junto com um anti-analito (anticorpo para a substância a ser analisada). Após a incubação por um determinado tempo, se mede a quantidade de marcador ligado ou a concentração de analito presente na amostra.

Nos métodos não competitivos, um excesso de imunoreagente (pode ser anticorpo ou antígeno), é adicionado, de forma que o analito forme um imunocomplexo com o imunoreagente. O imunocomplexo é então quantificado e relacionado com a quantidade de analito presente na amostra.

Os métodos não competitivos são mais sensíveis que os métodos competitivos. A sensibilidade da detecção feita pelos ensaios competitivos é limitada pela concentração de anticorpo usado, por outro lado a sensibilidade dos métodos não competitivos é determinada pela ligação não específica dos imunoreagentes marcados. Os métodos não competitivos podem ser usados para a detecção de uma molécula simples desde que sejam usados marcadores facilmente detectáveis e com baixa ligação não específica.

Tanto os métodos competitivos quanto os não competitivos requerem a medição dos imunocomplexos na presença de anticorpos e/ou antígenos livres. Nos imunoenaios “heterogêneos” (competitivos ou não competitivos), isto é feito se separando os imunocomplexos dos imunoreagentes livres. Nos imunoenaios “homogêneos”, a modulação do sinal ocorre como resultado da imunoreação, além do mais a formação dos imunocomplexos pode ser detectada sem a separação do imunoreagente ligado ou livre.



## Ensaio Competitivos

### a) Com a imobilização do anticorpo

Neste tipo de imunoenensaio o anticorpo para o analito em questão é fixado em um suporte sólido (placa de poliestireno, micropérolas, tubos, etc), por adsorção ou por ligação covalente. Os sítios livres do suporte sólido, que poderiam ligar substâncias inespecíficas, são **bloqueados** com uma proteína como a albumina, a fim de evitar interferência na reação. A amostra com o analito é então colocada no suporte sólido junto com o marcador (uma substância igual ao analito só que marcada). O analito então compete com o marcador pelos anticorpos fixados no suporte sólido. Após um período de incubação, o suporte sólido é lavado para fazer a remoção dos reagentes que não se ligaram e em seguida se procede a leitura do sinal que o marcador emite. Este sinal é inversamente proporcional a quantidade de analito presente, ou seja, quanto mais analito presente, menor o sinal e vice versa.

O anticorpo para o analito usado deve ser o mais específico possível senão teremos a ligação de substâncias não específicas a ele, o que leva a reação com resultado falso positivo. Se o anticorpo puder ser marcado com biotina ou um hapteno (como substâncias com os grupos nitrofenil), sem que haja uma redução significativa de sua afinidade, então a fase sólida recoberta com estreptavidina ou um anticorpo para hapteno pode ser utilizado. A vantagem de se fazer isso é que esta configuração pode ser aplicada para diferentes tipos de ensaio.

A fase sólida também pode ser recoberta com anticorpos com afinidade para a porção Fc dos anticorpos para o analito (anti analito). Por exemplo, pode-se usar anticorpos de cabra específicos para a porção Fc de anticorpos de coelho específicos para o analito a fim de revestir o suporte. Esta configuração assegura que o anticorpo para o analito será fixado ao suporte sólido pela porção Fc e deste modo ficará disposto de forma apropriada para se ligar ao analito com maior eficiência. Consequentemente menos anticorpos para o analito são necessários para cada ensaio quando comparamos com o método direto (anticorpo para o analito fixado no suporte).

Quanto mais tarde se adiciona o marcador após a adição do analito, melhor será o resultado obtido com a reação, aumentando-se assim a sensibilidade. Neste caso o melhor procedimento é se incubar a fase sólida com o analito, até que o equilíbrio seja alcançado, e posteriormente se adicionar o marcador e proceder nova incubação para que se alcance um novo equilíbrio.

### b) Com a imobilização do antígeno

Antígenos proteicos podem ser imobilizados diretamente nos suportes de poliestireno por adsorção física desde que estejam purificados. No caso dos haptenos, estes são inicialmente ligados a proteína carreadora e então incubados com a fase sólida. Após o bloqueio, se adiciona a amostra e o anticorpo marcado específico para o analito. O analito presente na amostra compete com o analito imobilizado por um determinado número de anticorpos marcados. Esta reação termina com a lavagem do suporte sólido a fim de remover os anticorpos não ligados ao analito fixado no suporte

sólido. Quanto maior a quantidade de analito na amostra menor será a quantidade de anticorpos marcados ligados a fase sólida.

Se a marcação direta dos anticorpos para o analito não for possível, então pode-se usar um anti-soro bruto. Assim que a imunoreação é completada, a detecção do anticorpo ligado a fase sólida é feita se usando uma anti globulina marcada.

## **Ensaio Não Competitivos**

### **a) Ensaio tipo sanduíche (dois sítios)**

Estes ensaios são usados para a detecção de antígenos macromoleculares, onde a ligação simultânea de dois anticorpos ao antígeno é possível sem a interferência estérica. A amostra é colocada no suporte sólido o qual está recoberto com anticorpos específicos para o analito (anticorpos de captura) e posteriormente bloqueada. Posteriormente se procede a incubação para que o anticorpo se ligue ao analito e em seguida se procede a lavagem para remover tudo que não se ligou. Agora em uma segunda etapa se adiciona um excesso de anticorpos marcados para o analito (anticorpos de detecção) e procede-se nova incubação. Feito isso se lava o suporte sólido para a remoção dos anticorpos que não se ligaram e se procede a leitura dos anticorpos ligados. A esse processo se dá o nome de ensaio sanduíche de duas fases. A quantidade de analito presente na amostra corresponde a quantidade de anticorpos detectada na fase final.

Neste ensaio também pode se adicionar a amostra junto com o anticorpo marcado a fim de se reduzir uma etapa no processo e por isso chamado de processo de sanduíche de uma etapa. A leitura e a interpretação desse processo se dá da mesma forma que o processo de duas fases. Este processo de uma fase, embora rápido, pode apresentar problemas, como quando a concentração de analito supera a quantidade de anticorpos de captura e de detecção, dando valores inferiores ao que poderia se observar. Pois neste caso o anticorpo de captura (aquele presente na fase sólida), fica saturado e uma grande quantidade do analito fica em solução. A detecção do anticorpo é distribuída entre as duas fases do analito. Os imunocomplexos formados em solução são lavados na etapa seguinte a incubação e assim, uma pequena quantidade dos anticorpos de detecção fica ligada ao analito que se ligou ao anticorpo da fase sólida, logo o sinal detectado será menor.

Casos como estes em que há grande quantidade de analitos, levando a um resultado baixo é observado ao se dosar marcadores tumorais em pacientes com câncer, onde os altos níveis de marcadores presentes nas amostras dão origem a um sinal baixo nos ensaios não competitivos de um passo.

Este efeito da grande quantidade de analito, pode ser detectado, se repetindo a dosagem da análise com a amostra diluída. A amostra diluída dá um sinal maior se houver o excesso de analito. Alternativamente, a amostra é analisada após a adição de uma solução padrão concentrada do analito. Quando o efeito do excesso de analito está presente, este pode ser eliminado se

aumentando a concentração do anticorpo de detecção até o ponto em que haja um excesso deste em relação ao analito. No entanto a diminuição da sensibilidade pode ser observada devido a ligação não específica associada a alta detecção de anticorpos marcados. Pode-se minimizar isto diluindo-se as amostras várias vezes antes de proceder o ensaio, desde que a sensibilidade do teste permita isto.

Os ensaios de duas etapas fazem uso de dois anticorpos monoclonais específicos para diferentes epítomos dos antígenos. Contudo a combinação de anticorpos monoclonais com policlonais pode ser usada. Algumas vezes os mesmos anticorpos policlonais podem ser usados como anticorpos de captura e detecção.

Como os ensaios de duas etapas usam dois anticorpos, eles apresentam melhor especificidade que os métodos de competição. Na verdade substâncias que reagem cruzadamente interferindo com os ensaios competitivos, não chegam a interferir nos ensaios de duas etapas porque normalmente estas substâncias não se ligam aos dois anticorpos de captura e de detecção.

#### **b) Imunoensaios para anticorpos específicos e ensaios de captura de classes de imunoglobulinas**

Ensaios não competitivos usados na determinação de anticorpos específicos são incluídos neste grupo. A fase sólida é recoberta com o antígeno. Antígenos proteicos também podem ser usados para recobrir o suporte sólido, onde os haptenos são primeiramente conjugados com proteínas carreadoras. A amostra diluída é incubada junto com a fase sólida. O anticorpo ligado a fase sólida é então quantificado usando-se uma anti globulina marcada. Este tipo de ensaio é especialmente útil na pesquisa de hibridomas para a produção de anticorpos monoclonais.

Nos ensaios de captura de classe de imunoglobulina, a fase sólida é recoberta com anticorpos para a classe que se deseja quantificar presentes na amostra. Após a incubação da amostra com a fase sólida se procede-se a lavagem que irá remover tudo que não se ligou por não ser específico. Posteriormente o antígeno de interesse é adicionado e capturado pelos anticorpos específicos ligados na fase sólida. A ligação do antígeno é determinada pela adição de um anticorpo marcado para o antígeno. Como exemplos deste tipo de ensaio temos a determinação de IgM no diagnóstico da infecção aguda e a determinação de IgE para alguns alérgenos específicos.

Os ensaios de captura de classe de imunoglobulinas são mais específicos se comparados com aqueles que empregam o antígeno fixado no suporte sólido, especialmente para anticorpos de classes que se apresentam em pequena quantidade, já que todos os outros anticorpos são removidos antes da adição do antígeno.

#### **c) Mapeamento de epítomos**

Nos casos em que temos vários anticorpos monoclonais para o mesmo antígeno, pode ser necessário se determinar se eles se ligam a diferentes epítomos que se sobrepõe. Uma fase sólida recoberta com o antígeno purificado é incubado com anticorpos monoclonais marcados junto com diferentes concentrações de outro anticorpo monoclonal, só que este não está marcado. Se os dois anticorpos se ligarem ao mesmo epítomo sobreposto, então, devido a competição que ocorre entre

eles o sinal diminui conforme a concentração do anticorpo não marcado aumenta. O sinal permanecerá o mesmo se os dois anticorpos se ligarem a diferentes epítomos.

Uma configuração levemente modificada pode ser usada se uma preparação antigênica purificada não estiver disponível para recobrir o suporte sólido. Nesse caso, o anticorpo monoclonal para o antígeno desejado, é colocado para recobrir o suporte sólido. Posteriormente se adiciona a solução antigênica não purificada, procede-se a incubação e a lavagem para a remoção de tudo que não se ligou, incluindo-se aí as proteínas inespecíficas. Posteriormente se adiciona o anticorpo monoclonal marcado junto com o anticorpo monoclonal não marcado e incuba-se a amostra. A interpretação da leitura se dá do mesmo modo que no procedimento descrito acima.

### **Imunoensaios Para Antígenos Imobilizados na Fase Sólida**

Este grupo envolve a detecção de proteínas antigênicas em Western Blots. As proteínas são primeiramente separadas por um gel de poliacrilamida e transferidos por eletroeluição para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é então incubada com uma solução proteica como albumina ou leite desnatado, a fim de bloquear os espaços vazios da nitrocelulose. A seguir se adiciona o anticorpo de interesse para a proteína, incuba-se por um determinado tempo e posteriormente se procede a lavagem do excesso de anticorpo, e o imunocomplexo formado é detectado pela adição de uma imunoglobulina para o anticorpo que se ligou ao antígeno. Este procedimento oferece alta sensibilidade, maior até do que se usasse um anticorpo marcado específico para o antígeno. Existem outras técnicas para detecção de imunocomplexos só que estas serão descritas aos poucos, conforme a necessidade.

Nas reações de imunoblot podemos lançar mão de anticorpos monoclonais ou policlonais. Claro que os anticorpos monoclonais são mais específicos mas eles podem falhar quando se trata de fazer a ligação com proteínas que tenham se desnaturado durante a eletroforese. Por outro lado, o soro policlonal contém anticorpos que interagem com epítomos que permaneceram intactos após a eletroforese e/ou transferência. Além do mais, mais de um anticorpo pode se ligar a mesma molécula antigênica. Deste modo os anticorpos policlonais oferecem maior sensibilidade e por isso são mais usados no imunoblot.

A maioria dos marcadores usados são enzimas como a fosfatase alcalina e peroxidase. As enzimas se convertem de um substrato solúvel em um produto colorido, fluorescente ou quimioluminescente. Como exemplo citamos a diaminobenzidina, que é um doador de hidrogênio para a peroxidase, e por isso adquire uma cor marrom, também a mistura de fosfato de bromocloroindol com o azul de nitrotetrazol, dá um precipitado de cor púrpura, pode ser usado como substrato para a fosfatase alcalina.

### **Imunoensaios Não Competitivos Para Moléculas Pequenas**

#### **a) Ensaios de dois sítios para Haptenos com Grupos Amino**

Neste tipo de ensaio, substâncias contendo o grupo amino na amostra são inicialmente **biotiniladas** se usando o ester de biotina N-hidroxisuccinimida em excesso. Feito isso a amostra é incubada com um anticorpo para o Hapteno que está recobrando a fase sólida. Nesta etapa o Hapteno biotinilado é capturado pela fase sólida, sendo que a biotina livre com algumas moléculas biotiniladas são lavadas após um tempo de incubação. Posteriormente os imunocomplexos são dissociados no pH 1,0 e a solução é posta para reagir frente a anticorpos para o Hapteno marcados com uma enzima que é capturada por uma fase sólida recoberta com estreptavidina. A atividade da enzima ligada a fase sólida é relacionada diretamente a concentração de hapteno presente na amostra.

Esta configuração só será bem sucedida se o sítio de biotilação estiver longe o suficiente do sítio onde está o epítopo, a fim de permitir a ligação simultânea da estreptavidina e do anticorpo para o Hapteno. Oligopeptídeos constituídos de 9 aminoácidos foram determinados por este método em concentrações inferiores a 50 amol. Haptenos pequenos, como a Tiroxina, podem ser determinados por este método apenas se for introduzido um “espaçador” entre a porção biotinilada e o sítio do epítopo. Este tipo de ensaio chega a ser até 50 vezes mais sensível que os ensaios de competição usando os mesmos anticorpos marcados.

#### **b) Ensaio idiométrico**

Neste tipo de ensaio a amostra é pipetada em uma fase sólida recoberta com um anticorpo para o Hapteno (anticorpo primário). Após a reação imune ter se completado, se adiciona um anticorpo para idiótipo do tipo  $\beta$ , o qual irá se ligar aos sítios de ligação primários livres do anticorpo. Após a lavagem se adiciona um anticorpo para idiótipo do tipo  $\alpha$ , que se ligará aos complexos primários do anticorpo/Hapteno. Este anticorpo só não se ligará ao anticorpo primário da fase sólida se o anticorpo do tipo  $\beta$  já estiver ligado ao anticorpo da fase sólida. O sinal medido é proporcional a concentração de Hapteno presente na amostra.

#### **c) Imunoensaios com o epítopo fixado à fase sólida (SPIE-IA)**

Esta é uma configuração de imunoensaio proposta nos últimos anos para pequenos Haptenos contendo grupos amino livres, os quais não fazem parte da estrutura do epítopo. O hapteno é primeiramente capturado por uma fase sólida recoberta com anticorpos para o Hapteno. O Hapteno é então covalentemente ligado as proteínas da fase sólida, isto é ao anticorpo e as proteínas de bloqueio. Isto é acompanhado se usando um reagente homobifuncional de ligação cruzada para grupos amino primários, como o glutaraldeído ou disuccimidil suberato. A reação acontece em condições amenas as quais não rompem o complexo hapteno-anticorpo. A etapa de desnaturação segue com a adição de metanol ou ácido clorídrico, que serve para dissociar o imunocomplexo e expor o Hapteno imobilizado a detecção do anticorpo. O mesmo anticorpo monoclonal, marcado com acetilcolinesterase, é usado da mesma forma que na detecção do anticorpo. Ensaios deste tipo parecem ser de 70 a 200 vezes mais sensíveis que os ensaios de competição que empregam os mesmos anticorpos fixados a fase sólida e um hapteno conjugado a acetilcolinesterase como marcador.

#### **d) Ensaios de ligação de fase líquida (LBA)**

Neste tipo de ensaio a reação ocorre em solução. O analito reage com excesso de anticorpo marcado com peroxidase. Após a reação ter se completado, as formas ligadas e livres do anticorpo são separadas por cromatografia líquida de alto desempenho em uma coluna de troca catiônica. A reação enzimática pós coluna é realizada se misturando o substrato com o líquido que sai da coluna passando em uma bobina, seguido por uma detecção fluorimétrica.

No caso de antígenos macromoleculares, a separação dos imunocomplexos dos anticorpos livres pode ser feita com a filtração em gel de uma cromatografia líquida de alta performance, já que a massa molecular do imunocomplexo é muito maior que a do anticorpo livre.

### **DETECÇÃO INDIRETA DE IMUNOCOMPLEXOS**

Neste caso a molécula carreadora do sinal ou geradora do sinal, como os radioisótopos, enzima ou marcadores fluorescentes ou quimioluminescentes, não estão ligados diretamente a um dos imunoreagentes, mas estão ligados de forma não covalente e especificamente ao imunocomplexo assim que a reação se completa.

A maior vantagem dos sistemas empregando a detecção indireta é que a mesma molécula reveladora carregando o imunoreagente pode ser usada em uma variedade de imunoenaios. Além disso, o uso de sistemas de detecção indireta geralmente são responsáveis por ensaios de alta sensibilidade, uma vez que mais moléculas carreadoras de sinal, se ligam ao imunocomplexos do que em ensaios onde a detecção do anticorpo está diretamente conjugado a molécula sinalizadora.

#### **a) Detecção de imunocomplexos com uma imunoglobulina marcada**

Neste tipo de ensaio o anticorpo de detecção não está marcado. Após a formação do imunocomplexo, um anticorpo marcado para antiglobulina é adicionado, este se ligará as regiões constantes não variáveis do anticorpo. Esta técnica é especialmente útil quando a marcação direta do anticorpo de detecção é difícil e resulta na perda de imunoreatividade. Anticorpos para imunoglobulinas de várias espécies, marcados com moléculas fluorescentes ou enzimas estão disponíveis no comércio a um custo relativamente baixo. Além do mais esta configuração promove a amplificação do sinal mais do que se uma imunoglobulina marcada para cada antígeno fosse usada. Em suma, uma simples molécula de imunoglobulina marcada pode ser usada para detecção de vários anticorpos da mesma espécie.

O pré requisito para a configuração acima é que os anticorpos de captura e de detecção sejam de espécies diferentes, de forma que a imunoglobulina marcada não reaja com o anticorpo de captura fixado no suporte sólido. Alternativamente, fragmentos de Fab ou F(ab)<sub>2</sub>, são empregados como anticorpos de captura junto com anticorpos marcados para a região Fc do anticorpo de detecção.

#### **b) Proteína A**

A proteína A é uma proteína de 42kDa encontrada na parede celular do *Staphylococcus aureus*. Ela se liga com alta afinidade a região Fc das imunoglobulinas de várias espécies. Existem 4 sítios de ligação para os anticorpos, mas apenas dois deles podem ser usados simultaneamente. A proteína A marcada é útil na detecção indireta de antígenos imobilizados em um suporte sólido. Nestes ensaios, um anticorpo de detecção não marcado é adicionado a fase sólida e então o imunocomplexo formado é quantificado com a proteína A marcada.

A proteína A também pode ser usada para a detecção de imunocomplexos em ensaios tipo sanduíche, assegurando que fragmentos Fab são usados ao invés do anticorpo total para recobrir o suporte sólido. A proteína A não marcada também pode ser usada como ponte entre duas moléculas de anticorpo, isto é, para a detecção de anticorpo do imunocomplexo e do anticorpo marcado.

A afinidade da proteína A para imunoglobulinas depende da classe da imunoglobulina e a que espécie ela pertence. Por exemplo, a proteína A tem baixa afinidade para imunoglobulinas IgG<sub>1</sub> de ratos, e tem alta afinidade pelas imunoglobulinas de humanos e de coelhos.

### c) O sistema Biotina-Estreptavidina

Conjugados de estreptavidina com enzimas como a Fosfatase alcalina, peroxidase ou moléculas fluorescentes estão comercialmente disponíveis. Anticorpos podem ser marcados com várias biotinas sem que haja uma perda significativa de sua capacidade de se ligar ao antígeno. Consequentemente, mais de uma molécula de estreptavidina marcada pode se ligar a cada anticorpo. Além do mais uma amplificação é introduzida a qual resulta no aumento de sensibilidade. Como a estreptavidina possui 4 sítios de ligação para a biotina, ela pode atuar como uma ponte entre duas moléculas biotiniladas. Os imunoreagentes biotinilados e a estreptavidina marcada são estáveis por longo período de tempo. O sistema biotina-estreptavidina pode ser usado para a detecção de imunocomplexos dos seguintes modos:

- a) Os antígenos ou anticorpos de detecção podem ser marcados com biotina. Após a imunoreação ter se completado, o excesso de reagente é removido com uma lavagem e o imunocomplexo é quantificado pela adição da estreptavidina marcada.
- b) Os antígenos ou anticorpos de detecção são marcados com biotina. Após a imunoreação ter se completado, o imunocomplexo é colocado para reagir com um excesso de estreptavidina não marcada. A estreptavidina não ligada é removida com uma lavagem, e posteriormente se adiciona uma molécula biotinilada marcada. Ex: Fosfatase alcalina biotinilada ou peroxidase biotinilada. Neste caso a estreptavidina é usada como ponte entre o anticorpo de detecção biotinilado e a molécula biotinilada marcada.
- c) A estreptavidina é posta para reagir primeiro com uma enzima biotinilada e forma complexos macromoleculares, os quais envolvem várias moléculas fazendo ponte com a estreptavidina. A proporção de streptavidina e enzima biotinilada pode ser otimizada de forma que a estreptavidina não fique saturada e sobre pelo menos um sítio de ligação para os imunoreagentes biotinilados.

**d) Ensaio usando complexos enzima-anti-enzima**

Neste tipo de ensaio, a molécula geradora de sinal são complexos solúveis pré formados de uma enzima com anticorpos para a enzima (anticorpos policlonais ou monoclonais). Estes anticorpos para enzima são da mesma espécie assim como o anticorpo de detecção usado no imunoensaio. Após a imunoreação ser completada os complexos enzima-anticorpo fazem uma ponte com o anticorpo de detecção ao se usar um anticorpo para imunoglobulina. Complexos de Peroxidase-Anti preoxidase (PAP) e Fosfatase alcalina-anticorpo são largamente usados na imunohistoquímica.



## **CONTROLE DE QUALIDADE NOS IMUNOENSAIOS**

A finalidade de um imunoenensaio é que este consiga determinar com precisão a quantidade ou a concentração de analito.

Para os imunoenensaio, o termo **potência estimada** é usado para estimar a concentração do analito, por exemplo, M, ng/ml, mUI/ml. A sensibilidade é definida como a quantidade mínima do analito que pode ser detectada com precisão. Algumas definições de sensibilidade se referem a posição absoluta ou a subida da curva de dose-efeito do que ao limite mínimo de detecção. A especificidade se refere a capacidade do imunoenensaio medir unicamente o analito de interesse. O grau que outros analitos reagem cruzadamente no imunoenensaio é que afetam esta especificidade. A exatidão se refere ao ajuste que ocorre entre a resposta verdadeira e a resposta dada pelo imunoenensaio. A precisão se refere aos resultados em acordo que aparecem em medições repetidas. Nos imunoenensaio, a precisão é normalmente expressa como variação intra e inter-ensaio, calculados como coeficiente de variação.

### **Erros esquemáticos e erros randômicos**

Os erros esquemáticos são detectados nos valores reais ou exatos em ensaios repetidos. Consequentemente, a inexatidão no imunoenensaio se refere a erros esquemáticos. A validação dos imunoenensaio, muitas das vezes se refere a investigação destes erros esquemáticos que podem ocorrer, que devem ser corrigidos ou eliminados. Com relação aos erros randômicos, estes são os que mais afetam a precisão. Os erros randômicos não podem ser eliminados mas podem ser minimizados. Os erros randômicos que se acumulam durante o processamento do imunoenensaio, podem ser quantificados estatisticamente e usados para garantir limites de confiança para expressão dos resultados. A avaliação da qualidade envolve a determinação de que um imunoenensaio está livre de erros sistemáticos assim como a estimativa dos erros randômicos.

### **VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO**

Para se validar um imunoenensaio é necessário se determinar se os valores obtidos com o mesmo estão precisos e corretos. A validação de um ensaio normalmente ocorre em fases. A primeira fase é para a avaliação da sensibilidade e especificidade, a segunda fase é para se investigar a exatidão do imunoenensaio comparando-o com métodos de referência. Um objetivo frequente é obter resultados do desconhecido com o mínimo de manipulação da amostra. Deste modo a validação do imunoenensaio também envolve se saber se a determinação dos constituintes da amostra possuem efeito significativo no ensaio e/ou a identificação de que tipos de preparação de amostra são necessários para se alcançar com exatidão a estimativa de potência. A fase final da validação é limitada a aplicação clínica do imunoenensaio, a fim de saber se ele fornece os dados desejados nas condições desejadas.

### **A sensibilidade do imunoenensaio**

A sensibilidade pode ser definida como a quantidade de analito necessária para produzir uma mudança na resposta a qual é significativamente diferente da resposta obtida na ausência do analito

(dose zero de analito). Se a sensibilidade não for baixa o suficiente para ser útil na aplicação desejada, deve-se considerar a produção ou obtenção de outros reagentes.

