

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE AQUISIÇÃO DE CÉLULAS POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA A AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA VACINA RNA MCTI CIMATEC HDT CONTRA SARS-COV-2

Elen Azevedo da Costa¹; Carlos Augusto Oliveira Júnior²; Alana Costa de Oliveira³; Emanuelle de Souza Santos⁴; Milena Botelho Pereira Soares⁵, Bruna Aparecida Souza Machado⁶

¹ Bolsista; Desenvolvimento Tecnológico e Industrial – DTI-B; elen.costa@fbter.org.br

² Bolsista; Desenvolvimento Tecnológico e Industrial – DTI-B; carlos.j@fbter.org.br

³ Coordenadora, Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Ba; alana.oliveira@fieb.org.br

⁴ Coordenadora, Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Ba; emanuelle.santos@fieb.org.br

⁵ Professora Titular; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Ba; milena.soares@fieb.org.br

⁶ Orientadora, Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-Ba brunam@fieb.org.br

RESUMO

A pandemia de COVID-19 destacou a importância da pesquisa científica evidenciando a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que permitissem auxiliar no diagnóstico da doença bem como avaliar a resposta imunológica. Para isso, a padronização de métodos se faz necessário para assegurar a confiança e reprodutibilidade dos resultados, por conta disso o objetivo deste trabalho foi realizar uma validação do tipo concorrente para comparar os métodos de referência para aquisição de dados utilizados na avaliação da imunogenicidade da Vacina RNA MCTI CIMATEC HDT, realizada por citometria de fluxo. A partir da análise do perfil celular mediante a avaliação do tamanho e complexidade celular e expressão dos marcadores imunofenotípicos não foi verificada diferenças significativas, demonstrando que a metodologia utilizada no citômetro da BD FACS Melody do SENAI/CIMATEC está apta para a obtenção dos resultados.

PALAVRAS-CHAVE: Citometria de fluxo; validação; COVID-19.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde a pandemia do coronavírus causado pelo SARS-COV-2 foi responsável pela morte de mais de seis milhões de pessoas ao redor do mundo¹. Nestas circunstâncias, houve um grande investimento para o desenvolvimento de testes diagnósticos capazes de detectar uma possível infecção pelo vírus bem como uma escalada na produção de vacinas que reduzissem o risco de complicações e o índice de mortalidade^{2,3}.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a quantificação das respostas imunológicas frente as vacinas, dentre elas a citometria de fluxo que consiste na quantificação de células marcadas com anticorpos acopladas a um fluorocromo específico para um marcador de interesse⁴. Neste período da pandemia o uso desta técnica para mensurar a resposta imunológica ganhou mais espaço exercendo uma forte influência nos dados publicados⁵, fato que demonstra a necessidade de assegurar que os procedimentos operacionais possam garantir robustez e reprodutibilidade dos dados. A preparação e armazenamento das amostras, a calibração de equipamentos e a padronização e otimização dos protocolos utilizados auxiliam no aperfeiçoamento dos processos, assegurando um melhor desempenho das funções contribuindo para uma maior confiabilidade dos dados gerados.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi validar os métodos de referência para aquisição de dados utilizados na avaliação da imunogenicidade, realizada por citometria de fluxo da Vacina RNA MCTI CIMATEC HDT.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma validação do tipo concorrente, que se refere a uma combinação de validação retrospectiva e prospectiva, aplicada no caso de um processo similar a outro previamente validado. Para isso, amostras de sangue foram coletadas e submetidas a técnica de separação por gradiente de densidade (Ficoll-Hypaque, Histopaque/ Sigma-Aldrich) para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por meio da centrifugação, que foram posteriormente criopreservadas até o uso. As células foram cultivadas em placas de 96 poços nas seguintes condições: a) apenas com meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific); b) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA - *Phytohemagglutinin*) como

controle positivo nas concentrações de 5 µg/mL e 10 µg/mL; c) com a Spike, proteína-específica do SARS-COV-2, na concentração de 2,5 µg/mL.

