

# Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia

José Roberto Mineo

Maraisa Cristina Silva

Paula Cristina Brígido

Helena Maria Caleiro Acerbi Penha

EDUFU

Manual ilustrado de práticas  
laboratoriais em Imunologia



Av. João Naves de Ávila, 2121  
Campus Santa Mônica - Bloco 1S  
Cep 38408-100 | Uberlândia - MG  
Tel: (34) 3239-4293

**REITOR**

Elmiro Santos Resende

**VICE-REITOR**

Eduardo Nunes Guimarães

**DIRETORA DA EDUFU**

Belchiolina Beatriz Fonseca

**CONSELHO EDITORIAL**

Adriana Pastorello Buim Arena

Carlos Eugênio Pereira

Emerson Luiz Gelamo

Fábio Figueiredo Camargo

Hamilton Kikuti

Marcos Seizo Kishi

Narciso Laranjeira Telles da Silva

Reginaldo dos Santos Pedroso

Sônia Maria dos Santos

**EQUIPE DE REALIZAÇÃO**

Editora de publicações

Assistente editorial

Revisão

Projeto gráfico e editoração

Capa

Maria Amália Rocha

Leonardo Marcondes Alves

Leonardo Remiggi Burgos

Mariana Gomes da Silva Ferreira

Thaís Silva Santos

Vinícius Prando Timm

Ivan da Silva Lima

Paula Cristina Brígido

José Roberto Mineo  
Maraisa Cristina Silva  
Paula Cristina Brígido  
Helena Maria Caleiro Acerbi Penha

Manual ilustrado de práticas  
laboratoriais em Imunologia

EDU FU

Copyright 2016 © Edufu  
Editora da Universidade Federal de Uberlândia/MG  
Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução parcial ou total por qualquer meio sem permissão da editora.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

M294i Manual ilustrado de práticas laborais em Imunologia / José Roberto Mineo ... [et al.]. - Uberlândia : EDUFU, 2016.  
114 p. : il.

Inclui bibliografia.  
ISBN: 978-85-7078-445-2

1. Imunologia. 2. Imunologia - Manuais de laboratório.  
3. Laboratórios. 4. Biossegurança. I. Mineo, José Roberto, 1953-  
II. Título.

CDU: 612.017

---

*“Acreditamos que a educação sozinha não  
transforma a sociedade, sem ela tampouco a  
sociedade muda.*

*Se a nossa opção é progressiva, se estamos a favor da  
vida e não da morte, da equidade e não da injustiça,  
do direito e não do arbítrio, da convivência com o  
diferente e não de sua negação, não temos outro  
caminho se não viver a nossa opção.*

*Encarná-la, diminuindo, assim, a distância entre o  
que dizemos e o que fazemos”.*

Paulo Freire



# Sumário

Prefácio.....	9
1. Biossegurança: normas de conduta no laboratório .....	11
2. Órgãos e células do sistema imune.....	21
3. Separação de linfócitos do sangue periférico.....	31
4. Estimulação do Sistema Imunológico.....	35
5. Isolamento de Imunoglobulinas do Soro .....	41
6. Reações imunológicas no diagnóstico de patologias .....	47
7. Reação de microaglutinação: diagnóstico VDRL.....	55
8. Imunoprecipitação .....	61
9. Imuno-hemólise.....	69
10. Fagocitose .....	75
11. Óxido Nítrico .....	79
12. Teste cutâneo de puntura ( <i>Prick Test</i> ).....	83
13. Ensaio imunoenzimático.....	89
14. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	95
15. SLOT-BLOT.....	101
16. Anexos .....	105
17. Referências.....	111



## Prefácio

A Imunologia é composta por temas que explicam como o nosso sistema imune nos protege contra o desenvolvimento de diversos tipos de doenças, desde as infecciosas, inflamatórias e tumorais, bem como na rejeição de transplantes e mesmo na determinação da saúde. Os exames laboratoriais complementares, que auxiliam no diagnóstico de diversas patologias, buscam relacionar a presença e interação de diversos componentes celulares e moleculares do sistema imune, em especial os anticorpos e linfócitos, com moléculas relacionadas ao agente agressor, conhecidas como antígenos. A interação entre antígeno e anticorpo in vitro é a base dos testes e práticas laboratoriais imunológicas e seu entendimento é importante para compreender como esse intrincado sistema “funciona”. Técnicas laboratoriais em imunologia auxiliam a entender a Imunologia como ciência e a modificá-la, uma vez que a ciência não se copia, e sim se aperfeiçoa. Auxiliam ao aproximar o conhecimento científico da aplicabilidade prática, para pouco a pouco vencermos a luta contra as doenças. Auxiliam na formação de recursos humanos e no desenvolvimento social, com vistas a promover o direito à saúde.