Para se saber o quão específico é o imunoensaio, inicialmente se monta um painel com um largo espectro de compostos, em uma alta dosagem, normalmente de 1.000 a 10.000 vezes mais concentrado do que se costuma usar para a montagem de uma curva padrão. Substâncias que apresentam uma inibição mínima para a ligação do analito ao anticorpo ou anticorpos, não reagem cruzadamente de modo significativo. Os compostos que inibem a ligação do analito ao anticorpo em altas doses devem ser examinados em detalhes. A estratégia típica, é de se construir curvas de dose-efeito para aquele do analito usando um teste de similaridade (paralelismo). Este procedimento determina se a substância reage de modo semelhante ao do analito de interesse e a sua relativa potência. Por comodidade, a reação cruzada de uma substância em particular em um imunoensaio é frequentemente expressa em percentagem. Deste modo uma potencia relativa de 0,01 corresponde a 1% de reação cruzada. Um outro meio de se expressar a mesma coisa é dizer que a dose da substância teste é 100 vezes maior do que a dose de referência do analito, levando a mesma resposta no imunoensaio.

Outra estratégia de se determinar a reação cruzada envolve a determinação de uma série de reações as quais contém uma quantidade fixa do analito de interesse (como uma dose que corresponda a aproximadamente metade da curva de dose-efeito). Procede-se uma série de reações, aumentando-se gradativamente as quantidades da substância de teste. A dose da substância de teste que não causa alteração significativa na resposta é obtida como a quantidade máxima da substância de teste que pode estar presente em uma amostra e não interferir com esta na interação analito-anticorpo.

Quando caracterizamos a especificidade de um imunoensaio, é importante que desenvolvamos uma estratégia racional para monitorar a reação cruzada. A fim de ilustrar este ponto, suponha que temos um imunoensaio para a dosagem da Testosterona. Quando construímos ou utilizamos um ensaio para a Testosterona, é essencial sabermos se este ensaio reage cruzadamente com outros hormônios androgênicos como o 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona e androstenediol; metabólitos do androgênio como 5 $\alpha$ -androstenediol, androsterona e eticolanolona; precursores esteroidais como colesterol, pregnenolona, progesterona, 17-hidroxipregnenolona e 17-hidroxiprogesterona; e esteróides em outras classes que costumam estar presentes nos fluídos corporais como estrogêneos, glicorticoídes e mineralocorticoídes. Se o ensaio for usado para medir Testosterona em pacientes que possam estar recebendo esteróides sintéticos, como anticoncepcionais e glicorticoídes sintéticos, a reação cruzada com estas substâncias também deve ser pesquisada. Se o ensaio for utilizado para o uso em uma situação específica onde certos compostos estão presentes em altas concentrações, é desejável que se demonstre que estes não são capazes de interferir. Um exemplo disso está quando se usava o Radio Imuno Ensaio (RIA) para Testosterona para diagnosticar o efeito

das prostaglandinas na produção de andrógenos, era necessário se demonstrar que a Testosterona podia ser medida com exatidão na presença de altas concentrações de Prostaglandinas.

Se um imunoenensaio para pequenos peptídeos está sendo desenvolvido, a reação cruzada de outros peptídeos com estruturas semelhantes deve ser examinada. A especificidade dos imunoenaios para pequenos peptídeos pode normalmente ser determinada se gerando pequenos fragmentos peptídicos de um peptídeo sintético e se examinando a reação cruzada.

O mesmo conceito se aplica a construção de um imunoenensaio para hormônios proteicos. Como exemplo temos os ensaios para a gonadotrofina corionica humana (hCG). O hCG é composto de duas subunidades diferentes, chamadas de alfa e beta. A subunidade alfa é comum aos hormônios pituitários, hLH, hFSH e hTSH. A subunidade beta possui uma sequência de aminoácidos que é muito semelhante a do hLH, a única diferença é que a do hCG possui uma seqüência adicional de 24 aminoácidos na porção carboxi terminal. Uma investigação minuciosa de um ensaio para o hCG deve levar em conta a reação cruzada que pode ocorrer com uma série de proteínas hormonais produzidos pela glândula pituitária anterior e pela placenta assim como outros hormônios presentes nos fluídos corporais.

Uma questão posta sempre em dúvida, é a que porcentagem devemos considerar uma reação cruzada significativa? Reações cruzadas menores que 0,001% (1 em 100.000) não são nenhum problema. Altos percentuais devem ser apreciados de acordo com o caso. Por exemplo, no caso da Testosterona, 5% de reação cruzada para outro andrógeno com uma estrutura semelhante, como o 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, não é motivo de preocupação; na verdade um imunoenensaio que discrimina estes dois andrógenos a este nível é muito útil. No entanto quando o mesmo imunoenensaio será usado para a medição só da Testosterona sem a separação da o 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona do material. Outro exemplo está se queremos dosar a Progesterona durante a gravidez, sem que tenhamos que separar os outros esteróides, nesse caso 1% de reação cruzada é algo a se pensar. Também 10% de reação cruzada do hLH com um kit para determinação de hCG em mulheres grávidas é algo bastante sério, mas se este kit não for usado para mulheres grávidas, ele pode ser usado. Como se vê, a determinação de que percentual de reação cruzada é significativo, depende da aplicação do kit e para que fim diagnóstico se destina.

Outro ponto a se considerar nos imunoenaios é qual epítipo o anticorpo fixado na fase sólida reconhece, pois de acordo com isso saberemos se o kit é mais ou menos específico.

### **A exatidão**

Outra etapa critica dos imunoenaios se refere a sua exatidão, para estabelecer este conceito, devemos comparar os resultados obtidos do novo imunoenensaio com os resultados de um método bem conhecido e padronizado. A escolha de imunoenensaio para determinar um analito em particular é normalmente com o intuito de, para facilitar a colocação da amostra e materiais para reagir. Muitos métodos de referência são complexos e consomem muito tempo na execução pois acabam envolvendo

várias etapas de manipulação. Como medição destes ensaios é feita por métodos químicos ou biológicos, não há uma regra específica para todos os ensaios. No entanto, algumas considerações podem ser feitas, a maioria dos ensaios para esteróides era validada frente a ensaios de cromatografia gás-líquido; imunoenaios para proteínas podem ser validados com bioensaios. Quando se compara os valores obtidos no imunoensaio e do método de referência, deve-se ter conhecimento das limitações, exatidão e precisão do método de referência.

### **Como substâncias constituintes da amostra podem influenciar na estimativa de potência**

Em um imunoensaio, tudo que esteja presente na amostra diferente do analito constitui o que se chama de **matriz da amostra**. Matrizes comuns de amostra incluem soro, plasma, urina, saliva, e extratos de tecidos. Os fluídos corporais são misturas complexas de substâncias que podem interromper o imunoensaio de várias maneiras como: interferindo com a ligação do analito ao anticorpo primário, por competir com o composto ou de uma maneira não específica, por promover um ligante competidor como um esteróide ou proteínas ligantes de tiroide, por interferir com os reagentes usados para separar formas ligadas e livres e/ou por interferir com o sistema de detecção (radiométrico, fluorescente ou enzimático). As matrizes que possuem maior influência nos imunoenaios, normalmente são observados como resultados imprecisos. Por exemplo, o uso de imunoenaios para dosar esteróides no soro ou plasma leva a resultados imprecisos porque a matriz da amostra contém proteínas de alta afinidade para estes hormônios. Outros tipos de efeitos promovidos pela matriz são mais sutis. Se presentes, estes podem ser evidentes de um modo diferente na análise do comportamento das curvas dose-efeito para o analito estudado com uma mistura padrão versus a amostra matriz. No entanto a obtenção de curvas dose-efeito semelhantes ou paralelas não prova que a interferência na amostra se deve ao efeito da matriz presente na amostra. Os testes de similaridade ou paralelismo devem ser interpretados em conjunto com testes de exatidão.

As estratégias para determinar se os efeitos matriz são significantes são:

- i) Comparar as curvas preparadas no tampão diluente com aquelas preparadas com a amostra matriz destituída do analito;
- ii) Determinar se o aumento de amostra do analito adicionada a amostra matriz pode ser quantitativamente recuperada (teste de avidéz);
- iii) Testar os efeitos da adição de quantidades cada vez maiores de matriz, neste caso a matriz representa uma amostra que possui uma quantidade desconhecida de analito.

No primeiro e no terceiro casos, a dificuldade em se montar uma curva dose-efeito com o mesmo tipo de onda (curvas semelhantes ou paralelas), é causa de preocupação. Como forma de tornar os testes de similaridade significativos, eles devem ser aplicados em várias amostras que representem as diferentes classes de amostras que venham a ser analisadas.

Existe um teste que permite uma amostra desconhecida pode ser testada em um nível com uma dose simples onde aliquotas da amostra são misturadas com quantidades crescentes do analito. A

quantidade de analito nas amostras a serem misturadas deve equivaler a quantidade de analito presente na amostra original mais a quantidade a ser adicionada. Este teste é relativamente fraco para a determinação dos efeitos de matriz, pois a matriz é adicionada em um nível e a amostra é normalmente misturada com o analito puro. A demonstração de que quantidades adicionais de amostra matriz reagem de modo semelhante ao analito padrão são mais convincentes.

Se for encontrado o efeito de matriz, o imunoensaio deve ter seu protocolo alterado a fim de evitar esta interferência. Esta revisão pode incluir o preparo de uma nova curva de calibração com uma matriz semelhante a desconhecida mas destituída do analito, ou pode envolver etapas adicionais no preparo da amostra.

### **Como saber se o imunoensaio fornece uma resposta confiável**

A fase final da validação de um imunoensaio, é proceder um teste com o mesmo se lançando mão de amostras selecionadas para tal. Por exemplo, supondo que o teste seja para determinação do hCG como confirmação de gravidez, mas se deseja utiliza-lo para a determinação do hCG produzido em alguns tumores. Para isso amostras do soro de homens e mulheres não grávidas devem dar resultados negativos. Já as amostras de mulheres em diferentes etapas da gravidez devem ser positivas e as concentrações obtidas devem ser equivalentes ao do método de referência. Amostras de pacientes que apresentam tumores produtores de hCG devem ser positivas e amostras de pacientes com tumores, mas não produtores de hCG devem ser negativas. Nesta fase de validação do imunoensaio, a escolha de amostras de referência deve é muito importante, já que os resultados oriundos de tais amostras serão usados para estabelecer os valores normais do ensaio e os limites de detecção do mesmo.

## **OUTRAS MEDIDAS PARA GARANTIR QUALIDADE**

### **Com relação a amostra**

A coleta da amostra também assegura o bom controle de qualidade, ela pode afetar a exatidão e a interpretação dos resultados. As amostras assim que entram no laboratório devem ter a identificação com dados precisos, estar acondicionado de forma apropriada, sem vazamentos e nem estar com material em falta para as análises que se deseja fazer.

Em geral as interferências relativas ao material envolvem o material com hemólise, lipêmico ou com excesso de bilirrubina. No caso do soro icterico é difícil se rejeitar o mesmo pois geralmente se origina de algum estado patológico do paciente. Já o material hemolisado, na maioria das vezes envolve a coleta mal realizada ou a separação do soro antes da retração completa do coágulo e por isso se recomenda a inspeção do coletador. Quanto ao soro lipêmico, já foi descrito que se for feita a centrifugação a alta velocidade do soro, boa parte desta pode ser removida.

### **Com relação ao acondicionamento do kit**

O kit deve ser acondicionado nas condições adequadas para preservação do mesmo, sempre seguindo as recomendações do fabricante. Uma medida que muitos não tem em mente, por não

conhecer o funcionamento dos refrigeradores, é o acondicionamento de kits em geladeiras do tipo frost-free, este tipo de equipamento não é o ideal devido a grande variação de temperatura para os degelos constantes, que ocorre neste. Esta característica dos equipamentos frost-free, faz com que a vida útil do kit diminua. Também medidas como acondicionar o kit com a data de chegada deste no laboratório garante o controle do mesmo. Antes de se usar um kit novo deve-se colocar a data de abertura do mesmo e testa-lo com algumas amostras de valores conhecidos e se estabelecer uma curva dose-efeito a fim de se observar se não há diferenças significativas entre o kit antes usado e o novo.

Deve-se também observar a qualidade da água reagente, o Comitê Internacional de Padrões para Laboratórios Clínicos classifica a água em três tipos, a saber I, II e III. A água tipo III é usada para a lavagem de vidraria e rinsagem primária, a do tipo II é usada para preparações de corantes e reagentes a serem esterelizados e, por fim, a água do tipo I que deve ser usada para os procedimentos laboratoriais, preparo de soluções padrão, eletroforese e imunoenaios. A tabela abaixo apresenta as características que cada tipo de água deve ter.

| <b>Especificação</b>                            | <b>Tipo I</b>                       | <b>Tipo II</b>    | <b>Tipo III</b>   |
|---|-------------------------------------|-------------------|-------------------|
| Nível máximo de bactérias (CFU/ml)              | 10                                  | 1000              | Não significativo |
| pH  | Não significativo                   | Não significativo | 5,0 a 8,0         |
| Resistividade mínima (MΩ cm a 25°C)             | 10 (em linha)                       | 1,0               | 0,1               |
| Máximo de silicatos (mg de SiO <sub>2</sub> /L) | 0,05                                | 0,1               | 1,0               |
| Contaminantes orgânicos                         | Passar por filtro de carvão ativado | Não significativo | Não significativo |
| Material particulado                            | Não deve ser superior a 0,22μm      | Não significativo | Não significativo |

### **Com relação aos padrões**

Existem três tipos de padrão que costumam ser usados no laboratório, os padrões primários, secundários e os materiais de referência. Os padrões primários são aqueles em que há uma certa quantidade de um analito e pode ser usado para se determinar a concentração direta e tem um coeficiente de atividade de 1. Os padrões primários normalmente são preparados em água ou em soluções proteicas com solventes orgânicos.

Os padrões secundários são determinados em comparação com um padrão de valor já conhecido realizado em um método de referência conhecido.

Os materiais de referência, são aqueles usados na calibração de aparelhos, validar um ensaio ou estabelecer valores aos materiais. Os materiais de referência podem ser vacinas com a quantidade

de antígeno expressa em unidades ou esferas de látex, muito usadas para a quantificação de partículas. Outro tipo de material de referência podem ser os materiais certificados, são materiais válidos para uma determinada técnica e são acompanhados da documentação apropriada quanto a seu uso.

## **INTERFERÊNCIAS NOS IMUNOENSAIOS**

A exatidão de um imunoenensaio pode ser comprometida por uma variedade de substâncias interferentes. Esta interferência pode ser positiva ou negativa e pode variar em magnitude dependendo da concentração da substância interferente presente na amostra. Estas fontes de interferência podem ser devido a reação cruzada, anticorpos endógenos, antígenos mascarados, interferência com os mecanismos indicadores (como inibidores enzimáticos nos imunoenaios que usam enzimas) e ao efeito matriz.

### **Detectando as interferências**

A detecção de uma interferência pode ser muito difícil, pois esta pode promover dados sem a devida exatidão. No entanto, nem sempre nos sabemos a real concentração do analito em uma amostra desconhecida, e deste modo não temos base para julgar a exatidão de um resultado. A melhor oportunidade para detectar e caracterizar interferências é durante a avaliação de um ensaio.

### **Detectando interferências durante a avaliação de um ensaio**

Várias análises de rotinas executadas durante a avaliação de um ensaio permitem a detecção de interferências, a estratégia é identificar amostras com prováveis interferências presentes e então caracteriza-las ou no mínimo determinar em que condições se suspeita que a interferência aparece. Em estudos de comparação (se utilizando de dois métodos de análise), amostras apresentando resultados inesperados, são aquelas possíveis de ter um interferente. A fim de aumentar as chances de detectar estas amostras, deve-se incluir amostras de pacientes com doenças de fígado e baço e de pacientes com anticorpos interferentes como o Fator Reumatóide, Anticorpos Anti Nucleares e Anticorpos para Ratos. Após identificar resultados fora dos limites para estudos futuros e remover estes pontos das análises estatísticas, um coeficiente de baixa correlação pode indicar a interferência que está contribuindo para a dispersão.

A fim de identificar as possíveis interferências presentes, as amostras podem ser colocadas em dois grupos, aqueles com o sinal mais positivo e aqueles com o sinal mais negativo. É importante ter em mente que a interferência está sendo feita em um método por comparação; se a interferência afeta os dois métodos de forma equivalente ela não pode ser detectada pelo estudo comparativo.

Em estudos de linearidade, geralmente citados como testes de paralelismo como no caso dos imunoenaios, a não linearidade sobre a diluição normalmente indica a presença de algum tipo de interferência, este efeito é diminuído pela diluição. Geralmente uma ou mais amostras com uma alta concentração de analito é diluída com o solvente recomendado ou uma amostra com baixa concentração do analito. Em suma estas amostras identificadas pelo método da comparação como possivelmente tendo interferentes devem ser retestadas após a diluição. É bom ressaltar que se a não linearidade reflete a presença de substâncias interferentes, a linearidade não exclui a presença destes.



Em estudos de recuperação, uma determinada quantidade do analito puro é aplicada em uma pequena quantidade da amostra com alta concentração do analito, e esta amostra é analisada a fim de saber se é possível recuperar em resultado, a quantidade a mais do analito adicionada (aumento de concentração). Resultados diferentes daqueles que apresentam 100% de recuperação podem indicar a atribuição incorreta dos valores do calibrador ou a presença de uma substância interferente. Assim como nos estudos de linearidade, os estudos de recuperação devem ser realizados com amostras identificadas no método de comparação e, se possível contendo alguma substância interferente.

É claro que os interferentes mais comuns como lipemia, icterícia e hemólise, também devem ser incluídos no estudo. Algumas vezes os efeitos destes possíveis interferentes podem ser observados quando se faz o estudo por comparação de métodos. Se estas amostras forem fora dos limites é possível de que não haja interferência ou que ambos ensaios apresentem o mesmo grau de interferência.

Sempre que espécimes com substâncias interferentes são identificados, devemos obter dados laboratoriais e informações clínicas do paciente, especialmente em doenças agudas e crônicas e quando se está fazendo uso de medicamentos. Esta informação oferece indícios para a provável causa de interferência além do que amostras de outros pacientes com os mesmos indícios podem ser obtidas para estudos comparativos e assim ajudar a identificar a substância interferente.

Mudanças no grau de interferência numa série de amostras do mesmo paciente podem ser comparadas com o curso clínico do paciente e com a dosagem do medicamento, o que fornece indícios para a causa da interferência. Finalmente, a tentativa de separar o analito da substância interferente ou de separar formas heterogêneas do analito podem ser realizadas por vários métodos de extração, cromatografia ou eletroforese.

### **Detectando interferências durante a rotina**

Durante uma rotina não se tem idéia de que substância está causando a inexatidão dos resultados. Normalmente a única indicação que se tem é que os resultados não estão de acordo com os dados clínicos do paciente. É importante lembrar que a substância interferente pode provocar resultados falsamente normais enquanto que o resultado real pode ser mais alto ou mais baixo. A avaliação inicial das interferências pode identificar algumas condições clínicas ou certas terapias com drogas nas quais a interferência é comum. Este tipo de resultado deve ser examinado com mais cuidado. Algumas vezes métodos automatizados fornecem resultados de leitura zero, a qual, se for atípica, pode ser devido a presença de um interferente. Em ensaios que fornecem uma alta frequência de resultados anômalos, se faz necessário testar as causas de interferência prováveis, como testar a ligação não específica e proceder duas diluições das amostras.

## **REAÇÕES CRUZADAS E ANALITOS HETEROGÊNEOS**

Um bom imunoenensaio depende de sua sensibilidade e especificidade da ligação antígeno-anticorpo. Em alguns casos esta especificidade é comprometida porque moléculas com epítomos idênticos ou semelhantes conseguem se ligar ao reagente de captura, promovendo o que chamamos de reação cruzada. Os problemas e as soluções para as interferências associadas as múltiplas formas do analito (formas isoméricas e parcialmente degradadas), são semelhantes à aquelas causadas pela reação cruzada.

### **Fontes de Reação Cruzada**

As fontes de reação cruzada são tantas que não nos é possível descrever todas, por isso serão citadas apenas algumas das principais.

#### **Reação cruzada com analitos grandes**

Para grandes analitos como proteínas a reação cruzada se deve principalmente a presença de múltiplas proteínas com estrutura semelhante ou a proteínas heterogêneas, um exemplo disso está nos hormônios glicoprotéicos como o hCG, LH e FSH, devido a sua subunidade  $\alpha$  comum em todos. Atualmente estas reações cruzadas praticamente foram eliminadas devido ao desenvolvimento de antissoros para a subunidade  $\beta$ . Atualmente também já se conhecem múltiplos variantes destes hormônios protéicos como no caso do hCG, onde se sabe que existem formas livres das subunidades  $\beta$ , variantes do carboidrato e varias formas parcialmente degradadas, também já se conhecem os precursores destes hormônios que estão presentes no soro e as variantes genéticas que podem vir a estar presentes. Por causa disto, alguns epítomos podem não estar presentes e isto pode alterar o resultado do exame. Exemplo disto esta no LH, que se tiver formas genéticas diferentes no soro, em alguns ensaios ele não é detectado.

A heterogeneidade de uma proteína e as variações de sua relativa distribuição em diferentes formas em amostras diferentes do mesmo paciente e em diferentes pacientes em datas diferentes, podem causar diferenças significativas na exatidão dos resultados. Este problema pode ser ainda maior se o analito usado nos calibradores não for o mesmo presente no soro dos pacientes. Quando isto acontece, a amostra não pode ser diluída em paralelo com os calibradores, pois isto leva ao erro através do limite analítico. Um exemplo disto está ao se dosar as cadeias leves de imunoglobulinas monoclonais (proteína de Bence Jones) em uma urina, como existem diferentes calibradores, com diferentes afinidades para um tipo de cadeia leve, se a imunoglobulina da urina não for a mesma, podemos ter dosagens acima ou abaixo do esperado.

#### **Reação cruzada com analitos pequenos**

Os analitos pequenos podem ser hormônios não protéicos, vitaminas e drogas como exemplo citamos alguns hormônios esteroídais que apresentam uma estrutura muito semelhante e possuem múltiplos metabólitos com estrutura semelhante. Isto acaba se refletindo nos ensaio de dosagem de

esteróides na urina, devido a presença destes metabólitos. Por exemplo, a Ciclosporina A possui uma quantidade enorme de metabólitos, que mesmo que se use um ensaio com anticorpos monoclonais para capturar a Ciclosporina, alguns destes metabólitos podem interferir com o ensaio. Outro exemplo está na dosagem do Fenobarbital, se na amostra tiver também o Pentobarbital, este pode interferir com a exatidão do resultado dando valores mais altos. Outro exemplo, está quando dosamos anfetaminas, se o paciente estiver tomando medicamento como clopromazina, ou adoçantes com ciclamato, os metabólitos destes podem interferir com o resultado, dando um valor maior do que o existente.

### **Reações cruzadas com moléculas em estádos patológicos**

Em casos como doenças renais ou hepáticas, a concentração de moléculas que podem reagir cruzadamente em um ensaio pode estar aumentada, isto porque estas geralmente são metabólitos do analito e também porque o fígado e o rim tem participação na produção e excreção destes analitos. Nós observamos maior interferência na dosagem de drogas quando temos doenças que afetam o fígado e o rim. Interferências positivas nos ensaios para Teofilina e Fenitoina ocorrem em pacientes com falha renal. Nos ensaios para digoxina se observa a interferência do Fator Imunorreativo Parecido com digoxina que aparece em pacientes com doença renal, hepática, mulheres grávidas ou neonatos.

No caso de antígenos glicoprotéicos as mudanças na doença se devem geralmente a pequenas divisões no carboidrato. Por exemplo a concentração do Antígeno Carcioembriogênico (CEA) pode aumentar devido ao câncer coloretal ou doença do fígado e as diferenças na divisão do carboidrato são diferentes nos dois casos. Algumas vezes mudanças relacionadas a divisão dos carboidratos de glicoproteínas podem ser usadas para o diagnóstico diferencial como acontece quando se usa a transferrina deficiente de carboidrato para o diagnóstico de alcoolismo ou, como no caso em que a Concaivalina A específica prostática é utilizada para o diagnóstico diferencial entre o câncer prostático e o da hiperplasia prostática benigna.

### **Reação cruzada com anticorpos monoclonais**

Nem sempre os anticorpos monoclonais conseguem ser totalmente específicos, pois moléculas que apresentam epítomos com alto grau de homologia ao epítomo do analito, conseguem competir com o analito e assim falsear os resultados esperados. Exemplo disso ocorre nos “kits” que utilizam anticorpos monoclonais para a captura da ciclosporina onde metabólitos desta podem reagir com os anticorpos de captura.

## **REDUZINDO AS REAÇÕES CRUZADAS**

A exatidão de um imunoenensaio depende da eliminação ou da redução da reação cruzada de compostos presentes na amostra a ser analisada. O uso de anticorpos monoclonais já ajuda a reduzir bastante esta reação cruzada, no entanto, em alguns casos isto não elimina de vez o problema. Algumas vezes temos de lançar mão de imunoenensaio com dois sítios de captura, pois como estes ensaios capturam dois epítomos diferentes, isto ajuda a reduzir a reação cruzada. Infelizmente os

ensaios com dois sítios de captura existem apenas para moléculas que sejam grandes o suficiente para que se possa haver o reconhecimento de dois epítomos diferentes.

### **Separação de ligantes antes de efetuar o imunoensaio**

Outra forma de se evitar as reações cruzadas é se efetuando a separação de ligantes inespecíficos antes de se proceder a reação. Para tal devemos conhecer as propriedades físicoquímicas da molécula que possa causar a reação cruzada, também diferenças de tamanho, carga, solubilidade e ligação protéica é que irão determinar a forma de se proceder a separação. Esta separação pode ser algo simples de ser feito como a extração orgânica feita para o cortisol presente na urina ou algo mais sofisticado como o uso da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para separar a digoxigenina de seus metabólitos. Também pode-se fazer uso da filtração em gel ou ultrafiltração, como pode ser feito na separação de hormônios glicoprotéicos como o hCG, LH e FSH das subunidades  $\alpha$  livres dos mesmos.