As células foram incubadas na estufa de cultura por 24h à 37°C e 5% de CO2 e quatro horas antes do término foram adicionados a monensina e brefeldina em todos os poços. Para a realização da marcação das células foram utilizados anticorpos marcadores de superfície (CD3 - APC-H7, CD4 - Krome Orange, CD8 - PerCP-Cy 5.5, CD107a - FITC, CD69 - BV786, CD137 - PE, CD40 - PE-Cy7, CD19 - FITC, CD30 - BV421). Foi realizada a permeabilização das células para a marcação dos anticorpos intracelulares (IL-2 - BV421, TNF-α - BV750, IFN-γ - PE-Cy7, IL-5 - PE, IL-13 - APC, Granzima B -Alexa Fluor 647) e em seguida a fixação. Foram realizadas várias etapas de lavagem e posteriormente as células foram mantidas em PBS 1X até a aquisição nos citômetros.

Como critério de avaliação foram utilizadas análises realizadas no citômetro de fluxo BD LSRFortessa da FIOCRUZ-Ba comparando às realizadas pelo citômetro BD FACSMelody do SENAI/CIMATEC avaliando o perfil celular (tamanho e granulosidade) bem como a frequência da expressão de marcadores imunofenotípicos. Como critério para aceitação dos valores, a variação aceitável é de ± 5%.

3. RESULTADOS/DISCUSSÃO

Durante a pandemia de coronavírus ficou ainda mais evidente a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que pudessem auxiliar no diagnóstico rápido e preciso das respostas imunológicas frente a vacinação. A padronização dos experimentos se faz necessário para afastar a possibilidade de variáveis que possam comprometer os resultados, tornando a técnica reprodutível e confiável⁶, atrelado a isso, o ato de validar um processo ou equipamento certifica que o resultado encontrado é realmente o esperado⁷.

A partir dos resultados encontrados na análise do perfil celular mediante a avaliação do tamanho e complexidade celular e expressão dos marcadores imunofenotípicos dos dados adquiridos nos dois citômetros LSFortessa da FIOCRUZ-Ba e o BD FacsMelody do SENAI/CIMATEC, foi verificado que não há diferenças significativas entre os dados, indicando assim que a metodologia utilizada na aquisição de dados no citômetro da BD FacsMelody do SENAI/CIMATEC está apta, podendo dar continuidade na obtenção dos resultados.

