

VALIDAÇÃO INTERENSAIO DA IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS T E B POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA VACINA RNA MCTI CIMATEC HDT CONTRA SARS-COV-2

Carlos Augusto Oliveira Junior¹; Elen Azevedo da Costa²; Alana Costa de Oliveira³; Emanuelle de Souza Santos⁴; Milena Botelho Pereira Soares⁵; Bruna Aparecida Souza Machado⁶

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

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

³ Especialista I; Centro Universitário SENAI CIMATEC; alana.oliveira@fieb.org.br

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

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

⁶ Orientadora; Centro Universitário SENAI CIMATEC; brunam@fieb.org.br

RESUMO

A doença do coronavírus, causada por infecção pelo SARS-CoV-2, tem sido o mais grave desafio de saúde pública neste século. Estudos recentes têm demonstrado a capacidade das vacinas desenvolvidas em gerar respostas de anticorpos neutralizantes e células T específicas ao SARS-CoV-2 por vários meses após a vacinação. A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem sido a principal técnica utilizada como método de avaliação das células T e B durante os ensaios clínicos para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, os ensaios experimentais para a avaliação da imunogenicidade destas vacinas precisam ser validados para garantir a reprodutibilidade dos dados obtidos. Desta forma, foi realizada uma validação interensaio para avaliação dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem. Foi verificado que não houve diferenças significativas para os anticorpos avaliados, com exceção do CD69-BV786 que apresentou uma variação maior que 5 do stain index.

PALAVRAS-CHAVE: Citometria de Fluxo; Imunofenotipagem; Validação interensaio

1. INTRODUÇÃO

A doença do coronavírus (COVID-19), causada por infecção pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), tem sido o mais grave desafio de saúde pública neste século. A melhor opção para o seu controle é o desenvolvimento de vacinas que sejam seguras e eficazes para a proteção da população. Desde janeiro de 2020, esforços contínuos para o desenvolvimento destas vacinas estão em andamento, com cerca de 11 vacinas aprovadas pela OMS para uso emergencial.¹ Dentre elas, destacam-se as vacinas de RNA mensageiro, que necessitam apenas a sequência gênica do antígeno alvo e não dependem da cultura de patógenos (vacinas inativadas ou vivas atenuadas) ou produção de proteínas recombinantes em grande escala. Estudos recentes têm demonstrado a capacidade destas vacinas em gerar respostas de anticorpos neutralizantes e células T específicas ao SARS-CoV-2 por vários meses após a vacinação.^{2,3}

A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem sido a principal técnica utilizada como método de avaliação das células T e B no desenvolvimento de vacinas, permitindo a análise com alta precisão e sensibilidade. No entanto, a garantia da reprodutibilidade dos ensaios experimentais em citometria de fluxo é essencial para interpretação correta dos dados, tornando o processo confiável e preciso. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi realizar uma validação interensaio do método de referência para imunofenotipagem de células T e B por citometria de fluxo no estudo de fase 1 da vacina RNA MCTI CIMATEC HDT.

2. METODOLOGIA

Foi realizada uma revalidação, com o objetivo de avaliar a precisão interensaio (reprodutibilidade) e é aplicada quando o procedimento passa por mudanças, que pode afetar o processo, com o intuito de garantir que os reagentes se mantenham capazes de atingir os resultados esperados. Após descongelamento das PBMC, um total de 1×10^6 células/mL foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco®- Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) e 1% de antibiótico-antimicótico 100x (Gibco®- Thermo Fisher Scientific), em placa de 96 poços somente com meio RPMI (controle não estimulado) ou proteína Spike (2,5 µg/mL), durante 24 horas à 37°C, 5% de CO₂ em estufa de cultura. A fitohemaglutinina

(PHA, 5 µg/mL) foi utilizada como controle positivo. Monensina e Brefeldina A foram adicionadas em todos os poços durante 24 horas de incubação. Após o estímulo in vitro por 24 horas, as células foram lavadas com solução de PBS 1x, e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (T.A) com anticorpos para marcadores de superfície, incluindo CD3 (APC-H7), CD4 (Krome Orange), CD8 (PerCP-Cy 5.5), CD107a (FITC), CD69 (BV786), CD137 (PE), CD40 (PE-Cy7), CD19 (FITC), CD30 (BV421) com 10% de Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 1x, e incubadas com CytoFast Fix/Perm (Biolegend) por 15 minutos e depois lavadas duas vezes em tampão Perm/Wash (Biolegend). Para marcação intracelular, as células foram incubadas em T.A por 20 minutos com anticorpos incluindo IL-2 (BV421), TNF-α (BV750), IFN-γ (PE-Cy7), IL-5 (PE), IL-13 (APC), Granzima B (Alexa Fluor 647). Após a última etapa de lavagem, as células foram mantidas em PBS 1x para aquisição no BD FACSMelody™. Como critério de avaliação foi utilizada a metodologia de Stain Index, que consiste um método para ajudar a determinar a intensidade relativa de um fluorocromo em um determinado instrumento e é calculado para um parâmetro fluorescente subtraindo a mediana da população negativa da mediana da população positiva, dividindo essa quantidade pela variância de a população negativa, multiplicada por 2. Essa metodologia foi aplicada em todos os experimentos que apresentaram população de células positivas e negativas. Como critério para aceitação dos valores, a variação aceitável entre os ensaios foi de ± 5 em relação ao valor do Stain Index.



Figura 1. Fórmula de cálculo do Stain Index

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados encontrados na análise dos anticorpos mediante a avaliação do Stain index dos dados adquiridos no ensaio referência e no ensaio teste, foi verificado que não houve diferenças significativas para os anticorpos avaliados, com exceção do CD69-BV786 que apresentou uma variação maior que 5 do Stain Index, informando que a dispersão entre as populações positivas e negativa não está suficiente para uma boa análise, sendo sugerido uma nova validação com volumes maiores.

Tabela 1. Tabela descritiva dos valores do stain index do ensaio referência e ensaio teste.

Marcador (Fluorocromo)	Ensaio Referência (Stain Index)	Ensaio Teste (Stain Index)
CD3 (APC-H7)	10,52	8,74
CD4 (Krome Orange)	4,50	3,16
CD8 (PerCP-Cy 5.5)	6,07	8,36
IFN-γ (PE-Cy7)	3,37	2,86
CD107a (FITC)	5,54	4,25
CD19 (FITC)	3,40	3,81
CD40 (PE-Cy7)	4,48	3,76
CD137 (PE)	3,46	4,30
TNF (BV750)	12,81	13,32

IL5 (PE)	11,04	14,57
IL2 (BV421)	3,18	4,14
Granzima B (Alexa Fluor 647)	27,02	22,24
CD69 (BV786)	11,24	19,93
CD30 (BV421)	2,87	7,25
IL13 (APC)	11,16	10,53

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, pode-se verificar que o método utilizado para aquisição de dados pode continuar a ser executado visto que no processo de validação este foi considerado apto, conforme metodologia previamente validada. Para o anticorpo CD69-BV786, novas validações serão realizadas.

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

¹WHO – COVID19 vaccine tracker. Disponível em: <<https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/>>. Acesso em: 27 mar. 2023.

²SAHIN, U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, v. 586, n. 7830, p. 594–599, 2020.

³WIDGE, A. T. et al. Durability of responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccination. *The New England journal of medicine*, v. 384, n. 1, p. 80–82, 2021.