Outro exemplo está na modificação química que se pode fazer com as substâncias que poderiam interferir com a reação. Exemplo disto está na destruição do pentobarbital com NaOH para que este não interfira com a dosagem do fenobarbital.

As vezes o problema de uma reação está também no controle da temperatura, se uma reação for incubada por pouco tempo, isto pode fazer com que a probabilidade de acontecer reações cruzadas seja maior, exemplo disto ocorre nos ensaios para esteróides.

Além do tempo de incubação é também importante ter cuidado com a temperatura a fim de reduzir a possibilidade de ocorrer reações cruzadas. Além disso, a constante de equilíbrio da reação varia de acordo com a temperatura e as vezes a substância que reage cruzadamente atinge o equilíbrio numa temperatura diferente daquela em que o analito atinge.

### **Bloqueando a reação cruzada**

A reação cruzada também pode ser bloqueada nos ensaios onde se deseja dosar anticorpos específicos para determinado antígeno de pelo menos duas formas. Numa como forma de separar os anticorpos pouco específicos, se adiciona ao soro substâncias capazes de reagir cruzadamente. Isto se baseia na propriedade de que anticorpos pouco específicos se ligam melhor as substâncias que reagem cruzadamente do que ao antígeno específico. Exemplo disto está na reação de FTA-ABS onde nós fazemos a adsorção do soro a se dosar anticorpos para o *T. pallidum*, neste caso se adiciona ao soro treponemas saprófitas como forma de bloquear os anticorpos inespecíficos.

Também podemos bloquear uma reação cruzada se adicionando anticorpos específicos para o agente que reage cruzadamente e assim fazer com que este agente não interfira na reação. Exemplo disto está na adição de anticorpos para a cortizona no soro do paciente onde se vai fazer a dosagem do cortisol.

## **ANTICORPOS HETERÓFILOS E ANTICORPOS PARA ANIMAIS**

Anticorpos heterófilos são anticorpos capazes de reagir com uma grande quantidade de antígenos. Historicamente eles foram definidos como anticorpos da classe IgM que aparecem na mononucleose infecciosa e que se ligam a hemácias de carneiro. Estes anticorpos podem ser removidos pela adsorção com hemácias de boi mas não com células do rim de porco da Índia. Aproximadamente 90% dos adolescentes e adultos jovens apresentam anticorpos heterófilos.

Atualmente todos anticorpos capazes de interferir com os imunoenaios são chamados de anticorpos heterófilos, ou anticorpos heterofílicos ou ainda de heteroanticorpos. Os heteroanticorpos englobam anticorpos idiotípicos, Fator Reumatóide e anticorpos multiespecíficos. O mecanismo de interferência dos heteroanticorpos é o mesmo mecanismo de interferência que ocorre com anticorpos para animais. Estes anticorpos para proteína animais podem surgir como resposta ao tratamento feito com soroterapia prévia, como a aplicação de soro anti-ofídico, pois este soro é produzido em cavalos, ou em pessoas que lidam muito com animais como os tratadores. Deve-se de preferência ter idéia de que anticorpo interferente está presente na amostra a fim de se proceder a adsorção do mesmo. É bem verdade que os anticorpos produzidos em algumas doenças são difíceis de serem identificados e removidos e por isso podem interferir com os ensaios de dois sítios de captura, ensaios de nefelometria e turbidimetria.

### **A Natureza dos Heteroanticorpos**

É importante se conhecer os tipos de heteroanticorpos como forma de tentar evitar a interferência que eles podem produzir.

### **Anticorpos Poliespecíficos**

Estes são anticorpos capazes de reagir com uma variedade de antígenos que apresentem estrutura química, forma ou carga semelhante. Geralmente é difícil de estabelecer quando estes anticorpos estão interferindo na reação. Em geral os anticorpos poliespecíficos são anticorpos que apresentam afinidade para se ligar a componentes celulares semelhantes como membrana celular ou estruturas nucleares. Este tipo de anticorpo é muito observado no lupus eritematoso sistêmico, onde temos a produção de anticorpos poliespecíficos para DNA. Também temos a presença de anticorpos poliespecíficos na tuberculose onde estes podem se ligar ao DNA de fita simples ou dupla, polinucleotídeos e cardiolipina. No caso dos anticorpos do Fator Reumatóide que geralmente são da classe IgM estes podem se combinar com DNA dupla fita, tireoglobulina, insulina, toxóide tetânico e lipopolissacarídeo. Nas infecções por *M. leprae* observa-se a produção de anticorpos polireativos para mitocôndria, DNA dupla fita, proteínas do citoesqueleto e acetilcolina.

Esta poliespecificidade dos anticorpos parece ser porque os anticorpos são produzidos para reconhecer um sítio de ligação maior do que o necessário para se ligar a um simples epítopo e, por isso acabam se ligando a outros ligantes.

A produção destes anticorpos heterófilos também pode ser explicada pela forma como a região variável dos anticorpos é montada, se recordarmos a montagem da molécula de anticorpo, veremos que a etapa final desta envolve o rearranjo cromossomal e a translocação de genes, onde os introns são excluídos com isso, temos a produção de diferentes tipos de anticorpos.

### **O Fator Reumatóide**

O Fator Reumatóide é na verdade um grupo de autoanticorpos que se ligam a múltiplos determinantes antigênicos na porção Fc da IgG. Se supõe que os Fatores Reumatóides possam ser gerados como anticorpos anti idiotipos. Assim como outros anticorpos os anticorpos para fator reumatóide apresentam diferentes subclasses que podem ser poliespecíficos, se ligar a DNA dupla fita, tireoglobulina, insulina, toxoíde tetânico, lipopolisacarídeo e DNA em forma de histona

### **Mecanismo de Interferência dos heteroanticorpos e anticorpos para proteína animais**

Os heteroanticorpos podem causar interferência pelos três mecanismos descritos abaixo e os anticorpos para proteínas animais podem promover a interferência pelos dois primeiros:

- i. Agregação de imunoglobulinas. Nos ensaios de dois sítios de captura o anticorpo interferente faz uma ligação cruzada (uma ponte) entre o anticorpo de captura e o de detecção na ausência do analito. Nos ensaios que usam a dispersão de luz, o anticorpo interferente acaba aumentando o tamanho do imunocomplexo precipitante. Este tipo de interferência acaba por elevar o resultado da concentração de analito.
- ii. Bloqueando o sítio de ligação. Este geralmente ocorre com os ensaios do tipo competitivo, levando resultados falsamente elevados do analito. Os ensaios de dois sítios de captura podem também ser bloqueados. Se não houver um excesso do anticorpo de captura, isto pode levar a resultados falsamente baixos ou negativos.
- iii. Ligação poliespecífica ao antígeno de captura. Neste caso isto pode ocorrer em ensaios usados para se dosar os níveis de anticorpos endógenos, e pode levar a resultados com valores inferiores ou superiores ao esperado.

### **Ensaio de dois sítios de captura**

A interferência mais comum que ocorre neste tipo de ensaio é que o anticorpo heterófilo ou para proteína animal se liga ao anticorpo de detecção, e ao se fazer a adição do anticorpo de detecção este acaba sendo ligado pelo anticorpo interferente também. Isto é que acaba levando a resultados falsamente elevados. Esta ligação do anticorpo interferente pode ocorrer pela interação da porção Fab

do anticorpo interferente com a Fab do anticorpo de captura e/ou detecção, ou pode ocorrer pela interação da porção Fab-Fc. Por exemplo, o Fator Reumatóide causa a interação Fab-Fc, e anticorpos para idiotipo causam a interação Fab-Fab. É bom lembrar que esta interação pode ocorrer mesmo sem a presença do analito.

### **Ensaio competitivo**

Os ensaios competitivos de fase sólida podem sofrer interferência dos anticorpos heterófilos ou para proteínas animais devido ao bloqueio que ocorre ao sítio de captura do anticorpo. Já foi observado que ensaios deste tipo são menos afetados que os ensaios de dois sítios de captura devido a alta afinidade que os antígenos marcados e não marcados possuem para ligação ao sítio de ligação. Normalmente grandes quantidades de anticorpos interferentes são os que causam problemas, isto pode ocorrer se, por exemplo, for usada uma grande quantidade de amostra. Exemplo disto ocorre nos radioimunoensaios para  $\alpha$ -fetoproteína que usam grande quantidade de soro e possuem longo período de incubação, ocorrendo resultados falso positivos quando o soro possui grande quantidade de anticorpos heterófilos. Dependendo do tipo de anticorpo para proteína animal presente a interferência pode ser ainda maior do que a que ocorre com anticorpos heterófilos. Também já foi descrita a interferência negativa nos ensaios de captura de fase líquida. Nos ensaios competitivos em que se usa dois anticorpos também pode ocorrer a interferência negativa, já que há a formação de imunocomplexos do anticorpo interferente com os dois anticorpos do imunoensaio.

### **Ensaio de dispersão de luz**

Quase não há relatos de interferência neste tipo por dois principais motivos, primeiro neste tipo de ensaio formas poliméricas do antígeno geralmente promovem variações mínimas, segundo, as técnicas de dispersão de luz tem sido usadas para a análise de substâncias presentes em grandes quantidades (medidas em miligramas), o que difere dos ensaios competitivos que medem quantidades pequenas.

No entanto em soros com altos níveis do Fator Reumatóide (FR) pode ocorrer a interferência, em geral esta se deve a formação do complexo IgM-FR com o anticorpo de detecção do ensaio. Também o soro contendo altas concentrações de IgG e IgM-FR, o suficiente para formar imunocomplexos circulantes, e crioglobulinas, podem interferir nos ensaios de dispersão de luz. Os imunocomplexos circulantes podem ser precipitados com a adição de Polietilenoglicol (PEG) e assim facilita a interação antígeno anticorpo.

### **Ensaio usando o antígeno fixado a fase sólida para a detecção de anticorpos**

Muitos ensaios como aqueles usados para a detecção de anticorpos anti-nucleares (ANA), e anticorpos anti tiroideanos, usam antígenos para fazer a captura de anticorpos específicos em conjunto

com anticorpos para imunoglobulina humana para a detecção do anticorpo específico. Anticorpos poliespecíficos podem interferir nestes ensaios por competir com anticorpos específicos para a ligação ao antígeno fixado, ou se ligar a proteínas vizinhas ao antígeno. Esta ligação a proteínas vizinhas ao antígeno ocorre quando o “kit” usa células ou frações celulares na fase sólida para a captura do antígeno, isto porque os anticorpos poliespecíficos possuem afinidade para componentes semelhantes a estrutura de membrana e constituintes celulares. Estes anticorpos poliespecíficos podem aparecer em quantidades variáveis junto com os anticorpos específicos que desejamos medir. Como o anticorpo de detecção marcado não consegue diferenciar entre o anticorpo específico (o que desejamos encontrar) e o poliespecífico, isto pode levar a resultados falso positivos.

## **RECONHECENDO E REDUZINDO A INTERFERÊNCIA DOS ANTICORPOS ENDÓGENOS**

É necessário saber o tipo de ensaio que estamos usando para tentar reduzir esta interferência, se é um ensaio onde se deseja detectar o antígeno, chamado de ensaios para antígenos, ou se é um ensaio para detecção de anticorpos, chamado de ensaio para anticorpos.

### **Interferência Provocada Por Anticorpos Endógenos**

#### **Técnicas para identificação de um soro suspeito**

Como os ensaios competitivos são menos sujeitos a reações cruzadas, é interessante se proceder a comparação de um ensaio com este princípio com um ensaio de dois sítios de captura. Se o ensaio de dois sítios apresentar um valor elevado em relação ao método competitivo, é porque está ocorrendo a interferência.

Alguns pacientes podem apresentar interferência por anticorpos heterófilos com maior frequência que outros, isto acontece com pacientes com doenças agudas e crônicas como infecções por micobactérias, endocardite bacteriana, doença autoimune, infecções por *Klebsiella*, etc. Estes pacientes apresentam níveis elevados de FR e ANA.

### **Detectando a presença de Anticorpos Heterófilos e Anticorpos para Proteínas Animais**

A presença deste tipo de anticorpo em um paciente pode reduzir a eficácia de uma imunoterapia e também levar os imunoensaios a expressarem resultados falso positivos ou negativos. Existem ensaios para a detecção deste tipo de anticorpo como o ELISA, em que anticorpos monoclonais ou policlonais de ratos são usados para capturar e detectar estes no soro suspeito. Estes anticorpos também podem ser detectados se usando a cromatografia líquida de alta performance ou outras técnicas de detecção de imunocomplexos como uma mistura com anticorpos de rato com o soro suspeito de conter anticorpos heterófilos e/ou anticorpos para proteína animal.



No entanto isto nem sempre elimina a interferência, pois anticorpos IgM-FR, por possuírem diferentes idiotipos podem ainda continuar interferindo na reação.

### **Neutralização de anticorpos em ensaios para antígenos**

Em ensaios onde o resultado positivo pode ser problemático para o paciente, como aqueles para a detecção do vírus da hepatite B e C ou do HIV, faz-se necessária incluir uma etapa de neutralização de anticorpos assim como um mecanismo de redução de interferências. Isto pode ser feito da seguinte forma, depois que se realiza o ensaio com o soro do paciente, e este apresentou o resultado positivo, se pega uma pequena aliquota do soro do paciente e procede-se o tratamento deste com a adição do anticorpo exógeno para o antígeno. Por exemplo, se o teste é para captura do antígeno s do vírus da hepatite B (HBsAg), se adiciona anticorpo para este antígeno no soro do paciente. Deste modo os antígenos do soro do paciente serão neutralizados, posteriormente se repete um novo teste com o soro tratado, deste modo o antígeno não se ligará na fase sólida, mas se tivermos anticorpos interferentes (como o FR) eles se ligarão na fase sólida e promoverão o resultado falso positivo.

É importante ressaltar que os anticorpos de neutralização usados devem ser de humanos ou chimpanzé, pois os anticorpos heterófilos humanos não se ligam a estes anticorpos. Também quando se trata da pesquisa de antígenos virais, deve-se usar uma alta concentração de anticorpos de neutralização para os subtipos virais.

### **Reduzindo a Interferência em Ensaios de Dois Sítios**

Neste caso temos o tratamento imunológico ou não imunológico como forma de reduzir a interferência.

No método imunológico, lançamos mão de imunoglobulinas não reagentes para capturar os anticorpos interferentes, no entanto nem sempre esta técnica garante a redução da interferência, as vezes se faz necessário o uso de uma mistura de imunoglobulinas não reagentes de diferentes espécies como forma de promover a ligação dos anticorpos interferentes a estas.

Outras técnicas imunológicas de reduzir a interferência incluem:

- i. Uso de fragmentos Fab para promover a captura do anticorpo interferente.
- ii. Captura com anticorpos produzidos em duas espécies diferentes.
- iii. Uso combinado da  $\beta$ -galactosidase conjugada com F(ab)<sub>2</sub> e IgG policlonal ou IgG monoclonal polimerizada das mesmas espécies usadas para produzir os anticorpos usados nos ensaios.
- iv. Uso de anticorpos de galinha, que parecem não reagir com o FR humano.

Quanto as técnicas não imunológicas, estas requerem uma etapa de pré-tratamento, como exemplo, temos o tratamento com PEG (130g/L de soro), o qual precipita todas as imunoglobulinas endógenas e de todos anticorpos idiotípicos. Também temos o tratamento por aquecimento do soro a 90°C, usado como forma de eliminar a atividade anômala dos anticorpos por desnaturação. Ou ainda há o tratamento com agentes sulfidrílicos como o Mercaptaetanol ou Ditiotretitol, que quebra as pontes dissulfeto e inativa os anticorpos interferentes. Há também o pré tratamento com detergentes como

forma de inativar os anticorpos. Infelizmente, o tratamento químico não pode ser aplicado para todos os ensaios, pois dependendo do analito este também pode ter sua estrutura alterada, e assim levar a resultados falso negativos.

#### **Forma de reduzir a interferência em ensaios para anticorpos específicos**

Neste caso a recomendação é que se proceda o uso de ensaios com antígenos de captura altamente puros como forma de evitar a ligação não específica. Atualmente isto é possível devido as técnicas de DNA recombinante, que permitem desenvolver antígenos recombinantes puros e apenas com o epítipo desejado.

#### **Reduzindo a interferência em ensaios de Nefelometria e de Competição**

As técnicas para redução de interferência destes ensaios são semelhantes as aplicadas para os ensaios de dois sítios de captura, ou seja qualquer uma das técnicas imunológicas ou não imunológicas pode ser aplicada. Ressalta-se apenas que nos ensaios de nefelometria o tratamento com PEG pode ser feito usando 40g/L deste no soro para que a concentração de IgM seja reduzida.

### **INTERFERÊNCIAS DEVIDO A ANTÍGENOS QUE MASCARAM A REAÇÃO**

Neste caso a interferência ocorre como resultado de grupos antigênicos que são escondidos ou alterados por substâncias associadas a esta. Exemplo disto encontramos na dosagem da Apolipoproteína A-I (apo A-I) em lipoproteínas. Foi demonstrado que a atividade da apo A-I pode ser aumentada em até 60% fazendo o tratamento com detergentes, pois ao que parece os lipídios que a seguravam são destruídos com este tratamento. Este tipo de interferência também é observado quando se mede antígenos em soro com imunocomplexos, como no caso do estágio inicial da infecção pelo HIV onde o HIV está complexado com anticorpos para ele e assim tornando-se quase impossível de se ter uma concentração real da quantidade de vírus presente. Isto acontece principalmente em crianças recém nascidas, filhas de mãe soropositivas. A forma de se fazer a detecção seria promovendo a dissociação dos imunocomplexos.

No entanto para se resolver o problema dos antígenos escondidos é extremamente difícil, em alguns caso como nas apolipoproteínas, os antígenos escondidos podem ser de vários tipos, com isoformas múltiplas que podem estar escondidas pelos lipídios e o tratamento com solventes pode reduzir a interferência assim como pode causar a desnaturação do analito. Por isso as vezes é importante fazer o mesmo tratamento feito com o soro no calibrador do imunoensaio, como forma de verificar se não está ocorrendo prejuízo ao teste.

### **INTERFERÊNCIAS COM O MECANISMO INDICADOR**

Algumas amostras podem conter substâncias que interfiram com o indicador da reação aumentando ou diminuindo a leitura. Exemplo disto está em pacientes que estão fazendo tratamento

com radioterápicos e tem o soro analisado com Radio Imuno Ensaio (RIE), estes sempre darão um resultado acima do esperado.

Em ensaios imunoenzimáticos, o aumento da atividade enzimática pode levar a resultados falsamente elevados. É possível que na amostra haja a presença de ativadores ou inibidores da enzima e assim alterem o resultado. Como exemplo, temos um metabólito da aspirina que faz com que ocorra uma mudança no espectro de absorção ultravioleta do NADH, levando a absorbâncias relativamente baixas na análise de drogas. Em ensaios em que a leitura final depende da fluorescência, compostos fluorescentes ou inibidores desta podem alterar o sinal de leitura. Na quimioluminescência, algumas substâncias presentes nesta podem interferir com a emissão de foton.

### **EFEITOS MATRIZ**

O efeito matriz é uma interferência causada pela diferença de reatividade do analito devido ao ambiente que amostra apresenta. As reações antígeno anticorpo são geralmente sensíveis a variações na concentração de lipídios, pH e a força iônica. As diferenças na matriz geralmente alteram a eficiência da separação de frações ligadas e não ligadas e também a extensão da ligação não específica a substância reveladora. O efeito matriz geralmente aparece quando desejamos dosar substâncias diferentes do soro em um imunoensaio, como por exemplo usamos o liquor para pesquisa de anticorpos.

Como já explicado anteriormente, o efeito matriz é difícil de ser detectado, e por isso, as vezes requer que se faça a diluição da amostra para proceder um novo ensaio, e que ainda qualquer tratamento feito com o material a ser analisado seja repetido com o calibrador do “kit” como forma de verificar se este não interfere mais ainda com a precisão de nossos resultados.

## ENSAIOS DE AGLUTINAÇÃO

Um ensaio de aglutinação é baseado na propriedade que um antígeno e determinado anticorpo para este, quando ligado a uma partícula inerte (marcador) tem de se ligar entre si e, promover a precipitação do complexo antígeno anticorpo. Em alguns casos estas reações podem ser vistas a olho nu, quando por exemplo usam partículas como hemácias ou partículas sintéticas, outras vezes as reações podem ser vistas com auxílio de instrumentos que fazem a leitura a transmissão de luz, como no caso da quantificação de anticorpos quando o suporte é feito por micropartículas de látex.

Foi através da aglutinação com hemácias que se descobriu o sistema sanguíneo ABO. A presença de um antígeno natural nas células e a alta densidade dos sítios de ligação cruzada levam a formação de uma aglutinação forte, facilmente visualizada a olho nu. Por este motivo foram desenvolvidos kits onde se utilizam hemácias sensibilizadas com antígenos ou anticorpos, estes possuem alta sensibilidade e são fáceis de serem usados. Além das hemácias, pode-se utilizar como fase sólida partículas como: lipossomos, microcápsulas, partículas sintéticas, e vários tipos de látex. Estas partículas devem ter um diâmetro entre 7 e 0,05 $\mu$ m.

### Princípios da reação de aglutinação

O princípio básico das reações de aglutinação é a formação de pontes de anticorpo entre as imunoglobulinas IgG ou IgM e a partícula antigênica com múltiplos determinantes. Os anticorpos da classe IgM são aproximadamente 100 vezes mais eficientes nas reações de aglutinação do que a IgG, isto devido a sua característica pentavalente. Isto torna possível que moléculas de anticorpo reajam com mais de um sítio ou reajam com sítios equivalentes em diferentes partículas e assim produzam uma estrutura com ligações cruzadas. As reações de aglutinação, normalmente são usadas na detecção de espécimes dirigidos a antígenos específicos ligados a partículas (sensibilizados).

Na aglutinação indireta, se utiliza um anticorpo correspondente ligado a uma partícula, neste tipo de reação podemos detectar um antígeno solúvel em um espécime. Um **hapteno** (um antígeno por exemplo) com um simples determinante antigênico (como no caso de alguns hormônios ou drogas), podem não levar a formação desta ponte que forma o complexo antígeno-anticorpo e, conseqüentemente não levam a formação da aglutinação.

Quando uma partícula sensibilizada com um hapteno é utilizada como reagente, a determinação deste hapteno requer o uso do ensaio de inibição da aglutinação. A inibição da aglutinação é um ensaio de competição onde a aglutinação da partícula de hapteno com uma certa quantidade de anticorpo, o qual pode estar livre ou ligado a partículas, é inibida pelo hapteno presente na amostra. Como exemplo, temos alguns testes de gravidez que fazem a determinação indireta do hCG, onde partículas de látex recobertas com o hCG são postas para reagir com a urina que contenha o hCG, e junto se adiciona anticorpos para o hCG. Deste modo, o hCG ligado às partículas irá competir com aquele presente na urina, se não houver aglutinação, significa que havia mais hCG na urina e o teste é dado como positivo.

Os ensaios de inibição da aglutinação podem ser mais sensíveis que os testes de aglutinação passiva, embora a preparação dos reagentes exija a destreza de um especialista treinado no uso das técnicas mais sofisticadas.

Em termos de sensibilidade do ensaio, as partículas sintéticas ou o método de hemaglutinação oferecem grandes vantagens em relação ao ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), na detecção de anticorpos, isto porque neste ensaio apenas os anticorpos alvo estão envolvidos na reação imune. Enquanto no ELISA, na concentração de 10g de IgG por litro presente no soro, ou algo em torno de 6 ordens de magnitude maior que o anticorpo alvo, interfere na sensibilidade do ensaio produzindo o que na língua inglesa se chama de ruído de fundo ou, melhor dizendo, produzindo o resultado duvidoso. A reação de ELISA dá melhores resultados quando se objetiva a detecção de antígenos.

### **Partículas usadas como fase sólida**

Vários tipos de partículas vem sendo usadas como fase sólida nas reações de aglutinação. O primeiro tipo de aglutinação foi observado quando se misturou o soro de um paciente infectado por uma bactéria e a respectiva. O sistema ABO de tipagem de eritrócitos humanos, descoberto por Landsteiner, pode ser classificado como uma reação de aglutinação direta. As provas de aglutinação direta ainda são utilizadas no diagnóstico microbiológico (salmonelas e brucelas por exemplo), e na tipagem de hemácias. Partículas artificiais como gelatina, microcápsulas de peptídeos ou silicatos, podem ser sensibilizados com um antígeno ou anticorpo específico para o alvo na aglutinação passiva (indireta). Em 1983 Ikeda e Tomizawa desenvolveram uma partícula de gelatina especial com uma superfície altamente hidrofílica que, devido a isso é capaz de evitar a ligação de materiais não específicos presentes na amostra em estudo. Para a sensibilização destas partículas com o antígeno ou anticorpo desejado, se utiliza formaldeído para a fixação.

### **Hemaglutinação**

Os testes de hemaglutinação, apesar de serem muito sensíveis não são complicados em sua realização e sequer exigem equipamentos especiais. Devido a isso muitos países em desenvolvimento adotaram este tipo de teste e suas variações. Atualmente os testes de hemaglutinação são utilizados na detecção de vírus da hepatite B (HBV), hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), tireoglobulina, microssomos tiroideanos, e outros. Também testes de hemaglutinação reversa, podem detectar HbsAg (antígeno de superfície do vírus da hepatite B),  $\alpha$ -fetoproteína, e hemoglobina humana nas fezes. Para a detecção de antígenos, estes testes apresentam o limite de detecção situando entre 30 e 50 ng/ml. Outro exemplo de teste de hemaglutinação surgiu nos anos 80, foi o teste para detecção de anticorpos do *Treponema pallidum*, foi reconhecido mundialmente por fazer uso de eritrócitos de galinha ou carneiro, sensibilizados com o *T. pallidum* cultivado em coelhos. Se comparado com outros testes para diagnóstico da sífilis, este oferece maior sensibilidade e especificidade. No entanto este teste ainda apresenta resultados falso positivos, em decorrência da presença de autoanticorpos para a

proteína animal presente no soro ou para outras proteínas presentes. Esta interferência pode ser anulada se tratando o soro com adsorventes contendo o soro do animal correspondente, restos celulares ou outros componentes. Há poucos anos um novo teste de hemaglutinação em que se faz uso de anticorpos monoclonais de ratos específicos para o antígeno de superfície das hemácias humanas, este ensaio consegue reconhecer estes antígenos mesmo em hemácias com a estrutura alterada como as que aparecem na anemia falciforme. Neste ensaio faz-se o uso de anticorpos bivalentes, que se ligam ao epitopo de superfície e ao alvo a ser detectado, deste modo não há necessidade de se proceder a separação do plasma das células sanguíneas.