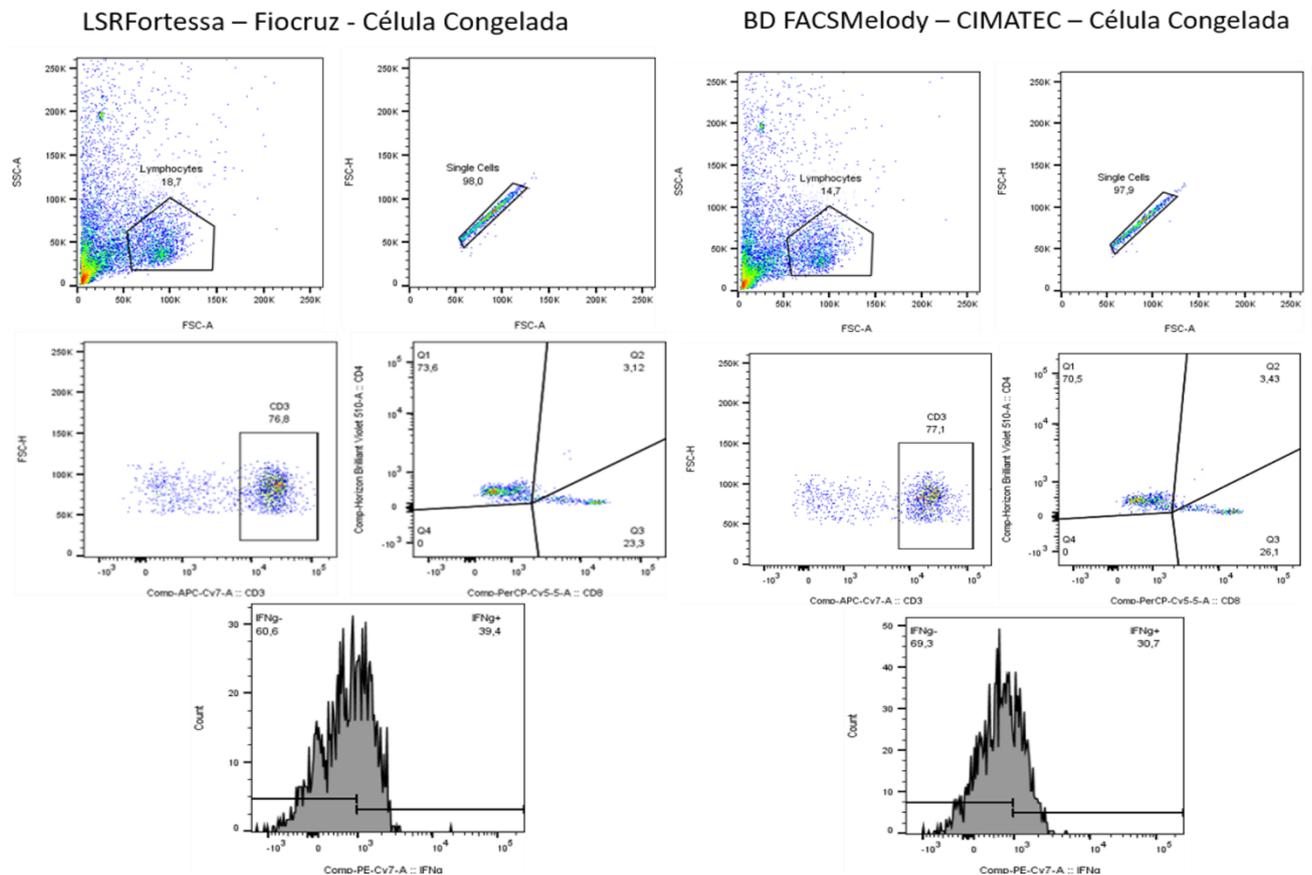


Figura 1: Análise do perfil celular nos citômetros LSRFortessa (FIOCRUZ-Ba) e BD FACSMelody (SENAI/CIMATEC)

O estabelecimento de um procedimento operacional padrão para a preparação das amostras e a aquisição dos dados aperfeiçoam os resultados garantindo que possíveis discrepâncias não sejam devido a procedimentos errôneos que possam causar desvios nos resultados^{7,8}. Desta forma, a validação propicia robustez e efetividade dos resultados gerados assegurando a garantia de qualidade do processo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, pode-se verificar que o método utilizado para aquisição de dados no citômetro BD FacsMelody do SENAI/CIMATEC pode continuar a ser executado visto que no processo de validação este foi considerado apto, conforme metodologia previamente validada.

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa concedida e o apoio da equipe do ISI-SAS, particularmente à equipe da Citometria.

5. REFERÊNCIAS

1. WHO – World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. (2023). Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>. Acesso em 22 março 2023
2. Pardi, N., Hogan, M. J. & Weissman, D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Current Opinion in Immunology* **65**, 14–20 (2020).
3. Edwards, A. M., Baric, R. S., Saphire, E. O. & Ulmer, J. B. Stopping pandemics before they start: Lessons learned from SARS-CoV-2. *Science* (80-.). **375**, 1133–1139 (2022).
4. Cossarizza, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* **49**, 1457–1973 (2019).
5. del Molino del Barrio, I., Hayday, T. S., Laing, A. G., Hayday, A. C. & Rosa, F. Di. COVID-19: Using high-throughput flow cytometry to dissect clinical heterogeneity. *Cytometry Part A* (2021). doi:10.1002/cyto.a.24516
6. Kalina, T. Reproducibility of Flow Cytometry Through Standardization: Opportunities and Challenges. *Cytometry Part A* **97**, 137–147 (2020).
7. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Regulamento técnico das boas práticas para a fabricação de medicamentos. (2003). Disponível em: http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/resolucao210_04_08_03.pdf. Acesso em 24 março 2023.
8. Kaur, G., Rana, A. C., Bala, R. & Seth, N. An overview: the role of process validation in pharmaceutical industry. *IRJP* 2012.