### **Aglutinação com partículas de gelatina**

As partículas de gelatina tem sido consideradas como as substitutas para os ensaios de hemaglutinação. As partículas de gelatina ainda oferecem a vantagem de não ocorrer ligações inespecíficas com o material presente na amostra por sua superfície ser altamente hidrofílica. A partícula de gelatina tem aproximadamente 3 µm de diâmetro, e é produzida através da separação de fase e ligação cruzada em um pH ótimo a 40°C. A partícula resultante é fixada com formaldeído ou glutaraldeído. Como as partículas de gelatina não são antigênicas, os testes realizados com estas são isentos dos problemas que aparecem quando há a presença de anticorpos heterófilos nas amostras. Também, ao se trabalhar com as partículas de gelatina, estas requerem o uso de uma diluição menor do soro na análise, como forma de evitar reação não específica e garantindo assim um ensaio com maior sensibilidade. Outros tipos de partículas surgiram no mercado, como método alternativo às partículas de gelatina. Uma delas são partículas incolores, que são blocos de partículas copolímeras compostas de ácido L-glutâmico. Estas partículas podem ser coloridas com a cor que se deseja para facilitar a visualização.

A aglutinação com partículas de gelatina foi inicialmente usada para a detecção de anticorpos para o HTLV. Este método logo foi adotado para a detecção do HIV, HBV e HCV já que ele é muito simples de ser realizado e não depende do controle de temperatura preciso para ser executado.

### **Aglutinação pelo látex**

A aglutinação pelo látex é usada para a detecção de vários analitos, como exemplo, ela vem sendo usado para a detecção do hCG em testes de gravidez qualitativos e em métodos semi automatizados para testes quantitativos, como na detecção de algumas proteínas plasmáticas.

O teste qualitativo é o procedimento geralmente executado em lâmina, onde se mistura uma certa quantidade da amostra do paciente com outra do látex, agita-se por 2 a 3 minutos e se executa a leitura a olho nú, algumas vezes, no entanto, pode ser necessário levar a lâmina ao microscópio para confirmar se houve ou não aglutinação, pois as partículas de látex podem ser muito pequenas. Quanto ao teste quantitativo este pode ser realizado por métodos de absorção de luz, como a turbidimetria ou métodos de dispersão de luz, como a nefelometria. A aglutinação pelo látex pode ter grande sensibilidade, algo entre 30 a 50ng/ml quando se lança mão de métodos semi automatizados.

### **Ensaio de Turbidimetria com Látex**

Os ensaios de turbidimetria medem a quantidade de luz perdida quando esta se espalha ao encontrar com a superfície de uma partícula. O limite de detecção deste método varia de acordo com o comprimento de luz utilizado. A maioria dos espectrofotômetros utilizam vários comprimentos de onda como forma de aumentar a sensibilidade, do mesmo modo também se procurou desenvolver partículas que se encaixem na capacidade de leitura do aparelho, em geral estas partículas tem o tamanho de 0,1µm, e dependendo da aparelhagem a sensibilidade pode chegar até 10ng/ml.

Deve-se ressaltar que as partículas de látex podem sofrer interferência de fatores desconhecidos presentes na amostra do paciente, e deste modo, vários absorventes devem ser usados no reagente e na fase de incubação.

### **Imunoensaios de contagem de partículas**

Este tipo de ensaio tem a vantagem de não requerer que seja feita a separação das partículas ligadas das não ligadas com o reagente, no entanto, o Fator Reumatóide presente na amostra, pode vir a interferir com os resultados, pois este se liga especificamente a IgG e não especificamente a outras proteínas, tudo isso, levando em geral a resultados falso positivos. O princípio destes ensaios é baseado na contagem óptica de partículas, o que permite avaliar a diminuição em número de partículas não aglutinadas durante o ensaio. Tanto o ensaio de índice (o índice que um sinal decai em número de partículas não aglutinadas), ou os ensaios de ponto final, são aplicáveis neste formato. Enquanto o ensaio de ponto final garante a sensibilidade em nanogramas por mililitro, no caso de reações imunológicas, é necessário um longo período de incubação. Nos últimos anos, surgiram vários tipos de instrumentação de fluxo contínuo baseados na metodologia de contagem de partículas, servindo inclusive para a identificação de alguns marcadores tumorais.

### **Outros tipos de ensaios**

Dos métodos desenvolvidos recentemente, temos a metodologia de dispersão de luz “quasielástica”, que se baseia na medição das mudanças em resposta a distribuição do tamanho das partículas. Esta técnica faz uso de um feixe de laser para medir a redução do coeficiente médio de difusão das partículas como o resultado de uma reação imune. Ensaio baseado na medição de mudanças da **anisotropia** angular da luz dispersada de acordo com o tamanho médio da partícula também fazem parte dos últimos lançamentos. Neste caso as partículas com diâmetros parecidos com o do comprimento de onda podem promover uma variação angular da luz dispersada dependente do tamanho da partícula.

## **ENSAIOS DE DISPERSÃO DE LUZ**

Uma característica das suspensões coloidais é que elas tem a propriedade de dispersar a luz em várias direções, este fenômeno é chamado de Efeito Tyndall, nele não há alteração do comprimento de onda da luz incidente, e ele depende do tipo de partícula. O efeito rede desta dispersão é que a luz

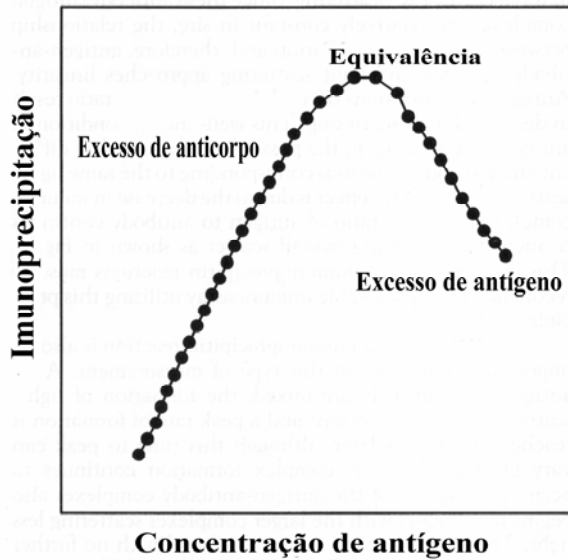
pode ser observada em todos os ângulos relativos a direção da luz incidente. O grau desta dispersão é dependente do tamanho da partícula e do comprimento de onda da luz incidente. Como exemplo, em soluções ordinárias, as partículas do soluto (parte dissolvida) são tão pequenas que a dispersão de luz que ocorre é muito pequena. No entanto, quando as partículas crescem em tamanho, formando complexos macromoleculares, a dispersão é mais significativa, fazendo com que a solução tenha um aspecto turvo. Também quanto menor o tamanho das partículas em suspensão, mais a luz se dispersa em várias direções, quanto maiores forem as partículas, a luz começa a se dirigir em uma única direção e se dispersar menos, este efeito é conhecido como efeito de Dispersão de Rayleigh-Debye. A maioria das técnicas de dispersão de luz, fazem uso deste efeito, medindo a luz dispersa emitida em uma única direção.

### **O complexo antígeno-anticorpo**

A ligação de um antígeno com o anticorpo é um equilíbrio dinâmico em que um anticorpo bivalente se liga a um antígeno monovalente ou multivalente. Quando o número de sítios de ligação do anticorpo é significativamente maior que o número de sítios do antígeno, os sítios do antígeno são rapidamente saturados pelos anticorpos e assim se formam pequenos complexos antígeno-anticorpo. No entanto, se tivermos um pequeno excesso de anticorpos, teremos a ligação de mais de um anticorpo ao antígeno multivalente, o que leva a formação de um agregado dos complexos antígeno-anticorpo. Já no momento em que há mais antígeno do que anticorpo, todos os sítios do anticorpo se tornam saturados, com duas moléculas antigênicas formando um pequeno complexo não agregado. A zona de equivalência, é aquela em que há o máximo de ligações entre o antígeno e o anticorpo, formando o maior complexo agregado possível (em média 2 a 3 moléculas de anticorpo se ligando a uma de antígeno).

As características da ligação antígeno anticorpo é que servem como base para os ensaios de dispersão de luz. Isto quer dizer que, se iniciarmos com uma quantidade de anticorpos em excesso constante, e formos aumentando aos poucos a concentração de antígenos vai ocorrer o aumento da concentração do complexo antígeno-anticorpo em quantidade suficiente para dar origem ao efeito de dispersão de Rayleigh-Debye. Como estes complexos antígeno anticorpo são relativamente constantes em tamanho, a relação entre a concentração de antígeno e do complexo antígeno-anticorpo e da dispersão de luz, se aproximam da linearidade. As concentrações antigênicas próximas ao coeficiente de equivalência, apresentam pouca dispersão de luz. Esta é uma condição bem conhecida do excesso de antígeno resultando na possibilidade de haver duas concentrações antigênicas diferentes de antígeno correspondendo ao mesmo valor da dispersão de luz. Este efeito se deve a diminuição do tamanho do complexo imune pois a razão de antígeno para o anticorpo continua a aumentar, diminuindo assim a dispersão total de luz (ver gráfico).





Curva de imunoprecipitação observada quando se aumenta aos poucos a concentração de antígeno em uma solução com a concentração fixa de anticorpos.

A cinética das reações de imunoprecipitação também deve ser levada em conta, após a mistura do antígeno com o anticorpo, começa a formação de complexos dispersores de luz sendo que, o pico de formação destes ocorre em 20 segundos aproximadamente. É claro que após este tempo continua a ocorrer a formação de imunocomplexos, e que o tamanho destes começa a crescer, aparecendo complexos maiores que acabam influenciando na dispersão da luz. Finalmente temos um estágio estável, em que não há mais a variação na dispersão de luz, é a fase de equilíbrio da reação. Os ensaios de dispersão de luz fazem uso desta fase de equilíbrio para fazer a medição. Métodos que fazem uso da taxa de aumento da luz dispersa, são conhecidos como métodos cinéticos ou proporcionais. As partículas continuam a se agregar e aumentar de tamanho até o ponto em que elas precipitam e a solução é clarificada.

## NEFELOMETRIA

O princípio desta reação é simples, nele o soro diluído (antígeno) é misturado com uma certa concentração conhecida do antisoro, em geral tamponado. Assim a dispersão de luz vai aumentando aos poucos até atingir o seu pico máximo. O ângulo da dispersão de luz é comparado com os resultados obtidos com padrões e calibradores do aparelho de forma a poder determinar a concentração de analito presente no soro do paciente.

Dependendo do tipo de instrumento usado, ele pode fazer a medição cinética ou do ponto de equilíbrio da reação. Os aparelhos que fazem a medição do equilíbrio da reação, determinam quando se atingiu o ponto máximo da dispersão de luz após um determinado tempo de reação, e a dispersão de luz da amostra é subtraído do sinal de fundo para se alcançar o sinal final do complexo. É claro que o

soro por si só pode contribuir pela dispersão de luz devido a seus constituintes como os quilomicrons, lipoproteínas de baixa densidade e a presença de imunocomplexos circulantes. A prática comum de se congelar e descongelar o soro no laboratório, a fim de se executar o exame no outro dia, contribui no aumento da dispersão de luz. Quando não há dispersão de luz, isto acaba por limitar a sensibilidade do ponto de equilíbrio da reação, isto pode ocorrer devido a uma limitação presente na amostra analisada.

Na maioria dos ensaios, uma das formas de evitar esta interferência é fazendo a diluição do soro a 1:50. Este problema é menor quando se analisa o líquido céfalo raquidiano ou urina pois estes contêm menos material capaz de dispersar a luz. Nem sempre o pré tratamento do soro como forma de evitar a interferência é útil, uma vez que este aumenta a complexidade da análise e a torna mais suscetível a erros.

Existem outras fontes de interferência do sinal como a presença de digitais nos tubos de análise, presença de fibras e poeira na amostra.

A nefelometria cinética emprega a medição do aumento de dispersão de luz após ter se iniciado a reação entre antígeno e anticorpo. Isto elimina a necessidade de correção do sinal de fundo que ocorre na amostra. A nefelometria cinética monitora a taxa de mudança da dispersão de luz, a qual aumenta gradativamente, até chegar um momento em que aumenta rapidamente até um pico máximo, e depois decai rapidamente. O pico máximo é o parâmetro de medição do aparelho, este é comparado com uma curva padrão, já realizada anteriormente e armazenada no banco de dados do aparelho. Esta curva padrão deve ter sido elaborada com o maior número de amostras possíveis, como forma de aumentar a exatidão do aparelho. Curvas padrão elaboradas com poucos pontos são sempre a fonte de resultados com pouca exatidão. Também, deve-se estar atento a presença de bolhas na amostra a ser colocada para leitura no aparelho, pois estas contribuem para a dispersão da luz em outras direções.

Um dos principais requerimentos de todas as técnicas de imunoprecipitação é querer detectar o excesso de antígeno. Para uma certa quantidade de anticorpos presentes na mistura a ser dosada, a queda absoluta da dispersão de luz ou, a taxa de aumento da dispersão de luz, que aumenta conforme a quantidade de antígeno presente, até se chegar um pico máximo. A partir deste ponto, quanto maior for a quantidade de antígeno, menor será a quantidade de luz dispersada. Também é possível que ocorram duas concentrações de antígeno, uma associada com o excesso de anticorpo e uma associada com excesso de antígeno, deste modo, cada uma destas promove a dispersão da luz de uma forma diferente. É possível se desenvolver condições no ensaio de forma a poder se detectar o excesso de antígeno para uma proteína ou analito que esteja além dos valores encontrados em soros normais ou patológicos. No entanto nem sempre é possível se fazer isso, embora seja importante se detectar o excesso de antígeno quando se deseja dosar imunoglobulinas. Estas proteínas podem estar presentes em altas concentrações em pacientes com hiperplasia ou doenças malignas.

O antisoro usado nas reações de imunoprecipitação devem ser capazes de reconhecer uma variedade de epítomos presentes na amostra, pode-se também usar soros monoclonais, só que deve-se

tomar cuidado quando se usa grandes quantidades de anticorpo monoclonal já que estes podem levar a erros de quantificação.

Existem várias técnicas para a detecção do excesso de analito em uma amostra, uma delas consiste em se adicionar mais antígeno ou anticorpo na mistura em estudo como forma de promover o aumento da dispersão de luz, quando há o excesso de anticorpos ou antígenos respectivamente. Outra forma consiste em se preparar duas diluições diferentes da amostra e se proceder a dosagem, como forma de comparar os resultados e se observar se há correspondência entre eles. Este tipo de procedimento tem maior aplicabilidade em ensaios que medem o ponto final (ponto de equilíbrio) de uma reação. Quando se deseja dosar anticorpos presentes numa amostra, a fim de se saber se há excesso destes, pode-se proceder antes da nefelometria, a eletroforese quantitativa da amostra como forma de verificar a concentração da imunoglobulina presente no entanto, isto é pouco prático e mais trabalhoso.

Quando comparamos os métodos de medição do ponto de equilíbrio de uma reação com o que mede a cinética da reação, vemos que os métodos que medem o ponto de equilíbrio são mais simples e menos sofisticados em termos de aparelhos. Os métodos cinéticos são menos sensíveis a interferência de fundo que ocorre nos métodos de ponto final, e são mais sensíveis, mas podem ser afetados por falsas reações antígeno anticorpo por causa de anticorpos monoclonais. Anticorpos policlonais de alta afinidade podem apresentar reações mais rápidas nos ensaios cinéticos.

## **TURBIDIMETRIA**

Os ensaios de turbidimetria seguem as mesmas considerações feitas para a nefelometria, a diferença é que neste tipo de ensaio se mede a absorvância da luz e não a luz dispersada. Para a turbidimetria também temos ensaios de medição do ponto de equilíbrio e da cinética da reação. Nos ensaios de medição do ponto de equilíbrio, deve-se medir primeiro o sinal de fundo da amostra, para então subtrai-lo do resultado final da reação antígeno anticorpo. Já nos ensaios cinético isto não é necessário já que este se baseia na medição de vários pontos. No entanto a medição da luz absorvida oferece limitações, o aparelho deve ser capaz de medir mudanças da absorção de luz da ordem de 5 unidades de miliabsorção com precisão, sem que haja a presença de ruído no sinal (interferência eletrônica oriunda da rede elétrica ou de outro aparelho).

## **APLICAÇÕES DA NEFELOMETRIA E TURBIDIMETRIA**

Qualquer fluido corporal pode ser usado em ambas as técnicas desde que haja quantidade suficiente antígeno para ser detectado. A quantidade de amostra necessária em ambas as técnicas é pequena, da ordem de microlitros. Quando temos amostras opalescentes, estas podem ser filtradas em um filtro com a porosidade de  $0,22\mu\text{m}$  ou centrifugadas a alta rotação. Amostras hemolisadas ou ictéricas podem tornar difícil o ensaio, mesmo quando estas são diluídas.

A cinética das reações de precipitação pode ser afetada pela força e composição iônica, pH e a presença de promotores poliméricos. A presença de ions de sódio, magnésio e fosfato podem promover a reação de precipitação. Por este motivo o uso de soluções tampão fosfato salina (PBS) na concentração de 0,01 a 0,1 mol/ml com pH entre 7,4 e 7,9 é recomendada na diluição da amostra a ser analisada. Pode-se também fazer a adição da Azida sódica na concentração de 0,1% como forma de evitar o crescimento de bactérias e fungos na amostra.

Alguns polímeros podem ser usados na amostra como forma de promover a reação, acelerando a interação entre antígeno e anticorpo. Além disso os polímeros podem diminuir a turbidez das soluções com muito anticorpo e minimizar o sinal de fundo. O Polietilenoglicol (PEG) é um destes polímeros, pode-se usar o PEG 4000 ou 8000 na concentração de 40 a 60 g/L.

Alguns tipos de problemas mais comuns nos ensaios de turbidimetria e nefelometria são comuns, assim como a forma de resolve-los, dentre estes destacamos:

| Problema                                | Solução   |
|---|---|
| Excesso de dispersão de luz             | Diluir mais o anticorpo, diluir mais a amostra.                                     |
| Dispersão de luz insuficiente           | Aumentar a fração de anticorpo, aumentar a quantidade de amostra.                   |
| A mudança da dispersão de luz é pequena | Ajustar a taxa da reação antígeno anticorpo, usar polímeros para promover a reação. |
| Reação de fundo em excesso              | Filtrar reagentes e/ou a amostra.   |

### Aplicações específicas

Este tipo de reação se aplica a dosagem de proteínas que tenham importância clínica presente no soro, urina ou líquido cefaloraquidiano. Estas proteínas geralmente possuem tamanho suficiente para promover a formação de imunocomplexos e também conseguir desviar a luz quando reage com anticorpos específicos. Dentre as proteínas que podem ser dosadas tanto pela turbidimetria quanto pela nefelometria temos as seguintes listadas abaixo:

- $\alpha_1$ -Ácido glicoproteico
- $\alpha_1$ -Antiquimotripsina
- $\alpha_2$ -Antiplasmina
- $\alpha_1$ -Antitripsina
- $\alpha_2$ -Macroglobulina
- $\alpha_1$ -Microglobulina
- Albumina
- Antitrombina III
- Apolipoproteína A-I
- Apolipoproteína B

$\beta_2$ -Macroglobulina  
Inibidor de C1  
C3  
C4  
Ceruloplasmina  
Proteína C Reativa  
Fibrinogênio  
Fibronectina  
G<sub>c</sub>-globulina  
Haptoglobulina  
Hemopexina  
IgA  
IgE  
IgG  
IgM  
Cadeia Leve  $\kappa$   
Cadeia Leve  $\lambda$   
Préalbumina  
Proteína de ligação ao retinol  
Fator reumatóide  
Transferrina  
Anti Estreptolisina O

O limite da sensibilidade analítica destes métodos para a detecção de proteínas é de aproximadamente 5mg/L. E a precisão obtida com estes métodos pode chegar a algo entre 1 e 10% do total do coeficiente de variação, dependendo da proteína que está sendo dosada. É claro que para se obter a precisão é necessário que se façam curvas de calibração do ensaio para assim garantir sua precisão e exatidão.

### **FATORES QUE AFETAM A PERFORMANCE DOS ENSAIOS**

As interferências que mais dão problemas são aquelas que dão o sinal de fundo na reação, contribuindo para aumentar a dispersão de luz. Em geral este tipo de interferência se deve a amostra que está sendo analisada ou aos reagentes usados. A filtração dos reagentes, associados a centrifugação a alta velocidade ou a ultracentrifugação da amostra, ajudam a reduzir este sinal de fundo. Soros muito ictericos ou hemolisados podem afetar a absorvância dos métodos turbidimétricos, esta interferência pode ser minimizada com a diluição da amostra antes de se processar o ensaio.

A qualidade do anticorpo usado no ensaio é crucial para o desempenho destas técnicas, pois como as proteínas presentes no soro podem apresentar várias formas, o reagente usado deve ser capaz de reagir com estas várias formas. Isto é especialmente útil em proteínas como a haptoglobina, cujas isoformas variam muito em termos de peso molecular. Os métodos nefelométricos e turbidimétricos, no entanto, são menos afetados pelas variações do tamanho molecular do que são os métodos de imunodifusão radial. Preparações de anticorpo que apresentam variações na ligação devido a presença de componentes monoclonais, devem ser evitadas sempre que possível. A concentração de proteína monoclonal pode ser estimada independentemente por métodos eletroforéticos. Qualquer variação no reconhecimento do anticorpo de uma preparação pode ser avaliado procedendo-se um teste de paralelismo através do limite do excesso de anticorpo em concentrações antigênicas. Isto é, a diluição de uma série de amostras de um soro deve mostrar uma série linear de resultados. Na verdade, este tipo de verificação pode ser estendido a todos os tipos de ensaios.

### **TESTE DE PAUL BUNNEL & DAVIDSOHN E MONOTESTE**

A mononucleose infecciosa descrita em 1889 por Pfeiffer, também chamada Doença Glandular, Angina Monocítica, manifesta-se por febre contínua, angina, adenopatia cervical, astenia, suores profusos, esplenomegalia. Hoje, sabe-se, que seu agente etiológico é um vírus da família Herpesviridae denominado Epstein & Barr. Foi demonstrado por Epstein, Archong & Barr, em 1967, a partir de material de um paciente com linfoma de Burkitt.

**DIAGNÓSTICO:** A presença de anticorpos para o capsídeo do vírus pode ser demonstrada por imunofluorescência indireta em presença de células linfoblásticas, produtoras de vírus, na fase aguda da infecção. É, porém um teste complicado e inacessível aos laboratórios de análises clínicas. Devido a este fato, o diagnóstico da mononucleose infecciosa baseia-se na pesquisa de anticorpos heterófilos.

Dois testes são, comumente, usados para este diagnóstico: O MONOTESTE e a reação de PAUL-BUNNELL & DAVIDSOHN.

**MONOTESTE:** No monoteste usam-se hemácias formoladas de cavalo. Em uma lâmina comum de microscopia, coloca-se uma gota de soro do paciente (não necessita ser inativado). Adicionam-se a este soro duas gotas de uma suspensão a 20% de hemácias formoladas de cavalo. Agita-se imprimindo um movimento de rotação à lâmina. Dentro de dois a três minutos ocorre hemaglutinação. O teste pode, também ser feito em lâmina escavada. Ausência de hemaglutinação não exclui o diagnóstico para mononucleose.

**REAÇÃO DE PAUL-BUNNELL & DAVIDSOHN:** Esta prova é baseada na capacidade que tem o soro do doente de aglutinar hemácias de carneiro a uma diluição de 1:56 ou superior. Entretanto, mesmo se ocorrer a aglutinação das hemácias de carneiro, o teste deve ser confirmado pela adsorção do soro do paciente com os antígenos de rim de cobaia e glóbulos, de boi separadamente.

**Técnica da reação:**

Material necessário:

- Soro do paciente inativado
- Micropipeta de 20 µl
- Placa de vidro escavada (a mesma que se usa para o VDRL)
- Hemácias de carneiro a 2% em salina
- Glóbulos cozidos de boi (antígeno)
- Extrato de rim de cobaia (antígeno de Forssman)
- Solução de NaCl a 0,85%.

**Realização do teste:**

- 1 - A uma lâmina com pelo menos oito escavações, adicionar 20 µl de solução salina;
- 2 - Na primeira escavação adicionar 20 µl do soro do paciente. Homogeneizar com a mesma ponteira, passando 20 µl para a 2ª cavidade, daí para a terceira e assim, sucessivamente, até a última, quando desprezamos 20 µl. Temos assim, o soro diluído a 1/2, 1/4 até 1/256;
- 3 - Adicionar a cada diluição do soro 20 µl de uma suspensão de hemácias de carneiro a 2%, em salina. Homogeneizar, imprimindo à lâmina um movimento de rotação. A aglutinação das hemácias ocorrerá dentro de 1 a 2 minutos até certa diluição ou pode não haver aglutinação se o soro não possuir hemaglutininas.

Uma hemaglutinação produzida pelo soro até à diluição de 1:32, é um teste que não indica a mononucleose. Pode-se dar como negativo. Se porém, houver hemaglutinação até a uma diluição do soro de 1/64 ou maior, há uma forte suspeita de ser mononucleose. Neste caso o soro dever ser absorvido com glóbulos de boi (0,1 ml de Gb + 0,4 ml do soro) e com rim de cobaio (0,1 ml de Rc + 0,4 ml do soro). Misturam-se soro e antígeno em um tubo de hemólise, deixar no banho maria a 37°C por 30 minutos, centrifugar e repetir a reação com o sobrenadante do mesmo modo que se procedeu para a prova direta com as hemácias de carneiro. Para isto destacar duas fileiras na placa, uma para *Gb* e outra para *Rc*.

Em cada fileira, adicionar 20 µl de salina em cada cavidade e diluir, como anteriormente, o soro tratado (uma fileira para *Gb* e outra para *Rc*).

Adicionar em cada cavidade 20 µl de hemácias de carneiro e homogeneizar, com movimentação de rotação.

4 - Após 2 a 3 minutos proceder a leitura, observando o título do soro, em cada fileira. O título será a maior diluição do soro onde houver hemaglutinação completa.

**Observações:** O antígeno de glóbulos de boi absorve o anticorpo do soro no caso de mononucleose infecciosa e da doença sérica. O antígeno de rim de cobaia absorve os anticorpos de Forssman.

Em determinado soro, se o título da prova direta for de 1:128 e após à absorção com Gb e Rc não ocorrer hemaglutinação, não se trata de mononucleose e sim de doença do soro.

Se por acaso ocorrer hemaglutinação pelo soro tratado com Rc a uma diluição de 1:64, por exemplo, e com Gb não ocorrer hemaglutinação, trata-se de mononucleose.

Se se tratarem de anticorpos de Forssman, não haverá hemaglutinação no soro tratado com Rc, mas haverá hemaglutinação no soro tratado com Gb.

Resumindo teremos:

#### DIFERENCIAÇÃO DAS AGLUTININAS ANTI-HEMÁCIAS DE CARNEIRO

| DIAGNÓSTICO    | PROVA DIRETA<br>HEMÁCIAS DE<br>CARNEIRO | SORO ABSORVIDO |    |
|----------------|---|----------------|----|
|                |   | Rc             | Gb |
| Doença do soro | 128                                     | -              | -  |
| Mononucleose   | 128                                     | 64             | -  |
| Soro normal    | 128                                     | -              | 64 |

Deve-se esclarecer que a reação clássica de Paul-Bunnell & Davidsohn era feita em tubos e com diluições de 1/7, 1/14 ... 1/128 ou mais. Considerava-se, neste caso, como suspeito de mononucleose infecciosa, um paciente cujo soro apresentasse, na prova direta um título igual ou superior a 1:56. Nestas condições absorvia-se o soro com Rc e Gb para diferenciação das hemaglutininas.

**Observação:** O sangue de carneiro usado deve ser conservado em solução de Alsever, outros anticoagulantes diminuem a sensibilidade das hemácias e prejudicam o teste.

#### TESTE DO LÁTEX

O látex tem sido empregado como suporte para variados tipos de antígenos e de imunoglobulinas, graças às suas propriedades de adsorção de proteínas.

Contamos com um grande número de testes tendo como suporte o látex. Nos diferentes diagnósticos realizados podem ser pesquisados anticorpos (se o látex estiver revestido com antígeno) ou pesquisa de antígeno (se o látex estiver revestido com anticorpo). Atualmente existem conjuntos de látex para pesquisar os agentes microbianos (bactérias, vírus), muito específicos, isto é, sensibilizados com anticorpos monoclonais.



## **TESTE DO LÁTEX PARA ARTRITE REUMATÓIDE**

Os reagentes tendo como suporte o látex, são fornecidos por diferentes fabricantes. No conjunto, são fornecidos o látex sensibilizado com gamaglobulina humana (anticorpo), soros padrões positivo e negativo diluídos a 1:20, placa de vidro quadriculada e solução tampão de glicina-NaCl, pH 8,2.

### **REALIZAÇÃO DO TESTE**

1. Usar a lâmina quadriculada e separar três quadrados, o número 1 para o soro do paciente, o número 2 para o soro negativo e o número 3 para o soro positivo;
2. Diluir o soro do paciente a 1:20 no tampão de glicina (0,05 µl de soro em 1 ml de tampão).
3. Colocar nos quadrados números 1, 2 e 3 uma gota do soro do paciente (1:20), uma gota do soro negativo e uma do soro positivo, respectivamente.
4. Sobre cada gota adiciona-se uma gota do látex sensibilizado misturando bem. Imprime à lâmina um movimento de rotação durante 1 a 2 minutos.

Reação positiva: presença de aglutinação

Reação negativa: ausência de aglutinação

Se quiser fazer uma titulação basta fazer diluições sucessivas do soro no tampão de glicina. O título será a maior diluição do soro onde ocorre aglutinação.

Em cerca de 80% dos casos de artrite reumatóide essa prova é positiva, enquanto que na febre reumática e na poliartrite reumática secundária crônica é quase sempre negativa. Nas infecções ou afecções como hepatite, cirrose hepática, sarcoidose, sífilis e lupus eritematoso, esta prova é sempre positiva.

## **TESTE DO LÁTEX PARA ANTICORPOS ANTIROIDEANOS**

O conjunto é fornecido contendo os reagentes como no caso anterior. O látex é revestido com tireoglobulina acompanhando soros negativo e positivo (diluídos 1:20), em tampão de glicina.

A realização do teste obedece às mesmas normas do teste para artrite reumatóide.

Neste teste não se faz titulação.

## **TESTE DO LÁTEX PARA LUPUS ERITEMATOSO**

O conjunto de reagentes é fornecido pela Firma Hyland e se constitui de um frasco com partículas de látex revestidos com DNA, placa de vidro, soros positivo e negativo (não diluídos).

Nos quadrados 1, 2 e 3 colocar uma gota do soro do paciente, do soro negativo e uma gota do soro positivo, respectivamente.

Adicionar uma gota de látex a cada um dos três quadrados, imprimir à lâmina um movimento de rotação durante 1 a 2 minutos e procede-se a leitura.

Reação positiva: presença de aglutinação

Reação negativa: ausência de aglutinação.

Atualmente, encontram-se os conjuntos de reagentes com suporte de látex para diagnóstico de uma série de afecções e infecções microbianas. Todos são fáceis de se utilizar, bastando ler, com atenção, os folhetos que acompanham os conjuntos para diagnóstico.

### **TESTE DE WAALER-ROSE**

Fundamenta-se este teste na aglutinação de hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina, pelo soro do indivíduo com artrite reumatóide.

O soro do paciente com artrite reumatóide é capaz de aglutinar hemácias de carneiro sensibilizadas em 75% dos casos. Esta aglutinação ocorre por causa de um fator chamado “Fator Reumatóide”. Este teste pode ser usado em tubos 13 x 100 mm ou em microplacas de plástico, as mesmas que se usam para os testes de hemaglutinação, inibição da hemaglutinação e fixação do complemento.

### **MATERIAL NECESSÁRIO PARA A REAÇÃO**

- Microplaca de plástico (96 orifícios)
- Micropipeta de 20 µl e respectivas ponteiras
- Solução salina 0,85%
- Hemolisina (soro de coelho anti-hemácias de carneiro)
- Hemácias de carneiro
- Banho Maria a 37°C e a 56°C
- Soro do paciente
- Centrífuga clínica comum para 3.000 rpm.

### **TÉCNICA DO TESTE**

1. Usar as hemácias de carneiro conservadas em solução de Alsever, lavadas três vezes em solução salina. Após à última centrifugação fazer uma suspensão a 2% na mesma salina usada para a lavagem. Usar um volume destas hemácias e adicionar a igual volume de hemolisina contendo 2 unidades hemolíticas (3 ml de hemácias a 2% + 3 ml de hemolisina com 2UH). Deixar no banho maria a 37°C, por 15 minutos para sensibilizar. Em outro tubo colocar 3 ml de salina e 3 ml de suspensão de hemácias a 2%. Estas hemácias servem de contra-prova.

2. Usar uma microplaca e marcar duas fileiras (cada uma com 12 escavações), uma com a letra A e a outra com a letra B.

3. Colocar em todas as escavações das fileiras A e B, 20 µl de salina.

4. Nos orifícios A1 e B1, adicionar 20 µl de soro inativado do paciente. Com outra ponteira de 20 µl homogeneizar o líquido do 1º orifício passando 20 µl para o 2º, daí para o 3º até o 11º, desprezando 20 µl. Deixar o orifício A12 sem soro (controle). Do mesmo modo, proceder as diluições da fileira B. As diluições do soro em ambas as fileiras são: 1:2, 1:4 ... 1:2048.

5. Adicionar 20 µl de **hemácias sensibilizadas** em todos os orifícios da fileira A, isto é de A1 a A12 e a cada um dos doze orifícios de fileira B adicionar 20 µl de **hemácias não sensibilizadas**. Agitar suavemente e incubar a placa a 37°C por uma hora transferindo-a, em seguida, para a geladeira.

6. Leitura: Após 30 a 60 min na geladeira proceder a leitura. Observar a presença ou não da hemaglutinação em todos os tubos das fileiras A e B, inclusive os controles (A12 e B12).

8. Resultado: É calculado pelo quociente da recíproca da maior diluição do soro que produz aglutinação com as hemácias sensibilizadas, pela maior diluição do soro que aglutina as hemácias não sensibilizadas. Exemplo: se o título da fileira A for de 1:256 (8º orifício) e se o título do mesmo soro na fileira B for de 1:32, teremos:  $256:32 = 8$ . É uma prova *negativa* pois só a consideramos *positiva* com o resultado final igual ou maior que 1/32.

## **TESTE DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO**

### **Considerações Gerais**

O teste de fixação do complemento foi até a década de 1970, amplamente utilizado para diagnóstico de muitas doenças virais, bacterianas, micológicas e parasitológicas. Naquela época esta reação liderava entre as demais executadas nos laboratórios. Em alguns casos, como nos vírus Influenza ela é tipo específica, e no caso dos Arbovírus ela é sub-grupo específica e no caso dos Adenovírus ela é grupo específica. Apresentando ou não especificidade ainda hoje é empregada para o diagnóstico laboratorial. Com o aparecimento dos testes de Imunofluorescência, de ELISA, da Quimioluminescência da Imunoperoxidase e Western Blot ela tem seu uso, atualmente, bastante restrito.

A fixação do complemento em relação a estes últimos testes, perde por sensibilidade e especificidade. Mesmo assim, este teste está longe de cair em desuso e deve continuar sendo útil por algum tempo.

### **Fundamento**

O fundamento do teste baseia-se na propriedade que tem o anticorpo de se combinar com o antígeno e consumir o complemento, evitando a hemólise do sistema revelador.

### **Material:**

- a) Microplacas de fundo côncavo. As microplacas normalmente usadas possuem 96 orifícios. Dependendo da preferência de cada um pode-se usar tubos ou macroplacas. Estes têm, porém, o inconveniente de ser anti-econômicos.
- b) Centrífuga clínica com capacidade de atingir 3000 rpm, rotor horizontal.
- c) Banho maria a 37°C e a 56°C.
- d) Micropipetas de 10, 20 e 25µl e as respectivas ponteiros.
- e) Tubos de centrífuga cônico graduados de vidro.
- f) Tampão Fosfato de pH 7,2 ou solução a 0,85% de Cloreto de sódio contendo ions cálcio e magnésio (Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>+</sup>, sensibilizam a reação).
- g) Hemácias de carneiro a 2% em tampão fosfato ou salina a 0,85%
- h) Hemolisina
- i) Complemento em solução de Richardson (solução conservadora).
- j) Antígeno para o qual se queira pesquisar o anticorpo.
- k) Soro do paciente inativado (56°C por 30 minutos). Nesta operação ocorre a desnaturação do complemento, principalmente da fração C3.

1) Solução salina tamponada com cálcio e magnésio, 10 vezes concentrada conforme fórmula descrita a seguir:

|   |          |
|---|----------|
| NaCl.....   | 70,0g    |
| KCl.....  | 3,7g     |
| NaHPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O.....          | 3,01g    |
| K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 0,24g    |
| MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O.....             | 10,0g    |
| CaCl <sub>2</sub> .....                             | 0,45g    |
| MgCl <sub>2</sub> .....                             | 0,34g    |
| Água destilada q.s.p. ....                          | 1000,0ml |

Diluir os sais separadamente e conservar em geladeira. Na hora de usar diluir a 1/10 em água destilada e, se necessário, ajustar o pH para 7,2 com os mesmos sais usados no preparo da solução.

#### **Técnica da Reação – Padronização dos Reagentes**

Sistema Hemolítico: Hemácias sensibilizadas de carneiro a 2% (antígeno) e hemolisina – soro de coelho anti hemácias de carneiro (anticorpo).

Nota: a Hemolisina é também chamada de soro hemolítico, soro de coelho anti glóbulos de carneiro.

- Hemolisina:** A hemolisina usada é o soro de coelho anti-glóbulos de carneiro. Para se obtê-lo inoculam-se glóbulos de carneiro em coelho e, após haver a formação de anticorpos para glóbulos de carneiro, retira-se o sangue, deixando-se coagular para separar o soro. Centrifuga-se o soro, para se retirar alguma impureza que tenha ficado e inativa-se a 56°C por 30 minutos. Isto visa destruir o complemento do soro. Adiciona-se, então, parte igual de glicerina como preservativo e conserva-se, para uso na geladeira a 4°C.
- Glóbulos de carneiro:** Colheita de sangue: colhe-se a quantidade de sangue de carneiro que se deseja, empregando igual volume de Alsever, que é uma solução anticoagulante conservadora.

#### **Solução de Alsever:**

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Glicose.....               | 2,05g |
| Citrato de sódio.....      | 0,8g  |
| Cloreto de sódio.....      | 0,42g |
| Água destilada q.s.p. .... | 100ml |

Ajustar o pH a 6,1 com a solução à 5% de ácido cítrico. Esterelizar durante 3 dias a 100°C por 30 minutos. O sangue é guardado em geladeira a 4°C e mantido estéril. O sangue de carneiro coletado em Alsever conserva-se bem por 3 a 4 meses desde que não seja agitado a cada vez que for usa-lo, sem variação de resistência globular durante, pelo menos, uma semana. A conservação é tanto

maior quanto menos agitação sofrer o frasco contendo as hemácias. Pode-se conservar até 60 dias em perfeitas condições a 4°C.

- c) **Complemento:** O complemento é obtido mediante punção cardíaca de cobaios adultos e sãos, evitando-se as fêmeas prenhas.

Os animais deverão ser mantidos em jejum durante 12 horas, sendo conveniente usar a mistura de soros de, pelo menos, 4 cobaios, devido ao fato do complemento ser constituído de, pelo menos 9 frações (C1 a C9) e, usando-se apenas um cobaio poderá estar ausente uma ou mais destas frações.

Desloca-se o coágulo imediatamente após se ter formado, deixa-se durante 2 horas a temperatura ambiente e separa-se o soro mediante centrifugação lenta (1500 rpm) durante 10 minutos, de maneira a evitar a hemólise.

Será então misturado com a solução de Richardson, na proporção de 8 partes do soro (complemento) mais uma parte de solução B, mais uma parte de solução A.

A solução de Richardson é constituída de uma solução A e uma solução B.

NOTA: é importante juntar-se ao complemento em primeiro lugar, a solução B e, em seguida a solução A.

#### **Solução de Richardson:**

##### **Solução A**

Ácido bórico ( $H_3BO_3$ ).....0,93g  
Bórax ( $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ ).....2,29g  
Sorbitol ( $C_6H_{14}O_6 \cdot 1/2H_2O$ ).....11,47g  
Solução saturada de cloreto de sódio q.s.p. ....100ml

##### **Solução B**

Borax.....0,57g  
Azida sódica.....0,81g  
Solução saturada de NaCl q.s.p. ....100ml

Observação: dissolver cada substância separadamente em solução saturada de cloreto de sódio juntando-as depois.

#### **d) Titulação do complemento e da hemolisina**

O complemento pode ser titulado ao mesmo tempo com a hemolisina. No primeiro dia, preparam-se as várias diluições do complemento. Para isso junta-se uma parte de complemento e 7 partes de água destilada, ficando o complemento diluído a 1/10, em vista de possuir duas partes de solução de Richardson (1 parte de solução A mais uma parte de solução B).

Exemplo: 0,4 ml de complemento mais 2,8ml de água destilada = 3,2ml = 1/10. De 1/10 proceder as diluições 1/20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100.

Para fazer as diluições em tubos de hemólise, proceder assim:

| Complemento 1/10 | Salina | Diluição |
|------------------|--------|----------|
| 0,5ml (1 mais 1) | 0,5ml  | 1/20     |
| 0,5ml (1 mais 2) | 1,0ml  | 1/30     |
| 0,5ml (1 mais 3) | 1,5ml  | 1/40     |
| 0,5ml (1 mais 4) | 2,0ml  | 1/50     |
| 0,2ml (1 mais 5) | 1,0ml  | 1/60     |
| 0,2ml (1 mais 6) | 1,2ml  | 1/70     |
| 0,2ml (1 mais 7) | 1,4ml  | 1/80     |
| 0,2ml (1 mais 8) | 1,6ml  | 1/90     |
| 0,2ml (1 mais 9) | 1,8ml  | 1/100    |

Ainda no primeiro dia, distribui-se na placa:

- a) 20µl de salina em todos os orifícios, inclusive nos controles de complemento (CC'), e nos controles de hemolisina (ver esquema na página 123).
- b) Colocar 10µl de cada diluição do complemento, inclusive nos controles complemento, não fazendo nos controles de hemolisina.

A placa é colocada na geladeira até o dia seguinte ou na estufa a 37°C por uma hora. Após uma hora de incubação ou uma noite na geladeira, preparar misturas de várias diluições de hemolisina e suspensões de glóbulos de carneiro a 2%. Misturar as diluições de hemolisina e as suspensões de glóbulos em partes iguais, deixar no banho maria a 37°C, para sensibilizar, e distribuir nas placas, numa quantidade de 20µl para cada orifício.

e) **Preparo das diluições de Hemolisina**

Num tubo de Kahn, coloca-se 0,1ml de hemolisina de título desconhecido mais 0,9ml de salina, ficando a diluição a 1/10. Num segundo tubo, colocam-se 0,7ml de diluição 1/10 mais 2,8ml de salina, temos assim a diluição 1/50. Usam-se as diluições 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, etc. Para a obtenção destas diluições, proceder assim:

| Hemolisina 1/50   | Salina     | Diluição |
|-------------------|------------|----------|
| 1. 1,5ml          | Mais 1,5ml | 1/100    |
| 2. 1,5ml (1/100)  | Mais 1,5ml | 1/200    |
| 3. 1,5ml (1/200)  | Mais 1,5ml | 1/400    |
| 4. 1,5ml (1/400)  | Mais 1,5ml | 1/800    |
| 5. 1,5ml (1/800)  | Mais 1,5ml | 1/1600   |
| 6. 1,5ml (1/1600) | Mais 1,5ml | 1/3200   |

Num 7º tubo colocamos apenas 1,5ml de salina (controle).

a) Lavagem dos glóbulos:

Retirar 10ml de sangue, conservado em Alsever, e centrifugar a 1800 rpm por 5 minutos, a fim de retirar a solução de Alsever.

Iniciar a lavagem propriamente dita, retirando-se o sobrenadante (Alsever).

Adicionar 10ml de salina 0,85%, agitar e centrifugar a 1800rpm por 5 minutos.

Repetir a lavagem por mais duas vezes, até obter sobrenadante claro. Na última lavagem (a terceira), antes de se aspirar o sobrenadante, verificar a quantidade de sedimento ou papa de hemácias.

b) Preparo dos glóbulos a 2%:

Completar a quantidade obtida de papa, com salina, para obter uma suspensão de glóbulos a 10%.

Exemplo: Obtendo-se 0,6 ml de papa, completa-se com salina até 6 ml o que corresponde a 10%. Uma parte dos glóbulos a 10% mais 4 partes de salina, o que dá 2%.

Ex: 2 ml de glóbulos 10% mais 8 ml de salina = 2%.

Nota: antes de se iniciar a última lavagem dos glóbulos, colocar a placa na estufa, onde deverá ficar 30 minutos antes de se juntar as hemácias sensibilizadas.

c) Mistura das diluições de hemolisina aos glóbulos a 2%

Ajuntar os glóbulos de carneiro a 2% a cada diluição de hemolisina, em igual quantidade e agitar rapidamente.

1) 1,5 ml de hemolisina 1/100 mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

2) 1,5 ml de hemolisina 1/200 mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

3) 1,5 ml de hemolisina 1/400 mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

4) 1,5 ml de hemolisina 1/800 mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

5) 1,5 ml de hemolisina 1/1600 mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

6) 1,5 ml de hemolisina 1/3200 mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

Constituem-se estas misturas das hemácias sensibilizadas.

7) 1,5 ml de salina mais 1,5 ml de glóbulos de carneiro a 2%.

Colocar estes sete tubos no banho maria a 37°C por 15 minutos.

d) Distribuição na placa:

Após a placa ter ficado na estufa por 30 minutos e a hemolisina ter sido sensibilizada pelos glóbulos de carneiro no banho maria por 15 minutos, faz-se a distribuição na placa, onde foram colocadas as diluições do complemento. Colocam-se 20 µl de cada diluição do sistema hemolítico, inclusive nos orifícios de controle da hemolisina, excetuando-se os orifícios de controle do complemento, onde só se adiciona a suspensão de hemácias e salina (1,5 ml de salina mais 1,5 ml de glóbulos a 2%), 7º tubo. Após a distribuição do sistema hemolítico na



placa agitar a mesma e a cada 10 minutos, no decorrer de 30 minutos. A seguir, retirar da estufa e colocar na geladeira, e 2 horas após fazer a leitura.

| Hemolisina              | Complemento |      |      |      |      |      |      |      |       | Control e do Complemento |
|-------------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|--------------------------|
|                         | 1/20        | 1/30 | 1/40 | 1/50 | 1/60 | 1/70 | 1/80 | 1/90 | 1/100 |                          |
| 1/100                   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 2    | 4    | 5     | 5                        |
| 1/200                   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 3    | 5     | 5                        |
| 1/400                   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 0    | 1    | 3    | 5     | 5                        |
| 1/800                   | 0           | 0    | 0    | 0    | 0    | 2    | 3    | 3    | 5     | 5                        |
| 1/1600                  | 0           | 0    | 0    | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5     | 5                        |
| 1/3200                  | 1           | 1    | 1    | 1    | 2    | 3    | 3    | 4    | 5     | 5                        |
| 1/6400                  | 2           | 2    | 2    | 3    | 3    | 4    | 5    | 4    | 5     | 5                        |
| Controle do complemento | 5           | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5    | 5     | 5                        |

**Leitura:** 0 = não há células, hemólise completa

1 = 10% de células

2 = 25% de células

3 = 50% de células

4 = 75% de células

5 = 100% de células

e) Título da hemolisina:

A dose ótima de sensibilidade da hemolisina é a diluição que dá hemólise completa com a mais alta diluição do complemento. No quadro acima o ótimo de sensibilidade é a diluição de 1/400, que corresponde a 1 UH, unidade hemolítica.

f) Título do complemento:

O título do complemento será dado pela maior diluição do complemento onde houver 50% de hemólise e representará 1 Unidade de Complemento.

Exemplo: Se a maior diluição do complemento onde houver hemólise de 50% for a 1/80, esta diluição corresponderá a 1 unidade do complemento, seguindo o mesmo raciocínio, 1/40 corresponde a 2 Unidades de Complemento.

g) Titulação do antígeno:

1. Preparo das diluições do antígeno:

Preparar em tubos de hemólise as várias diluições do antígeno: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64.

- a) 0,8 ml de antígeno mais 0,8 ml de salina = 1/2
- b) 0,8 ml de 1/2 mais 0,8 ml de salina = 1/4
- c) 0,8 ml de 1/4 mais 0,8 ml de salina = 1/8
- d) 0,8 ml de 1/8 mais 0,8 ml de salina = 1/16
- e) 0,8 ml de 1/16 mais 0,8 ml de salina = 1/32
- f) 0,8 ml de 1/32 mais 0,8 ml de salina = 1/64

2) Preparo das diluições de sor padrão: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160.

- a) 0,2 ml de soro padrão mais 1,8 ml de salina = 1/10
- b) 1,0 ml da diluição 1/10 mais 1,0 ml de salina = 1/20
- c) 1,0 ml da diluição 1/20 mais 1,0 ml de salina = 1/40
- d) 1,0 ml da diluição 1/40 mais 1,0 ml de salina = 1/80
- e) 1,0 ml da diluição 1/80 mais 1,0 ml de salina = 1/160

3) Preparo do complemento:

Se o título do complemento, previamente titulado, for, por exemplo, 1/80 = 1 Unidade do complemento.

Usar 2 unidades do complemento = 1/40

Ex: 0,1 ml do Complemento mais 0,7 ml de água destilada = 1/10

0,8 ml de Complemento mais 2,4 ml de salina = 3,2 ml = 1/40

4) Preparo da hemolisina:

Se o título da hemolisina, previamente titulado, for, por exemplo, 1/800 = 1 Unidade de hemolisina.

Usar 2 unidades de hemolisina = 1/400

1 ml de hemolisina 1/40 mais 9 ml de salina = 1/400.

#### 5) Preparo das hemácias sensibilizadas:

Juntando-se partes iguais de hemolisina 1/400 e glóbulos de carneiro a 2%, após 15 minutos no banho maria, para que a hemolisina sensibilize os glóbulos de carneiro, fica pronta a mistura de hemácias e hemolisina.

#### Distribuição na placa:

No primeiro dia, frontalmente na placa, colocar-se-ão 10 µl de cada diluição do antígeno, sendo que, no orifício de controle do antígeno, serão colocados 20 µl de salina e 10 µl de cada diluição do antígeno.

Horizontalmente na placa, colocar-se-ão 10µl de cada diluição do soro que se quer padronizar, sendo que, no orifício de controle do soro, serão colocados, 10µl de cada diluição do soro e 20µl de salina.

Em todos orifícios da placa serão colocados 10µl do complemento (1/40) inclusive nos orifícios de controles, tanto nos do soro quanto nos de antígeno.

Será feito isoladamente na placa um controle de complemento, ocupando 4 orifícios.

1º orifício: 20 µl de salina mais 10 µl do complemento = 2 unidades de complemento.

2º orifício: 20 µl de salina mais 10 µl de complemento diluído (a diluição se faz num buraco acima, juntando-se 20 µl de salina mais 20 µl de complemento). O 2º orifício corresponderá a 1 unidade de complemento.

3º orifício: 20 µl de salina mais 10 µl de complemento (a diluição se faz em outro buraco acima, juntando-se 30 µl de salina mais 10 µl de complemento).

4º orifício: 30 µl de salina somente, o que corresponderá a nenhuma unidade de complemento que é igual a 0. A placa é colocada na geladeira até o dia seguinte ou por 3 horas à temperatura ambiente a fim de sedimentar as hemácias.

No 2º dia, será colocado o sistema hemolítico. No preparo dos glóbulos para o sistema hemolítico, antes da 3ª e última lavagem coloca-se a placa na estufa, pois deverá ficar por 30 minutos antes de se juntar o sistema hemolítico.

#### Distribuição na placa:

A distribuição deverá ser feita após a placa ter ficado na estufa por 30 minutos e os glóbulos de carneiro terem sido sensibilizados pela hemolisina, no banho maria a 37°C por 15 minutos. Colocam-se 20 µl de hemácias sensibilizadas em todos os orifícios da placa, inclusive nos controles. Deixa-se a placa na estufa por 30 minutos, tendo-se o cuidado de agitar a cada 10 minutos, findo os quais será levada a geladeira por duas horas logo após será feita a leitura.

#### Leitura:

1. A diluição ótima do antígeno é a que fixa maior diluição do complemento. No exame adotado, é de 1/80 e será esta a diluição do antígeno a ser usada na determinação do teste com o soro desconhecido.
2. O título do soro padrão é tomado pela diluição que dá na leitura de 50% de hemólise, a qual, com a ótima diluição do antígeno foi 1/80. O título do soro será 1/80.
3. Leitura do complemento: No primeiro orifício do complemento foram colocados 10 µl, o que corresponde a 2 unidades. Deverá haver hemólise total.

No segundo orifício foram colocados 10 µl do complemento que, diluído, passou a possuir uma unidade. Deverá haver hemólise total.

No terceiro orifício foram colocados 10 µl do complemento que, diluído, passou a possuir 1/2 unidade. Deverá haver hemólise parcial de 50%.

No quarto orifício não foi colocado complemento logo não haverá hemólise.

Reação propriamente dita:

Uma vez dosados (padronizados) o complemento, o antígeno, o soro e a hemolisina, podemos proceder o teste de Fixação do complemento para padronizar o antígeno ou para padronizar o antisoro ou ainda para determinar o título de um determinado soro.

A reação se passa em duas fases. Na primeira fase juntamos o soro, o antígeno e o complemento nas diluições determinadas pela padronização. Na Segunda fase adiciona-se o sistema revelador.

Exemplo de um teste completo:

Tomaremos como exemplo a determinação do título de anticorpos para Adenovírus de um certo paciente.

Material:            Microplaca de 96 orifícios de fundo concavo  
                          Micropipeta de 20 e 25 µl  
                          Salina tamponada  
                          Antígeno de Adenovírus  
                          Complemento  
                          Hemolisina  
                          Hemácias de carneiro  
                          Banho maria a 37°C  
                          Geladeira

Para executarmos o teste de Fixação do complemento com a finalidade de determinarmos o título de anticorpos para Adenovírus, deveremos usar todos os reagentes previamente padronizados e cada um numa diluição fixa, correspondendo a: duas unidades antigênicas, duas unidades

complementares e duas unidades de hemolisina. Assim teremos: se o título do antígeno for de 1/80, duas unidades antigênicas correspondem ao antígeno a diluição de 1/40. O mesmo procedimento deve ser feito para a determinação das duas unidades complementares e hemolíticas, por exemplo, tomar duas vezes a concentração do título final de cada reagente.

#### **Execução do teste:**

1. Tomamos uma microplaca de 96 orifícios de fundo concavo. Separamos uma fileira de doze orifícios e colocamos 20 µl de salina tamponada nos doze orifícios. Separamos uma outra fileira de dois orifícios para controle do soro, dois para controle do antígeno, dois para controle do sistema revelador e dois para controle do complemento. Nestes colocamos, também, 20 µl de salina tamponada
2. Feito isto, colocamos 20 µl de soro do paciente no primeiro orifício da primeira fileira e diluímos sucessivamente com a micropipeta de 20 µl, passando 20 µl para o segundo orifício, daí para o terceiro e assim por diante até o último orifício. Desta maneira teremos o soro diluído de 1/2 até 1/4096 (de um modo geral nos testes de fixação do complemento, não há necessidade de ultrapassar a diluição de 1/512). Nos dois orifícios do controle do soro, colocamos também 20 µl do soro bruto em cada um.
3. Uma vez diluído o soro, adicionamos em cada orifício onde foram realizadas as diluições do mesmo, 20 µl do antígeno contendo duas unidades antigênicas, incluindo nos dois orifícios dos controles do mesmo antígeno.
4. Agita-se a placa suavemente, e adicionam-se 20 µl do complemento contendo duas unidades, em todos os orifícios da reação propriamente dita e nos controles de soro, de antígeno e de complemento. Não se adiciona complemento nos controles do sistema revelador.
5. Após esta operação a placa com a reação poderá ser incubada a 37°C por 1 hora ou na geladeira por uma noite.
6. A revelação é feita com o sistema hemolítico, isto é, uma mistura em partes iguais de hemolisina contendo duas unidades hemolíticas e uma suspensão de hemácias de carneiro a 2% em salina tamponada. Para isso adicionamos 20 µl do sistema revelador em todos os orifícios da reação propriamente dita e nos controles (soro, antígeno, complemento e sistema revelador)
7. Leitura da reação:
  - a) Soro negativo: Não havendo anticorpos, não há consumo do complemento e este livre vai entrar na combinação hemolisina e hemácias, produzindo a hemólise. Se todos os controles estiverem bem, só não haverá hemólise nos controles do sistema revelador.
  - b) Soro positivo: Havendo anticorpos há a reação de anticorpos-antígeno e consumo do complemento até determinada diluição. Vamos supor até 1/128 (com o tempo ocorre sedimentação das hemácias e formam botões). O título de anticorpos do soro é de 1/128. O funcionamento dos controles deve estar correto, isto é, só não ocorre hemólise nos controles do sistema revelador.

**Observações:**

1 – Alguns soros podem apresentar inibidores do complemento (anticomplementar) ou hemaglutininas inespecíficas. As vezes, este fenômeno pode ser notado claramente, isto é, o soro contém hemaglutininas inespecíficas ou anti-complementar. No primeiro caso as hemácias do Sistema Revelador não descem para o fundo do orifício e no segundo caso há a sedimentação das hemácias e notamos a formação de botão. No caso de haver hemaglutininas inespecíficas, tomam-se 0,5 ml de soro e trata-se com 0,1 ml de papa de hemácias de carneiro. Incuba-se a 37°C por 30 minutos, centrifuga-se para separar o soro e procede-se a reação. Se houver inibidores inespecíficos do complemento, tomam-se 0,5 ml do soro e adiciona-se 0,1 ml do complemento bruto, incuba-se a 37°C por 30 minutos. Após isto, inativa-se o soro e procede-se novamente a reação.

2 – Todos os testes de Fixação do Complemento são realizados do mesmo modo. No caso de pesquisarmos anticorpos no soro do paciente, só muda o antígeno. Este deve variar de acordo com o agente etiológico que estamos pesquisando. Esta mesma reação pode ser empregada para diagnosticar o antígeno. Nesta modalidade procederemos de modo inverso ao que fizemos anteriormente. O desconhecido é o agente etiológico (antígeno), como acontece por exemplo, na identificação dos microrganismos isolados. Para isso deveremos ter complemento, hemolisina e anticorpo padronizados. O antígeno entra nas reações em diluições sucessivas e os demais componentes em diluição fixa, conforme nos referimos, anteriormente.

## **ANTIESTREPTOLISINA O (ASLO)**

Os estreptococos beta hemolíticos do grupo A elaboram duas espécies de estreptolisinas:

1. Estreptolisina O, assim chamada por ser sensível ao O<sub>2</sub> e só se manifesta a sua atividade quando o caldo tóxico é tratado com um agente redutor no vácuo. Uma das substâncias químicas usadas é o sulfato de sódio (NaHSO<sub>3</sub>). A estreptolisina S é oxigênio estável, não é antigênica e parece ser idêntica à hemotoxina estreptocócica, que se injetada no camundongo ou coelho produz hemoglobinúria, anemia e icterícia.

A estreptolisina O é fortemente antigênica e induz a formação de anticorpos correspondente, isto é, *antiestreptolisina O* (ASLO). A determinação do título de ASLO é de grande valia diagnóstica na febre reumática e nas infecções pelo estreptococo do grupo A, beta hemolítico. O título de antiestreptolisina é dado em unidades Todd ou Unidades Internacionais. Na febre reumática um nível de 333 UT já é indicador de doença e nas infecções estreptocócicas recentes, um título de 125 UT significa infecção por esta bactéria. Títulos altos ou subida de título em sorologia pareada são significativos.

## **TESTE DE ANTIESTREPTOLISINA O**

O fundamento do teste baseia-se na inibição da hemólise produzida pela estreptolisina O quando esta entra em contato com seu anticorpo correspondente.

Como todo antígeno, a estreptolisina O deve ser padronizada. Os laboratórios de Análises Clínicas já adquirem este antígeno padronizado, pronto para uso. Os fabricantes fornecem a estreptolisina O com as indicações de diluições a serem feitas para a realização do teste.

### **MATERIAL NECESSÁRIO**

- Tampão de fosfato pH 6,5 a 6,7
- Hemácias de carneiro ou humanas do Grupo O
- Pipetas de 1 ml graduada em décimos
- Tubos 13 x 100 mm
- Estante para tubos 13 x 100 mm
- Banho Maria a 37°C
- Soro inativado a 56°C do paciente

Existem muitos soros que possuem inibidores inespecíficos da hemólise, podendo levar a resultados errôneos. Estes inibidores são beta-lipoproteínas e estas podem ser removidas por um dos seguintes processos:

a) Método do dextran - Após à inativação do soro do paciente, tomam-se 0,2 ml deste soro, em um tubo 13 x 100 mm e adicionam-se 1,56 ml de tampão de ASLO mais 0,4 ml de dextran (p.m. 500.000) a 10% em água destilada e 0,2 ml de cloreto de cálcio 1 M. Deixar uma hora em temperatura

ambiente, centrifugar por 10 min. a 1.500 rpm. Colher o sobrenadante. Este sobrenadante corresponde ao soro diluído a 1:10, pronto para se proceder a reação.

b) Método da heparina - A 0,2 ml de soro inativado, acrescentam-se 0,05 ml de heparina a 1%, 1,8 ml de cloreto de cálcio a 0,025 M. Deixar duas horas em temperatura ambiente e centrifugar a 4.000 rpm durante 10 minutos. O soro assim absorvido está diluído a 1:10, pronto para ser usado no teste.

### **TÉCNICA DA REAÇÃO (Rantz & Randall, modificada)**

1 - Após a inativação e o tratamento do soro para a remoção dos inibidores inespecíficos, este fica diluído a 1:10. Necessita-se, para o teste, diluí-lo a 1:100 e a 1:500. Para estas diluições basta tomar 0,5 ml do soro e adicionar 4,5 ml de tampão ASLO, ficando assim a 1:100. Do soro a 1:100, tomamos 1 ml e acrescentamos 4 ml de tampão, temos a diluição de 1:500.

2 - Em uma estante para tubos 13 x 100 mm, separamos uma fileira para 13 tubos e os enumeramos de 1 a 13, colocamos nestes o tampão diluidor, as diferentes diluições do soro e a estreptolisina O convenientemente diluída. Incuba-se a 37°C por 15 minutos e adiciona-se 0,1 ml de uma suspensão de hemácias de carneiro ou humana do grupo O a 2%. Incuba-se a 37°C por dez minutos e procede a leitura da reação. Verifica-se se os controles funcionaram bem. No controle sem estreptolisina não pode ocorrer hemólise e nos controles com hemolisina deve ocorrer hemólise total.

Para melhor entender a disposição dos tubos e a adição dos reagentes basta observar o esquema abaixo:

#### **DOSAGEM DE ANTIESTREPTOLISINA O**

| DILUIÇÕES DO SORO | 1:10 | 1:100 |      |      |      |      | 1:500 |      |      |      |      | controles |      |
|-------------------|------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|-----------|------|
| TUBOS             | 1    | 2     | 3    | 4    | 5    | 6    | 7     | 8    | 9    | 10   | 11   | 12        | 13   |
| SORO DILUÍDO      | 0,1  | 0,5   | 0,4  | 0,3  | 0,25 | 0,2  | 0,15  | 0,5  | 0,4  | 0,3  | 0,2  | -         | -    |
| TAMPÃO ASLO       | 0,4  | -     | 0,1  | 0,2  | 0,25 | 0,3  | 0,35  | -    | 0,1  | 0,2  | 0,3  | 0,75      | 0,5  |
| SLO ATIVADA       | 0,25 | 0,25  | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25  | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | -         | 0,25 |

INCUBAR A 37°C DURANTE 15 MINUTOS

ADICIONAR 0,1 ml DE HEMÁCIAS A 2% EM TODOS OS TUBOS

INCUBAR A 37°C POR 10 MIN.

| DILUIÇÕES DO SORO | 1:10 | 1:100 |  |  |  |  | 1:500 |  |  |  |  | controles |  |
|-------------------|------|-------|--|--|--|--|-------|--|--|--|--|-----------|--|
|                   |      |       |  |  |  |  |       |  |  |  |  |           |  |



|                  |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |    |    |
|------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|----|----|
| TUBOS            | 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11   | 12 | 13 |
| UNIDADES<br>TODD | 50 | 100 | 125 | 166 | 200 | 250 | 333 | 500 | 625 | 833 | 1250 | -  | +  |

- = sem hemólise + = com hemólise

#### LEITURA

Examinar cada tubo, a fim de se verificar qualquer sinal de hemólise. O tubo 12 que é o controle de hemácia, não deve mostrar hemólise e o número 13, controle de estreptolisina deve evidenciar hemólise total. O título do soro corresponderá à maior diluição do mesmo em que não ocorrer hemólise.

Recomenda-se sempre usar um soro padrão para termo de comparação quando se realiza o teste de ASLO. O título final pode ser corrigido pela seguinte fórmula:

Título do soro do paciente:  $\frac{\text{Tít. teórico do soro padrão} \times \text{tít. do soro paciente}}{\text{Título obtido com o soro padrão}}$

Título obtido com o soro padrão

#### TAMPÃO PARA ANTIESTREPTOLISINA O

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....3,17 g

NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1,81 g

NaCl .....7,40 g

Água destilada q.s.p. ....1000,0 ml

Dissolver os sais separadamente em um pouco de água.

Ajuntá-la e completar o volume para 1000 ml.

Conservar em geladeira a 4°C.

## **TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO**

### **INTRODUÇÃO**

O Teste de Neutralização é largamente utilizado no diagnóstico virológico. Serve para a identificação de vírus quando se tem o soro imune específico ou é utilizado para o sorodiagnóstico, isto é, pesquisa do anticorpo para determinado agente etiológico, desde que se tenha o antígeno padronizado. Este varia conforme o agente etiológico de que se suspeita.

As infecções causadas por vírus induzem típicas respostas imunológicas contra um ou mais antígenos virais. Em geral, desenvolvem-se respostas de natureza celular e humoral, de modo que a medida de qualquer uma pode permitir o diagnóstico de virose. O diagnóstico laboratorial de uma infecção viral é realizado a custa de recursos sorológicos, pela demonstração do aumento do título de anticorpos.

Os métodos para quantificar os anticorpos nas viroses, são baseados nas clássicas reações antígeno-anticorpo. Os métodos mais comumente empregados incluem as reações: fixação do complemento, neutralização, inibição de hemaglutinação e imunofluorescência.

Aqui, será dado enfoque ao teste de neutralização, onde serão abordados diferentes aspectos, como fundamento, técnicas e utilidades.

### **FUNDAMENTO**

Os anticorpos neutralizantes de vírus são determinados pela adição de soro, que os contém, a uma suspensão de vírus, inoculando-se depois a mistura em hospedeiros suscetíveis, como culturas de células, ovos embrionados e animais de laboratório.

A presença de anticorpos neutralizantes é demonstrada se os hospedeiros utilizados não desenvolverem efeitos citopáticos, “pocks”, paralisia e ou morte, no caso do uso de culturas de células, ovos embrionados e camundongos respectivamente. Enquanto isso os hospedeiros-controle, que receberam vírus com soro sem anticorpos, desenvolvem o efeito do vírus.

A proteção do hospedeiro contra os efeitos do vírus demonstra a presença de anticorpos neutralizantes.

Em outras palavras, o teste de neutralização baseia-se na capacidade que tem os anticorpos específicos do soro em estudo de neutralizarem determinado vírus, impedindo, assim, a infecção num dado sistema hospedeiro conhecido, caso contrário evidenciaremos a ausência de anticorpos para o vírus em questão.

## **TESTE DE PROTEÇÃO**

Uma outra modalidade de neutralização é o teste de proteção. Este consiste em primeiro lugar, inocular o antissoro para determinado agente viral ou bacteriano, no hospedeiro, como: cultura de células, ovos embrionados e animais, espera-se um tempo de 30 a 60 minutos e após isto inocula-se o agente que se quer testar. Se o soro for eficiente não haverá efeito sobre o hospedeiro.

## **EMPREGO DO TESTE**

- Usado em diagnóstico laboratorial quando se têm soros pareados e se deseja evidenciar a conversão sorológica, ou seja, o aumento de pelo menos quatro vezes do título de anticorpos neutralizantes, do segundo soro para o primeiro.

- Do mesmo modo, usamos o mesmo teste para a avaliação do título de anticorpos. Neste caso, usando-se apenas uma amostra de soro, quando é de interesse conhecer o grau de imunidade do indivíduo para determinado vírus, já que os anticorpos detectados pela neutralização surgem durante a infecção e persistem durante muitos anos.

A imunidade anti-viral é sempre estudada nos exames, principalmente, quando se trata de saber se os pacientes já foram infectados por diferentes vírus ou desenvolveram anticorpos para as vacinas comumente empregadas na profilaxia de viroses, como poliomielite, sarampo, caxumba, raiva, etc.

## **DIFERENTES TIPOS DE REAÇÃO DE NEUTRALIZAÇÃO**

### **1 - Neutralização em Camundongos**

Camundongos de suscetibilidade uniforme e idade-padrão conhecidas são inoculados por uma via padronizada com a mistura vírus e soro. São observadas diariamente a procura de sinais de doença, tais como fraqueza e paralisia, para estabelecer a especificidade das mortes. Os sintomas e as mortes são registradas diariamente durante 21 dias. As mortes que ocorrem nas 24 horas posteriores à inoculação são atribuídas às causas traumáticas ou não virais.

A suspensão viral usada é titulada pela via de inoculação adotada. A dose letal de 50% DL<sub>50</sub> estatisticamente, é calculada e um número determinado de DL é empregado para cada mistura de vírus com soro. Por outro lado, o soro é mantido constante, e as diluições virais, variáveis.

### **2 - Neutralização em Culturas de Células**

Baseia-se no mesmo princípio: o anticorpo viral neutraliza, especificamente, os efeitos citopáticos do vírus.

Em cada série de reações de neutralização são realizadas titulações de controle de vírus, e o vírus é utilizado na reação, na diluição referente a 100 TCD (Tissue Culture Dose).

A concentração mais alta de cada soro é testada quanto a possível toxicidade celular específica. Para remover possíveis substâncias interferentes ou inibidoras inespecíficas, é necessário aquecer o soro a 56°C durante 30 minutos.

Na reação, são feitos controles de células, para a avaliação do teste.

As culturas são incubadas a 37°C durante 3 dias e, depois, examinadas ao microscópio.

Os detalhes da execução desta reação variam, podendo ser feita em tubos - macrotécnica ou em placas - microtécnica.

A técnica descrita a seguir, detalha a execução da reação de neutralização em microtécnica, já que esta não só, é mais econômica que o teste realizado por macrotécnica, em termos de reagentes, como também de fácil manuseio e leitura.

### **3 - Neutralização em Ovos Embrionados**

É bastante usado para vírus respiratórios e o procedimento é, praticamente, igual aos testes realizados em animais ou em células.

## **TITULAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES EM MICROTÉCNICA**

### 1. Preparo das microplacas

- a) Colocar as placas no álcool a 70% por 1 hora;
- b) Tirar o álcool, deixar escorrer e secar na estufa por algumas horas;
- c) Colocar as placas para esterilizar em ultravioleta por 1 hora.

### 2. Material

- Micropipetas de 0,025 ml;
- Microplacas de fundo redondo com tampas;
- Meio Gey ABC com antibióticos;
- Salina estéril;
- Microdiluidores de 0,025 ml;
- Diluições do vírus - volume maior para a diluição correspondente a 100 TCD;
- Soros diluídos 1:4;
- Dessecador;
- Ácido sulfúrico 1M;
- Bicarbonato de sódio 1M.

### 3. Técnica

- A partir do segundo orifício de uma fileira da placa, colocar 25 µl de Gey ABC, usando micropipeta estéril;
  - Colocar 25 µl de soro, previamente diluído em Gey ABC, no primeiro e segundo orifício de uma fileira de placa. Lavar a micropipeta com salina estéril entre um soro e outro;
  - Fazer diluições dos soros a partir do segundo orifício da fileira com ajuda dos microdiluidores;
  - Colocar 25 µl de vírus suspensão contendo 100 TCD com micropipeta, em todos os orifícios;
  - Fazer controle do vírus utilizado no teste, colocando em dois ou mais orifícios da placa 25 µl de Gey ABC e 25 µl de suspensão viral;
  - Agitar levemente, fechar com tampa e colocar em ambiente de CO<sub>2</sub> (dessecador: ácido sulfúrico e bicarbonato de sódio na proporção 2:4 respectivamente);
  - Incubar a 35°C por 2 horas ou manter em geladeira (4°C) por uma noite;
  - No dia seguinte, fazer suspensão de células em meio MEM Eagle com 5% de soro fetal bovino, e colocar 1 gota, com micropipeta, em cada orifício da placa;
  - Todo o experimento deve ser feito de maneira asséptica;
  - Incubar a 37°C por 3 a 5 dias, dependendo do vírus. Obsevar os resultados e interpretar.
- Observações:** A suspensão deve ter 150.000 - 200.000 céls/ml. Não há necessidade de contar em câmara de Neubauer, basta observar através da luz a concentração da suspensão celular.

### **TESTE DE DIFUSÃO EM GEL**

O teste de difusão em gel vem sendo usado há muito tempo. Serve para pesquisar anticorpos no soro ou para identificar microrganismos, como vírus, bactérias, etc. É um método que apresenta pouca sensibilidade, por isso tem sido usado, em menor escala no laboratório de Análises Clínicas.

#### **FUNDAMENTO:**

Baseia-se na difusão de antígeno e de anticorpo colocados lado a lado em um suporte de gel (normalmente, agar ou agarose). No ponto de encontro dos dois teremos uma reação Ag-Ac e precipitação. Neste caso temos a dupla difusão (DD).

Outra técnica consiste em adicionar ao agar, ainda fundido (+/- 45°C) o antígeno ou o anticorpo, dependendo do que se vai pesquisar. Colocando, por exemplo, o antígeno num orifício feito no agar, este se espalha e se combina com o anticorpo formando um halo de precipitação. Neste caso temos a difusão radial simples (DRS).

O teste de DRS presta-se muito para se fazer levantamento sorológico de vários tipos de infecções presentes ou passadas. Um exemplo que a Organização Mundial de Saúde usou muito foi a pesquisa de anticorpos para o vírus Influenza A2, a fim de se fazer um levantamento epidemiológico da gripe no mundo.

## **TÉCNICA DA DRS:**

1. Tomar um agar a 0,5% em tampão de fosfato pH 7,2, fundí-lo em banho maria a 100°C deixar esfriar a 45°C, acrescentando o antígeno em concentração padronizada. Para um antígeno contendo 2,7 mg% de proteína, basta colocar em 3 ml de agar, 30 µl de antígeno, homogeneizar e verter sobre uma lâmina escavada de plástico, tendo o cuidado de nivelar a lâmina para que a camada de agar fique com espessura homogênea. Após à solidificação perfurar a camada de agar com uma agulha de calibre 16 cortada em ângulo reto. Não se dispendo de uma agulha pode-se fazer os orifícios com uma pipeta Pasteur cortada em ângulo reto. Desobstruir os orifícios com pipeta Pasteur e vácuo. A lâmina está pronta para o uso. Em cada lâmina podem-se fazer 48 orifícios.

Se não for usar de imediato as lâminas devem ser embaladas em saquinhos plásticos bem vedados e conservadas a 4°C. Nunca congelá-las.

2. Em cada orifício da lâmina colocar 3 µl do soro de um paciente, não diluído. Após adicionar os soros (não se esquecendo de um controle positivo e um negativo), deixar a lâmina a uma temperatura de 4°C a 8°C, por uma noite.

3. Havendo anticorpos no soro, poderá ser visualizado um halo em redor do orifício, onde o soro for positivo, podendo ser muito nítido ou pouco nítido.

4. Mergulhar a lâmina em salina ou PBS pH 7,2, deixar por 6 horas ou mais. Este mergulho remove o excesso de proteínas e os halos tornam-se bem nítidos.

5. A leitura é feita pela área de precipitação de cada soro que é dada pelo tamanho do halo, em mm<sup>2</sup>. A área será tanto maior quanto mais positivo for o soro.

6. Se preferir guardar a lâmina deve-se corá-la, com tiazina vermelha a 1% ou com Ponceau S a 1% diluído em solução de ácido tricloroacético a 5%.

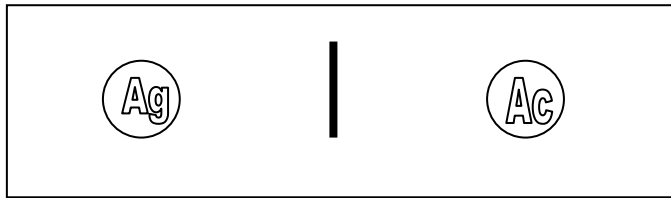
Para a coloração mergulhar no corante durante 30 min. Retirá-la da solução corante, lavá-la ligeiramente em água destilada e mergulhá-la numa solução para a descoloração (solução salina + 5% de ácido acético + 3% de glicerol). Deixar a lâmina mergulhada na solução, agitando de vez em quando, até a descoloração. Após a descoloração, retirá-la do líquido e deixar secar em estufa a 37°C. Vamos ter uma película de agarose que se conserva indefinidamente.

A função da glicerina é evitar a quebra da película de agar.

## **TÉCNICA DA DUPLA DIFUSÃO**

1. Preparar a lâmina com agar sem antígeno e sem anticorpo. Fazer uma série de orifícios sendo um central e outros em torno do central. A distância entre os orifícios externos e o central vai depender do tamanho de cada orifício e da quantidade de reagente que cada um levará.

Também, podem ser feitos dois orifícios, um ao lado do outro, obedecendo à mesma regra usada para o anterior (ver fig. abaixo).



2. Colocar os antígenos nos orifícios laterais e o anticorpo no orifício central no caso de identificar os antígenos ou o antígeno no orifício central e soros nas laterais no caso de identificação dos soros.

Quando se fazem orifícios um ao lado do outro, coloca-se soro em um e antígeno no outro, podendo, ao mesmo tempo identificar o soro ou o antígeno.

Em ambos os casos, no ponto de encontro da difusão do soro e do antígeno teremos linhas de precipitação (ver figura acima e na página seguinte).

## LEITURA

No caso dos orifícios dispostos em círculo em relação a um orifício central, teremos, de acordo com a representação a seguir:

1. Os antígenos A e B são iguais e apresentam linhas idênticas de precipitação com o antissoro do orifício central. Há fusão das linhas. Os antígenos têm o mesmo determinante.

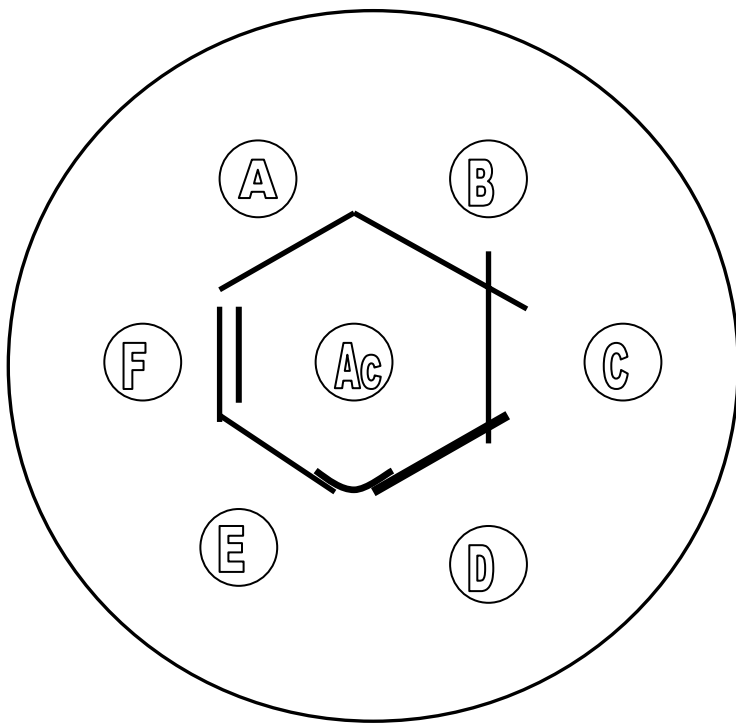
2. Entre os antígenos B e C não há identidade ou dependência imunológica ou reação de intersecção. Os determinantes antigênicos são diferentes.

3. Entre os antígenos C e D há uma identidade parcial com formação de um esporão. Os determinantes C e D que reagem com o soro anti C e D têm parte comum. Porções antigênicas menores entre C e D formam o esporão.

4. Entre os antígenos D e E existe uma identidade parcial além disso diferenças menores entre os dois antígenos mostram duplo esporão.

5. Há uma identidade entre os antígenos E e F, aparecendo a fusão de linhas de precipitação. Entretanto o antígeno F apresenta uma linha de precipitação que não se observa com o antígeno E. O antígeno F apresenta grande cruzamento com E, mas é constituído de porções antigênicas que não encontramos no antígeno E.

A formação de esporão aparece quando dois antígenos são comparados frente a um sistema de anticorpos. Em um sistema possui determinantes ausentes e em outro há, também, determinantes comuns dando uma identidade parcial.





## IMUNOELETROFORESE

A imunoeletroforese é a combinação da eletroforese de dupla difusão em gel de agar, que se realiza em duas etapas. Neste particular aplica-se uma corrente elétrica no sistema.

Na primeira etapa separam-se os componentes de determinado antígeno, graças às diferenças de suas cargas elétricas. Numa 2<sup>a</sup> etapa faz reagir estas frações já separadas com um antissoro específico.

Este método permite caracterização de uma substância, simultaneamente, para três parâmetros:

- a) Saber suas características eletroforética
- b) Difusibilidade
- c) Especificidade imunoquímica

Este é um método que foi utilizado em larga escala em todos os ramos da biologia, por seu alto poder de resolução, bastando mencionar que a eletroforese do soro do indivíduo nos permite evidenciar 30 componentes. Há uma combinação de sensibilidade e de poder de identificação dos diferentes componentes.

Por outro lado, a quantidade de soro é mínima, com apenas 5 µl, pode-se fazer uma análise ampla do material a ser identificado. No soro humano encontramos, pela eletroforese, 5 componentes: albumina, alfa 1, alfa 2, beta e gamaglobulina. Estas frações se separam de acordo com as cargas elétricas.

Numa 2<sup>a</sup> fase, aplicando um soro imune específico paralelo a cada uma das frações e fazendo atuar a corrente elétrica, vamos ter uma combinação de cada fração antigênica com o soro. Ocorre uma combinação de cada fração antigênica com o anticorpo correspondente e, por sua vez, dá-se a separação de outros componentes antigênicos e a respectiva combinação com os anticorpos específicos de cada sub-fração.

Nesta nova fase podemos proceder a análise de grande quantidade de sub-frações combinadas com os seus anticorpos específicos.

Em Análises Clínicas este sistema foi substituído por uma série de testes modernos, mais eficientes e de fácil realização, como os testes de imunoenzimático, fluorimétricos e outros que permitem separação dos componentes como a cromatografia em gel de acrilamida.

## **ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY)**

O ensaio de ELISA é um dos tipos de teste mais empregado nos laboratórios hoje em dia, isto porque ele oferece simplicidade, sensibilidade e dependendo do kit a especificidade superior a de vários testes. A metodologia deste ensaio se mostrou tão eficaz, que ele acabou substituindo os testes de Radio Imuno Ensaio (RIE), justamente por ser um teste mais estável e permitir o armazenamento do kit por um período bem maior sem que seus reagentes sofram degradação.

Os testes de ELISA podem ser classificados em testes Homogeneos e Heterogeneos. Nos testes homogeneos, a atividade enzimática é alterada como parte de uma reação imunológica. Neste tipo de ensaio não há necessidade de separar o imunocomplexo formado dos imunoreagentes livres. As técnicas homogeneas são especialmente elaboradas para a dosagem de drogas e haptenos, mas não tiveram seu uso difundido nos laboratórios de análises clínicas, já que este apresenta problemas na dosagem de proteínas. Por outro lado, os ensaios heterogêneos são amplamente empregados na imunologia. Neste tipo de ensaio, a atividade enzimática do imunoreagente marcado não está diretamente envolvida na reação propriamente dita; no entanto, os reagentes ligados e os reagentes livres devem ser separados uns dos outros.

### **ENSAIOS DE ELISA HETEROGENEOS**

O princípio básico do ELISA heterogêneo se baseia no uso de um antígeno ou anticorpo conjugado com uma enzima que, ao reagir com seu substrato, dá origem a um produto colorido, quimioluminescente ou fluorescente. Se for usado o método colorimétrico, a mudança de cor é monitorada a olho nú ou com o uso de um espectrofotometro para determinar a proporção entre a quantidade de cor produzida e a quantidade de analito presente. Existe uma quantidade enorme de materiais que podem ser usados como suporte para a colocação do antígeno ou do anticorpo. O mais comum é se fazer uso de microplacas de poliestireno, pois estas além de serem pequenas, evitando desperdício de material, permitem que se faça a análise de uma grande quantidade de amostras.

A técnica de ELISA heterogenea, é feita com algumas etapas de lavagem, como forma de separar os imunoreagentes ligados dos que não estão ligados.

Esta técnica permite ainda se fazer uso de ensaios competitivos e não competitivos, podendo ainda dosar antígenos ou anticorpos, neste último caso, todos os isotipos de anticorpos podem ser dosados, tudo depende da especificidade do anticorpo usado.

## **Ensaio competitivo**

Normalmente este tipo de ensaio é usado para se dosar antígenos, neste caso eles possuem fixados ao suporte sólido anticorpos ou antígenos específicos. Estes métodos são também chamados de métodos de reagente limitados, pois o antígeno e o anticorpo são usados em quantidades limitadas. Quando o ensaio usa um anticorpo específico fixado na fase sólida, se adiciona a amostra do paciente contendo o antígeno mais o antígeno marcado, com isso eles irão competir pelo anticorpo fixado na fase sólida. Junto com a dosagem da amostra do paciente se procede um controle do reagente, onde se adiciona apenas o antígeno marcado junto com um tampão a fase sólida, com isso se tem o parâmetro negativo para, assim, pode comparar com o resultado obtido com a amostra do paciente. Isto é necessário, pois o sinal detectado na amostra do paciente é inversamente proporcional a quantidade de analito presente na amostra, ou seja, quanto mais analito na amostra, menor o sinal. Existem variações do ensaio competitivo na qual o antígeno é fixado na fase sólida e o ensaio pode ser realizado em duas etapas. Nesse caso, numa primeira fase se adiciona o soro do paciente no suporte, incuba-se, posteriormente se procede a lavagem para a remoção de tudo que não ficou ligado ao suporte sólido, e então se adiciona o conjugado, e procede-se nova incubação. Nesta etapa, o conjugado irá se ligar ao antígeno livre do suporte sólido, posteriormente, se procede uma nova lavagem e executa-se a fase de revelação e leitura.

Se compararmos os testes competitivos com os não competitivos, veremos que estes oferecem maior especificidade e menor sensibilidade; no entanto isto é dependente da afinidade e pureza dos reagentes imunológicos. Os ensaios competitivos são ideais para dosagem de moléculas relativamente pequenas que podem ser obtidas com relativa pureza em grandes quantidades, a fim de serem marcadas com uma enzima. Como os ensaios competitivos requerem pequenas quantidades de anticorpo, eles são ideais para o uso em sistemas que há pequenas quantidades de anticorpo.

## **Ensaio não competitivo indiretos**

Este tipo de ensaio é um dos mais empregados nos laboratórios de análises clínicas. Assim como os ensaios competitivos, eles podem usar antígenos ou anticorpos fixados a fase sólida. Quando se faz uso de um antígeno fixado a fase sólida, o anticorpo específico presente na amostra, se ligará a este. Posteriormente o anticorpo será detectado com a adição de uma imunoglobulina marcada específica para o anticorpo em questão. Para se detectar diferentes isotipos de imunoglobulina, lança-se mão de imunoglobulinas marcadas específicas para um determinado isotipo. Este tipo de ensaio é muito empregado quando se deseja detectar anticorpos para um determinado agente infeccioso ou auto anticorpos.

Para este tipo de teste, pode-se usar como suporte microplacas de poliestireno, nitrocelulose, esferas e microesferas.

Quando um anticorpo é ligado a fase sólida, estes ensaios são classificados de ensaios de captura ou sanduíche, pois o antígeno presente na amostra, que pode ser um anticorpo também, será capturado pelo anticorpo fixado ao suporte sólido. Posteriormente se adiciona um anticorpo marcado para um epítipo diferente do antígeno em questão, que completará o sanduíche. Existem inúmeras variações deste tipo de ensaio. O antígeno capturado pode ser uma imunoglobulina qualquer, uma proteína viral ou um antígeno qualquer que tenha no mínimo dois epítipos diferentes. Este tipo de ensaio requer que uma grande quantidade de anticorpo esteja fixada na fase sólida, no entanto, oferece uma grande sensibilidade.

Os ELISAs não competitivos podem ser modificados para incorporar camadas adicionais de reagentes imunes, com isso se obtém o aumento na sensibilidade do ensaio, no entanto, isto acaba influenciando no custo e no tempo de execução do teste. A aplicação mais comum é o complexo avidina-biotina, que proporciona um aumento significativo na sensibilidade do teste. O anticorpo biotilado é normalmente usado como o segundo anticorpo do sanduíche. Ele então é posto para reagir com uma mistura previamente preparada de avidina e peroxidase biotilada. Esta peroxidase pode ser desenvolvida com agentes quimioluminescentes como forma de aumentar a sensibilidade.

### **Outras variações do ELISA**

Uma das variantes do ELISA, é a que usa a membrana de nitrocelulose como suporte sólido, ela é chamada de ensaio Dot Blot. Neste tipo de ensaio, o antígeno ou anticorpo é fixado a membrana, e normalmente esta reação é observada pela produção de um produto colorido na membrana, este é apenas um ensaio qualitativo. Os ensaios de Dot Blot podem ser modificados de forma a apresentar uma maior sensibilidade e podem se tornar semi-quantitativos desde que se use um densitometro para ler a cor da reação.

### **Problemas na reação de ELISA**

São vários os problemas que podem aparecer num teste de ELISA, aqui destacaremos os mais comuns, sendo que na tabela da página seguinte, estão representados os que mais aparecem e a forma de tentar resolver.

Um dos problemas do ELISA é a ligação não específica a fase sólida. Quando ocorre a ligação não específica nestes ensaios, nós a detectamos justamente no controle do tampão, pois este acaba apresentando um sinal elevado (chamado de **sinal de fundo**, ou **ruído** pela literatura de língua inglesa), no controle do tampão e no controle negativo da amostra. Só como esclarecimento, o controle do tampão, é aquele que é feito se adicionando apenas o tampão no lugar da amostra do paciente, e todos os reagentes colocados permanecem os mesmos. A absorbância destes controles deve ser menor que 0,1 Unidades de Densidade Ótica (UDO), de preferência deve ser inferior a 0,05 UDO. Se a absorbância for maior que isto, deve-se verificar a etapa de lavagem, se esta foi executada no número

correto de vezes ou ainda, se verificar o conjugado utilizado. Como forma de corrigir o problema, a primeira tentativa de corrigir o problema é aumentando o número de lavagens. Caso isto não resolva o problema, a diluição e a pureza do conjugado enzimático devem ser testados. Se o conjugado não puder ser diluído, sem que isso afete a sensibilidade do ensaio, deve-se pensar em substituí-lo. Outra maneira de resolver este problema é se adicionando soro normal (1 a 5%), da mesma espécie usada no conjugado, no tampão de diluição. Também pode-se usar BSA (Albumina Bovina), na concentração de 1 a 5%, ou qualquer outra proteína inespecífica para bloquear os sítios do suporte sólido que não reagiram como forma de minimizar o problema.

| <b>Problema</b>  | <b>Solução possível</b>  |
|--|--|
| Densidade ótica do controle do PBS elevado.  | Aumentar o número de lavagens  |
| Densidade ótica do controle negativo elevado.  | Bloquear os sítios da fase sólida que não reagiram; aumentar a diluição do conjugado; substituir o conjugado por um de maior pureza; adicionar de 1 a 5% de soro normal da mesma espécie usada no conjugado ao tampão de diluição; trocar o tipo de suporte usado. |
| Controle positivo com valores baixos.  | Tenha certeza de que o suporte usado é o correto; aumente a pureza do anticorpo ou do antígeno de captura; aumente o tempo de ou a temperatura de incubação, verificando antes se ambas estão corretas.  |
| Quando a amostra está pouco diluída, apresenta um resultado moderado, no entanto quando está muito diluída apresenta um valor fora da escala de leitura do aparelho. | Dilua mais a amostra.  |
| O ensaio apresenta valores baixos para tudo (amostra e controles).   | Verifique a integridade do substrato e do tampão, certifique-se que o pH do tampão também esteja correto; verifique o prazo de validade dos reagentes e a forma como foram estocados.  |
| Resultado da amostra do paciente não está condizente com o histórico do mesmo.   | Procure pela presença de anticorpos heterófilos.   |

Outro problema que costuma ocorrer, é a alta absorbância do controle negativo (geralmente acima de 0,2 UDO), algumas das causas podem ser as mesmas que originam a leitura acima de 0,1 UDO do controle do tampão e por isto as soluções a serem aplicadas são as mesmas. No entanto isto pode não funcionar, neste caso o problema pode estar presente no antígeno de captura presente no

suporte sólido. Outras vezes o problema pode ser oriundo da presença de anticorpos heterófilos no soro controle, com a presença de anticorpos para rato, anticorpos para coelho, anticorpos para bovinos, etc. Neste caso se recomenda o tratamento deste soro com anticorpos ou proteínas da mesma espécie de animal de que são compostos os anticorpos de captura ou ainda, trocar o soro controle negativo.

Outro problema que costuma aparecer nos testes de ELISA, principalmente nos testes do tipo sanduíche, é a obtenção de resultados abaixo do esperado para uma amostra de soro de um paciente com sintomatologia clínica definida, neste caso, o que deve estar ocorrendo é que o paciente apresenta altas taxas do analito no soro. O soro do paciente apresentará resultados moderados com a amostra não diluída, mas assim que ela for diluída, ela mostrará resultados elevados, chegando ao ponto de até superar a capacidade de leitura do aparelho. A explicação deste fenômeno não pôde ser bem explicada até hoje. Parece que ela é causada por que há um excesso de antígeno, no qual a maioria dos sítios de ligação do antígeno estão preenchidos, evitando assim a formação do sanduíche. Há também a teoria de que a presença de anticorpos de baixa afinidade, a lavagem inadequada e as concentrações abaixo do ótimo do conjugado resultariam neste efeito. Alguns testes onde se observa este fenômeno são os testes de dosagem da gonadotrofina coriônica (hCG), marcadores tumorais, ferritina e anticorpos e antígenos presentes em doenças infecciosas.

O procedimento recomendável para se evitar o efeito exposto acima, seria o de se processar duas amostras do mesmo soro, uma sem diluir e outra diluída, só que isto implica no fator custo e por isso, não é aplicado. Pode-se então tomar cuidado nas etapas de lavagem, principalmente após a adição de cada anticorpo. Também o conhecimento do princípio do kit, e do material empregado neste ajuda a resolver alguns dos problemas que podem surgir com ele.

Quanto a presença de anticorpos heterófilos, estes podem ser encontrados com especificidade para uma série de proteínas animais (carneiro, cabra, coelho, rato, etc). No entanto o anticorpo heterófilo que parece promover maiores problemas nos ensaios são os anticorpos para proteínas de ratos. Isto geralmente ocorre quando o ensaio do tipo sanduíche usa como anticorpo de captura e anticorpo de detecção, anticorpos monoclonais produzidos em ratos. Com isto o resultado pode se apresentar acima ou abaixo do esperado, dando resultados falso positivos ou falso negativos respectivamente.

A estimativa de anticorpos para proteínas de ratos presente no soro normal varia de 0,5% até acima da casa dos 40%, tudo depende da sensibilidade do teste. Um exemplo disto ocorre com pacientes com câncer que são tratados com anticorpos monoclonais produzidos em ratos, estes apresentam anticorpos para imunoglobulinas de ratos e quantidades cada vez maiores se continuam com o tratamento. Ensaios tipo sanduíche em que se adiciona o anticorpo de captura e detecção em uma única etapa são os que apresentam maior possibilidade de dar resultados falso positivo. Por isso nem sempre devemos ter confiança em testes cujo o resultado sai rápido.

Existem várias técnicas para se reduzir a interferência provocada por estes anticorpos heterófilos, entre estas temos o aquecimento da amostra a 70°C, precipitação com Poli Etileno Glicol

(PEG) e o bolqueio com IgG de rato. Deve-se tomar cuidado com o aquecimento da amostra, pois isto, pode dar origem a resultados falso positivos. A forma mais comum de tratamento tem sido a adição de imunoglobulina não imune, no entanto a quantidade adicionada e a fonte deste soro devem ser observadas. Vários estudos demonstraram que o soro deve ser da mesma cepa de ratos assim como o anticorpo monoclonal utilizado. No entanto é recomendado que se use um pool de soros monoclonais de várias cepas de ratos. Na maioria dos estudos se usou aproximadamente 10% de soro de rato junto com o tampão de reação, no entanto o soro de alguns pacientes requer que seja usada uma quantidade em torno de 25% de soro e um longo período de incubação afim de corrigir a interferência.

Outro problema dos laboratórios quando se procede o ensaio de ELISA está na quantificação da IgM com um anticorpo específico para tal. Esta pode apresentar alguns problemas, como a presença de resultados falso positivos devido a presença do Fator Reumatóide (FR) na amostra, que como já dito anteriormente é também uma IgM. Resultados falso negativos também podem ocorrer devido a competição da IgG pelo mesmo sítio de ligação da IgM.

Uma das formas que simplificou a dosagem da IgM, foi o uso de ensaios de captura para a IgM, neste caso se usa um anticorpo para IgM fixado no suporte sólido, então ao se adicionar o soro do paciente e se proceder a incubação, toda IgM do soro do paciente é capturada. Posteriormente se adiciona um antígeno que se ligará especificamente a IgM. Finalmente se adiciona um anticorpo marcado dirigido ao antígeno previamente adicionado. Este ensaio torna óbvio os problemas com resultados falso negativos devido a inibição competitiva da ligação da IgM assim como toda a IgG presente na amostra do paciente é lavada no primeiro passo. É claro que ainda podem ocorrer resultados falso positivos devido a ligação do FR que pode reagir com a IgG do conjugado ou se ligar a IgG específica para o antígeno presente na amostra. Uma das formas de evitar este problema da ligação com o conjugado é se fazendo o uso de  $F(ab)_2$  como anticorpo de captura. Alternativamente o ensaio pode ser modificado para uma técnica direta, se empregando um antígeno marcado com uma enzima na segunda fase, desta forma eliminando qualquer imunoglobulina que poderia se ligar ao FR. Se fazendo uso destas modificações provavelmente não teremos mais resultados falso positivos, muito embora eles ainda possam ocorrer.

Para sistemas em que não há disponibilidade dos ensaios de captura para a IgM, pode-se lançar mão de um ELISA indireto com o antígeno imobilizado na fase sólida e o uso de um anticorpo específico para a IgM na fase secundária do teste. No entanto isto só pode ser feito se tivermos etapas para adição da amostra e dos imunoreagentes. Deste modo evitaremos os resultados falso positivos e falso negativos. Existem várias formas de se fazer isto. Também existem no mercado colunas capazes de separar a IgG da amostra do paciente, de forma que obtenhamos a IgM pura e com a vantagem de não termos também o FR pois a IgG presa na coluna age como substrato para o mesmo. Também pode-se remover toda a IgG da amostra com a adição de um preparado anti-IgG que agiria como agente precipitante. O problema desta técnica é que não podemos garantir que toda a IgG seja completamente removida da amostra se esta contiver grandes quantidades de anticorpos policlonais.

Além disso isto não elimina a presença do FR na amostra, que deve ser tratada para a sua retirada. Esta pode ser removida se adicionando IgG para que ela se agregue e assim precipite. Só que isto não irá eliminar o resultado falso negativo devido ao alto nível de IgG específica presente na amostra.

Para que o teste de ELISA forneça os resultados dentro dos parâmetros desejados, deve-se sempre ter os seguintes controles correndo junto com o ensaio: controle do PBS ou do tampão, controle negativo, controle positivo alto e baixo. No entanto, durante o teste pode-se adicionar outros controles como a adição de amostras normais de pacientes de forma aleatória. Nos kits em que não se tem o número de controles desejáveis, pode-se adicionar controles internos comprados de laboratórios de confiança, incluindo-se aí controles negativo, e de novo positivo fraco e forte. Também pode-se fazer uso de um mesmo soro controle, o dosando pelo menos umas 20 vezes seguidas em dias diferentes, como forma de verificar se o ensaio se mantém preciso.



## IMUNOFLUORESCÊNCIA

### INTRODUÇÃO

A fotoluminescência é o princípio da técnica de imunofluorescência no entanto, existem três tipos de fotoluminescência, os quais são: a fluorescência, a fosforescência e a fluorescência tardia. Destes apenas a fotoluminescência e fluorescência interessam a nós.

A fotoluminescência ocorre quando moléculas são excitadas pela interação dos fótons com a radiação eletromagnética.

A fluorescência é a radiação de energia que ocorre quando uma luz de comprimento de onda curto excita os elétrons de uma molécula de forma que elas tem o seu comportamento alterado. Conforme as moléculas fluorescentes se tornam excitadas, os elétrons passam para um estado de alta energia por um curto período de tempo, normalmente em nanossegundos. A energia liberada é expressa na forma de luz de um comprimento de onda maior do que o da luz responsável pelo desencadear do processo.

Temos ainda a luminescência é a emissão de luz de uma substância excitada quimicamente que retorna da forma eletronicamente excitada para o seu estado normal.

Descrito então o princípio básico das técnicas de fluorescência, passemos então as aplicações da mesma.

O teste de imunofluorescência é, atualmente, usado em larga escala em uma série de entidades patológicas, tais como: doenças bacterianas, virais, protozooses, parasitoses e doenças imunológicas diversas. Existem duas modalidades de testes de imunofluorescência, o método direto e o indireto.

O método direto é aplicado nos casos em que temos de identificar o microrganismo nas secreções, em biópsias ou necrópsias. Para isso, deve-se ter o soro imune conjugado com fluoresceína ou rodamina para o agente que se quer pesquisar. Este soro imune pode ser policlonal ou monoclonal. Este último confere alta especificidade ao teste.

O método indireto presta-se muito bem ou para pesquisar o agente etiológico nas secreções, nos tecidos (biópsias ou necrópsias) ou para se detectar anticorpos no soro do paciente.

No caso de se pesquisar o microrganismo devemos ter o material fixado a uma lâmina. Este é tratado por um antissoro homólogo e, em seguida, com uma globulina conjugada com fluoresceína ou rodamina específica para aquele antissoro e ler ao microscópio fluorescente. Exemplificando, se tomarmos um material de vesículas da pele para pesquisarmos Herpes simples, dos tipos 1 e 2, deveremos ter os antisoros para os dois tipos do vírus Herpes. O material fixado em uma lâmina adequada é dividido em dois campos e cada campo tratado por um antissoro específico. Após isto, depositar sobre o esfregaço uma globulina específica para o anticorpo usado, conjugada com fluoresceína. Após a reação ler ao microscópio fluorescente. Haverá fluorescência no esfregaço quando houver reação antígeno-anticorpo específico.

Para pesquisarmos o anticorpo, devemos ter a lâmina com o microrganismo para o qual se quer pesquisar o anticorpo. Depositar sobre o esfregaço o soro do paciente, deixar reagir e, posteriormente, colocar a globulina anti-humana, deixar reagir e examinar ao microscópio fluorescente.

## TIPOS DE MARCADORES

O tipo de marcador usado vai depender das características que se deseja ter tais como:

1. Estabilidade por longo período
2. Alta absorvidade e bom rendimento
3. Absorção da luz num espectro visível
4. Não interferir com a reação antígeno-anticorpo

A seguir apresentamos uma lista dos principais marcadores usados nos ensaios de fluorescência, sendo que, o isotiocianato de fluoresceína e a rodamina são os mais usados.

**Isotiocianato de Fluoresceína:** É largamente usado para a marcação de anticorpos e analitos. É um dos que apresentam melhor relação de absorção e emissão de luz, ocorrendo em nanosegundos. É uma molécula hidrofóbica e é emitida comprimento de onda próximo ao comprimento da luz emitida.

**Fluorocromos de Rodamina:** Os derivados de Rodamina como a tetrametilrodamina possuem a emissão num comprimento de onda maior que o do isotiocianato de fluoresceína. Os derivados de rodamina podem ser usados junto com o isotiocianato de fluoresceína fornecendo assim imagens multicoloridas, em geral isto é feito nos citômetros de fluxo, e no sequenciamento de DNA.

**Ficobiliproteínas:** Estas proteínas são encontradas em algas e tomam parte no processo de fotossíntese. As principais classes de ficobiliproteínas são as Ficoeritrinas, Ficocianinas e as Aloficocianinas. A emissão de luz por estes compostos é cerca de 30 vezes maior que o da fluoresceína e por isto vem se tornando cada vez mais usada nos imunoenaios.

**Marcadores fosforescentes:** Estes apresentam a vantagem de ser muito sensíveis sem, contudo, promover o sinal de fundo indesejado, ou seja, emitir luz sem que haja a presença do que se deseja observar. Alguns dos marcadores fosforescentes são a Eritrosina (tetrahidrofluoresceína), eosina 5' isotiocianato e metaloproteínas.

**Quelatos de terras raras e criptatos:** Os quelatos de terras raras como os quelatos de lantanídeos apresentam a emissão de fluorescência por um período bastante longo e por isto são os preferidos nas reações que se gasta muito tempo para fazer a leitura.

Os criptatos de terras raras também são usados nas reações que se deseja uma fluorescência duradoura.

**Umbeliferona:** é um reagente que não apresenta a mesma resolução que o isotiocianato de fluoresceína, e por isto não é tão usado.

## **PROBLEMAS NOS IMUNOENSAIOS**

Os problemas mais comuns nos imunoenaios se referem a sensibilidade do ensaio que pode ser afetada pela concentração do analito presente na amostra em estudo. Alguns dos problemas se referem a dispersão de luz nas soluções contendo altas concentrações de proteínas e partículas coloidais, fluorescência de fundo devido a presença de múltiplos compostos orgânicos na amostra ou impurezas nos reagentes, ou a não fluorescência devido a ligação de proteínas não específicas, mudanças do pH, ou interferência de compostos químicos.

O pré tratamento do soro com substâncias proteolíticas, oxidantes ou reagentes desnaturadores como perácidos, podem ajudar a eliminar a fluorescência de fundo.

## **TÉCNICAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA**

### **1 - Imunofluorescência Direta**

a) Material necessário:

- Lâmina limpa com delimitações circulares para se colocar o antígeno;
- Tampão de fosfato pH 7,2;
- Antígeno particulado. No caso dos vírus usaremos células infectadas;
- Soro imune específico conjugado com fluoresceína;
- Micropipetas de 10, 20 e 25 µl;
- Pipetas de 5 ml;
- Glicerina alcalina;
- Microscópio epifluorescente.

b) Técnica:

Vamos supor que se queira pesquisar Herpes vírus num raspado de vesícula de pele.

Em uma lâmina limpa delimitada com círculos, colocar o material em 3 ou 4 círculos, deixar secar ao ar e fixá-lo com acetona gelada. Após isto, colocar sobre o esfregaço antissoros específicos para vírus Herpes tipos 1 e 2, de preferência monoclonais, conjugados com fluoresceína. Incubar as lâminas em ambiente úmido a 37°C por 30 a 40 minutos. Lavar com tampão de fosfato pH 7,2. Secar, cobrir com glicerina alcalina e ler no microscópio epifluorescente. Se por exemplo, houver fluorescência no esfregaço em que foi colocado o antissoro, o vírus implicado será o Herpes do tipo 1 ou 2.

Observação: Ainda não temos testes sorológicos específicos para diferenciar o Herpes 1 do 2, mas temos estudos em andamento.

### **2. Imunofluorescência Indireta**

a) Pesquisa do microrganismo ou do elemento que se deseja no material do paciente, tais como: secreções, tecidos, etc.

- Fazer o esfregaço como no processo direto;

- Adicionar o soro imune específico para o microrganismo que se suspeita e deseja identificar. Esperar 30 a 40 minutos, incubando a 37°C em câmara úmida. Após este tempo lavar a preparação a fim de remover o que não reage;

- Secar a lâmina, com auxílio de um secador de cabelo e cobrir o esfregaço com globulina anti-humana, conjugada com fluoresceína. Incubar a 37°C por 30 a 40 minutos em câmara úmida. Após este tempo, lavar com água destilada ou com tampão pH 7,2, bastando gotejar sobre a lâmina o líquido por ½ minuto;

- Secar, usando o ar aquecido de um secador de cabelo, cobrir o esfregaço com glicerina alcalina e examinar ao microscópio epifluorescente. Não há necessidade de cobrir com lamínula.

b) Pesquisa de anticorpo no soro

- O esfregaço do microrganismo deve ser feito em lâmina delimitada com círculos. O antígeno é fixado como foi explicado anteriormente;

- No caso de se desejar determinar o título de anticorpos no soro, diluir este sucessivamente e colocar 5 µl de cada diluição nos círculos contendo o antígeno. Incubar a 37°C por 30 minutos em câmara úmida;

- Lavar com tampão pH 7,2 gotejando o líquido sobre a lâmina por 1 minuto, secá-la com ar aquecido, usando secador de cabelo;

- Cobrir os esfregaços com globulina anti-humana conjugada com fluoresceína na diluição fixa determinada na padronização. Neste caso podemos empregar gama globulina total (IgG, IgM, IgA), só IgM ou só IgG, dependendo da finalidade do diagnóstico. Incubar por 30 a 40 minutos. Após este tempo, lavar como anteriormente;

- Secar e cobrir a preparação com glicerina alcalina;

- Ler no microscópio epifluorescente. Não havendo fluorescência significa reação negativa. Se o soro examinado contiver anticorpos vai haver fluorescência até determinada diluição. Vamos supor que houve fluorescência até 1/640, esta diluição corresponde ao título do soro.

### Observações importantes:

a) Em todos os testes temos que usar sempre um soro positivo para termo de comparação, de preferência com título conhecido;

b) Em caso de dúvida a imunoglobulina deve ser sempre retitulada. Para isto basta proceder da seguinte maneira:

- Tomamos como exemplo o teste para o *Toxoplasma*.

- Em uma lâmina contendo o esfregaço com o antígeno de *Toxoplasma gondii*, adicionar, em cerca de 12 círculos contendo o esfregaço, uma diluição fixa de soro humano contendo anticorpos para *T. gondii*. Por exemplo, se tivermos um certo soro com o título para *T. gondii* de 1/4096, fazer uma diluição deste a 1/512 e adicionar o soro assim diluído em todos os orifícios da lâmina. Incubar por 30 a 40 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após isto, lavar e secar como descrito anteriormente.

- Preparar diluições sucessivas da imunoglobulina conjugada que se deseja determinar o título. Adicionar 10 µl a cada diluição do soro nos círculos separados da lâmina, incubar 30 a 40 minutos a 37°C em ambiente úmido. Lavar, secar e adicionar glicerina alcalina. Ler ao microscópio epifluorescente.

- Leitura: Se a fluorescência ocorreu até a diluição de 1/320, esta diluição corresponde ao título da imunoglobulina. Para uso pode-se diluir a 1/160 a fim de obter uma boa margem de segurança nos testes.

### PREPARO DOS REAGENTES

1 - Tampão de fosfato - PBS (Phosphate Buffer Saline), 0,01 M e pH 7,2

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....12,0 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O .....2,2 g

NaCl .....85,0 g

Água bidestilada q.s.p. ....1000,0 ml

Esta solução é 10 vezes concentrada e deve ser guardada em geleadeira a 4°C, adicionando à mesma azida sódica na preparação de 1/1000. Para uso, diluir 1/10 em água destilada pH 7,0.

2 - Solução Tampão de Carbonato - Bicarbonato de Sódio a 0,5 M e pH 9,5 (Esta solução é para alcalinizar a glicerina)

Solução A

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> .....5,3 g

Água bidestilada q.s.p. ....100,0 ml

Solução B

NaHCO<sub>3</sub> .....4,2 g

Água bidestilada q.s.p. ....100,0 ml

Para o uso, misturar 1 volume de A e dois de B. Esta mistura é a solução 2, usada na alcalinização da glicerina.

### 3 - Glicerina alcalina

Glicerina p.a. ....9 volumes

Solução 2 .....1 volume

Conservar em geladeira. Esta glicerina alcalina é usada nas preparações da imunofluorescência e a sua função é excitar a fluorescência quando os raios ultravioletas incidem na preparação.

### 4 - Solução de azul de Evans

Azul de Evans .....10,0 mg

PBS pH 7,2 q.s.p. ....100,0 ml

Esta solução é misturada ao conjugado na concentração de 0,1 ml para 1 ml de conjugado diluído. A função do azul de Evans é a de suprimir a fluorescência inespecífica deixando apenas a reação específica. Quando se trata o teste com este corante todo o campo fica de cor vermelha, sobressaindo a fluorescência.

Observação importante: Ao preparar o PBS deve-se usar água destilada ou bidestilada com pH neutro. Normalmente o pH da água destilada é de 5,0 a 5,5. Deve ser neutralizado com solução de hidróxido de sódio normal.

O PBS diluído para os testes de imunofluorescência deve ser sempre recente. Mesmo conservado em geladeira não pode ser usado após uma semana de preparado. O tampão velho sempre interfere nos testes de fluorescência, negativando a reação ou baixando o título de anticorpos.

## MICROSCÓPIO

Existem dois tipos de microscópio fluorescentes, o hipofluorescente, ultrapassado e o epifluorescente.

No Microscópio hipofluorescente, como o próprio nome diz, significa que a luz ultravioleta entra por baixo atravessando o condensador, atravessa a lâmina para depois sensibilizar o objeto a ser examinado. Para se usar este tipo de microscópio a lâmina da preparação tem que ser de vidro muito bom e fina, a fim de não haver muita perda dos raios UV. Por outro lado, na hora da leitura deve-se colocar entre a lâmina e o condensador uma gota de óleo de cedro especial para fluorescência. Este óleo tem a finalidade de preencher o espaço que existe entre o condensador e a lâmina da preparação a fim de não haver perda e dispersão dos raios UV. Este óleo funciona mal, porque além de sujar o microscópio não permite movimentar muito a lâmina. Por esta dificuldade o número de testes realizados em microscópio deste tipo é muito baixo. Resumindo, é um equipamento ultrapassado. Por outro lado, deve-se sempre mudar os filtros de UV com diferentes cores e espessuras. De um modo geral, neste caso preferem-se o BG12.

O Microscópio epifluorescente a luz sai da objetiva e incide diretamente sobre o objeto. Neste caso não há necessidade de óleo nem de lâminas especiais. Não há perda dos raios UV e a lâmina pode

ser movimentada livremente. A capacidade de trabalho é muito alta e proveitosa. Os microscópios deste tipo já têm filtros embutidos, não havendo necessidade de troca.

### **Lâmpadas usadas**

As melhores são as de mercúrio existindo de capacidades diferentes, dependendo do aparelho. As mais usadas são: HBO200, HBO100 e HBO50. Também são usadas lâmpadas de halogênio, estas duram mais, mas a sensibilidade é baixa, principalmente, quando se usa conjugado com rodamina.

## **QUIMIOLUMINESCÊNCIA**

As moléculas quimioluminescentes são usadas em ensaios diretos ou indiretos como substratos para enzimas em ensaios imunoenzimáticos, aliás, o princípio dos ensaios de quimioluminescência é o mesmo dos ensaios de ELISA.

A emissão de luz nos ensaios quimioluminescentes se dá quando uma molécula sai do seu estado excitado para o seu estado normal, mas a quimioluminescência difere da imunofluorescência pois a reação ocorre devido a uma reação química e não devido a excitação luminosa. A maioria das reações de quimioluminescência ocorrem devido a uma reação de oxidação, que faz com que ocorra a excitação de uma molécula e assim que ela retorna ao seu estado normal emite uma certa quantidade de luz visível. O rendimento dos ensaios de quimioluminescência é inferior a 10% no entanto isto não torna a reação inviável. A emissão de luz é detectada por aparelhos chamados de Luminômetros, estes aparelhos podem utilizar como detectores um tubo fotomultiplicador, sensor fotoelétrico, diodo de silicone ou filme fotográfico.

Algumas das reações de quimioluminescência envolvem a reação do Luminol com peróxido de hidrogênio e peroxidase dando como produto o isoluminol, a oxidação do Ester de acridina pelo peróxido de hidrogênio ou a decomposição do Adamantil 1,2 dióxido etano aril fosfato pela Fosfatase alcalina. Estas reações são altamente sensíveis e a emissão de luz destas pode ocorrer como um rápido flash ou ter uma emissão prolongada que pode permanecer por horas. A reação com o ester de acridina, por exemplo, é uma reação muito rápida, que emite um flash de luz muito curto, variando de 300 nanosegundos até 2 segundos, já a reação com o luminol pode durar até 2 minutos, assim como a reação com o Adamantil 1,2 dióxido etano aril fosfato.

Os ensaios de quimioluminescência são classificados em ensaios Heterogêneos e Homogêneos.

### **Ensaio Heterogêneo**

O marcador mais comum neste tipo de ensaio é o ester de acridina, ele pode ser usado como marcador de antígenos ou anticorpos, desde que se use conjugadores químicos como a carbodiimida ou a mistura de anidridos.

Costuma-se usar micropartículas magnéticas como fase sólida nos ensaios em que se usa o ester de acridina. Neste caso se costuma proceder a incubação do soro em um suporte sólido, contendo ao antígeno, posteriormente se adiciona o conjugado com o ester de acridina, procede-se nova incubação e finalmente se revela a reação com a adição de peróxido de hidrogenio para produzir a luz numa fração de nanosegundos. Esta reação pode sofrer interferência no pH alcalino pois os anions OH podem reagir com ester de acridina bloqueando o ataque do HO<sub>2</sub> e assim evitando a decomposição do ester. Esta reação indesejável pode ser evitada se pré incubando o soro com o conjugado no pH entre 5 e 7. Como a reação com ester de acridina é muito rápida, ela só é realizada quando o tubo com o material em estudo está frente ao detector do aparelho. O limite de detecção com o ester de acridina é de 0,5 amol.

O Luminol também pode ser usado neste tipo de detecção, no entanto ele é menos eficiente, para diminuir esta deficiência passou-se a usar derivados deste como o Isoluminol (aminobutil N-etil isoluminol), que oferece o limite de detecção na casa dos 50 amol.

### **Ensaio homogêneo**

Neste tipo de ensaio, a ligação do anticorpo a um antígeno marcado com um composto quimioluminescente acaba modulando a emissão de luz, uma vez que é possível distinguir entre o anticorpo ligado ao conjugado e o não ligado, sem que seja necessário separá-los, isto acontece porque a emissão de luz do conjugado ligado ao anticorpo pode ser maior ou menor que a do conjugado livre, depende do marcador usado no conjugado. Como exemplo temos um teste em que se dosa a progesterona com o uso de conjugados com o isoluminol, quando este conjugado se liga especificamente a anticorpos para a progesterona, ocorre o aumento de intensidade de luz em até 4 vezes. Outro exemplo, está em alguns kits que dosam anticorpos para o cortisol, fazendo uso de conjugados de cortisol com isoluminol, quando este conjugado se liga ao anticorpo específico, ocorre uma queda na emissão de luz pelo isoluminol.

Também existem ensaios em que se faz a transferência de energia entre uma molécula marcadora doadora e aceptor. Um exemplo disto está em ensaios que se usa o Isoluminol como a fonte de excitação de energia para um marcador de fluoresceína. Neste caso, supondo que o ensaio seja feito para a detecção de um antígeno, usa-se um anticorpo marcado com fluoresceína para se ligar ao antígeno específico e outro conjugado, só que este será o antígeno marcado com o luminol. O que vai ocorrer então é a competição do antígeno não marcado com o marcado pelo anticorpo marcado com a fluoresceína. O isoluminol sozinho emite a luz num comprimento de onda de 460 nm, quando ele está ligado com a fluoresceína ele emite luz no comprimento de onda de 525 nm. A média da taxa de emissão de luz obtida, quando comparada com um padrão é que irá fornecer qual a quantidade de antígeno presente na amostra. Este princípio vem sendo aplicado em kits para a detecção de progesterona, AMP cíclico e imunoglobulinas das classes G e M.



## INTRODUÇÃO

Atualmente, a técnica de Western Blot (WB) tem sido utilizada para estudos detalhados de uma série de microrganismos incluindo bactérias, vírus e protozoários.

Para cada microrganismo há pequenas variações no tocante ao preparo dos reagentes, mas o fundamento da reação é o mesmo. Este teste tem muita semelhança com o ELISA, mudando apenas o suporte antigênico que é feito em papel de nitrocelulose.

Como padrão daremos o exemplo da obtenção dos reagentes, montagem e utilização do teste para Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV). Com este exemplo, a compreensão do teste ficará bem clara.

A técnica de Western Blot teve sua origem na metodologia desenvolvida em 1975 por E.M. Southern, que utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida realizou a separação de proteínas por peso molecular em um estudo de hibridização DNA-RNA. Este trabalho foi acompanhado, em 1977, pela demonstração por Van Raamsdork de uma técnica para a detecção de determinantes antigênicos, em moléculas separadas por peso molecular, em gel de poliacrilamida, através de um teste imunoenzimático utilizando a enzima peroxidase. Finalmente Harry Towbin, em 1979, demonstrou a possibilidade de transferir as moléculas separadas em gel de poliacrilamida para folhas de nitrocelulose, facilitando a manipulação das proteínas em uma matriz mais resistente. A união destas três metodologias formam a técnica de enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay ou técnica de Western Blot.

A técnica de Western Blot é composta de quatro estágios:

### 1º estágio - **Eletroforese em gel de poliacrilamida**

No primeiro estágio a preparação purificada de HIV-1 é submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida, havendo a separação por peso molecular dos componentes antigênicos virais que formam bandas de proteínas na matriz do gel.

### 2º estágio - **Transferência das bandas**

O material antigênico viral separado é transferido do gel de poliacrilamida para folha de nitrocelulose que é então cortada em tiras, contendo os componentes do vírus separados em bandas.

### 3º estágio - **Reação antígeno-anticorpo**

As tiras de nitrocelulose, contendo os antígenos virais, são colocadas em contato com os soros dos pacientes e soros controles. Os anticorpos séricos específicos para os componentes virais, irão reagir com as respectivas bandas, formando complexos antígeno-anticorpo macromoleculares, que ficam retidos nas tiras de nitrocelulose.

#### 4º estágio - **Revelação dos complexos antígeno-anticorpo**

A revelação dos complexos antígeno-anticorpo é realizada através da utilização de um conjugado constituído de anti-imunoglobulina humana marcada com uma enzima e o substrato enzimático.

### **METODOLOGIA**

#### *1 - Preparação do antígeno*

Normalmente o antígeno utilizado na técnica de Western Blot é preparado a partir de cultura de linfoblastos humanos infectados com HIV-1 e estimulados com fitohemaglutinina. Após aproximadamente seis dias de cultura, quando o sobrenadante da cultura apresenta pico de produção de vírus, determinado pela atividade de transcriptase reversa, a cultura é submetida a centrifugação para a remoção das células linfoblásticas. O líquido sobrenadante, rico em partículas virais, é então submetido a ultracentrifugação em gradiente de sacarose, para a obtenção de massa viral purificada. A massa obtida é então ressuspensa em tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,0 contendo duodecil sulfato de sódio e 2-mercaptoetanol, e após aquecimento é titulada para a padronização da técnica.

#### *2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida*

A separação eletroforética de proteínas depende da carga eletrostática, do peso molecular e da configuração tridimensional das moléculas protéicas. O tratamento das proteínas virais, com duodecil sulfato de sódio, elimina a interferência da carga eletrostática, por tornar as proteínas negativamente carregadas. A utilização de agentes redutores, como o 2-mercaptoetanol, promove a quebra das pontes dissulfeto das proteínas globulares, alterando a estrutura tridimensional, de forma que todas as proteínas virais passam a ter a mesma configuração espacial. O tratamento da amostra viral com o detergente duodecil sulfato de sódio e o agente redutor 2-mercaptoetanol, elimina a interferência da carga eletrostática e da configuração tridimensional das proteínas, permitindo a separação eletroforética apenas pelos diferentes pesos moleculares das proteínas que constituem o HIV-1.

O gel de poliacrilamida formado pela polimerização, devido a reação entre a acrilamida e a bis-acrilamida, formando uma rede tridimensional, sendo a densidade desta rede determinada pelas concentrações de acrilamida e bis-acrilamida. A concentração da acrilamida determina a porosidade do gel e, por conseguinte, a velocidade com que as proteínas de diferentes pesos moleculares migram no gel quando submetidas à corrente elétrica. A concentração de bis-acrilamida é responsável pela elasticidade e resistência do gel. Ao mesmo tempo em que as proteínas virais são aplicadas no gel de poliacrilamida, uma solução de proteínas de pesos moleculares conhecidos é também aplicada, sendo separadas em bandas que servem como pontos de calibração, para estimular o peso molecular das bandas de proteínas virais.

### *3 - Transferência para nitrocelulose*

Após a separação eletroforética dos antígenos virais, as bandas protéicas são transferidas do gel de poliacrilamida para a matriz de nitrocelulose. A folha de nitrocelulose é colocada sobre a superfície do gel, e o sistema é submetido a eletroforese, sendo a corrente elétrica dirigida do gel para a folha de nitrocelulose. As bandas protéicas são então transferidas para a folha de nitrocelulose, mantendo o padrão de bandejamento obtido pela eletroforese no gel de poliacrilamida. A folha de nitrocelulose é cortada em fitas, que conterão as bandas protéicas virais.

### *4 - Reação para evidenciação de anticorpos para HIV-1*

As fitas de nitrocelulose contendo os antígenos virais, separados por peso molecular, são expostas aos soros dos pacientes e soros controles positivo e negativo. Os anticorpos séricos para as diferentes proteínas virais irão reagir com as respectivas bandas, formando complexos macromoleculares que permanecem fixados à fita. Posteriormente, as fitas são lavadas para retirar os anticorpos inespecíficos, que não reagem com os componentes virais.

### *5 - Revelação da reação*

As fitas são expostas a um conjugado, sendo normalmente utilizada a anti-imunoglobulina G humana marcada com enzima que pode ser a peroxidase. O conjugado reage com o complexo antígeno-anticorpo fixado na fita de nitrocelulose. Após a lavagem da fita, para retirar o conjugado não complexado, é acrescentado o substrato enzimático, que no caso da peroxidase é representado pelo peróxido de hidrogênio e uma substância cromógena como a diaminobenzidina. Há o aparecimento de bandas coradas na região onde ocorreu a reação do anticorpo com o componente protéico viral.

## **BIBLIOGRAFIA**

McDonnell, W.M., Askari, F.K., 1997. Immunization. *JAMA* 278(22):2000-2007.

Fields, B.N., 1996. *Virology* Lippincott- Raven Publishers

Rueckert, R.R. *Picornaviridae: The viruses and their replication*. em Fields, B.N., 1996 *Virology*. Lippincott- Raven Publishers Vol.1: 609-654