Assim, o Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia busca integrar a imunologia teórica com a prática de uma forma visualmente atrativa direcionada a diferentes tipos de

leitores: acadêmicos dos cursos de graduação em Biomédicas, pós-graduandos e profissionais da área que queiram conhecer o passo-a-passo de diversos procedimentos e seus respectivos objetivos. O Manual inicia com as normas de Biossegurança para laboratoristas, mostrando a preocupação dos autores em “discutir” sobre o alerta ao leitor em relação à segurança do profissional e comunidade. Em seguida, apresenta diversos procedimentos *in vitro*, como separação de linfócitos do sangue periférico, imunoprecipitação, dosagem de óxido nítrico, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), entre outros, muitos deles rotineiramente empregados como recursos no diagnóstico de diversas doenças. Traz informações quanto à execução da avaliação da resposta alérgica *in vivo*, pelo teste de puntura a aeroalérgenos. Em sua última página, contém linhas para o leitor fazer suas anotações, comentários sobre seus erros e acertos, dúvidas e sugestões, indicando a preocupação dos autores de que o “Manual” se aproxime do usuário/leitor, que seja aperfeiçoado por ele e modificado de acordo com as suas vivências, uma vez que a ciência nasce e é construída todo dia com base em cada experimento, de cada nova ideia.

Dessa forma, o Manual Ilustrado de Práticas Laboratoriais em Imunologia poderá ser uma “ferramenta” e estar próximo à bancada de trabalho para uma consulta rápida ou mesmo ser um livro de cabeceira, em que nossos sonhos serão o limite. Apreciem a leitura, “risquem e rabisquem” o manual que é de todos e participem assim da construção da Imunologia como ciência.

*Mônica Camargo Sopelete*

Doutora em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, na  
área de Aeroalérgenos pela Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-doutoranda pela Fapemig no ano de 2006,  
Professora Adjunta III do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia

# 1

## Biossegurança: normas de conduta no laboratório

A palavra laboratório provém da união de duas palavras latinas: *labor* = **trabalho** + *oratorium* = **lugar de reflexão**. Assim, o laboratório é um local de trabalho e concentração. É um ambiente construído especificamente para a execução de experimentos, no qual os cientistas desenvolvem suas atividades diárias, como o estudo de protocolos para identificação, separação e determinação de substâncias, obtenção de novos produtos farmacêuticos e formação de recursos humanos. São vários os objetos de estudo de um laboratório de ciências biológicas – da pesquisa do funcionamento de organismos ao desenvolvimento e consequências das patologias, bem como a procura por novos medicamentos. Para ter segurança e sucesso na realização desses experimentos é necessário seguir algumas normas gerais de conduta.

**Objetivo da atividade prática:** conhecer o espaço do laboratório e compreender as normas de conduta para a realização de aulas práticas com sucesso e segurança.

**Procedimento experimental:** o professor apresentará o laboratório e apresentará as normas de conduta para o uso dele.

**Normas de gerais de conduta no laboratório:**

- Vestir o jaleco antes de entrar no laboratório. O jaleco deve ser longo e de mangas compridas, de preferência confeccionado em tecido de algodão, já que as fibras sintéticas são altamente inflamáveis e podem reagir com alguns produtos químicos. Não usar saias, bermudas ou calçados abertos.
- Pessoas que têm cabelos longos devem mantê-los presos enquanto estiverem no laboratório.
- Seguir as orientações fornecidas pelo professor. Procure solucionar suas dúvidas antes de começar o trabalho, lendo atentamente o roteiro.
- Todos os experimentos devem ser realizados com o acompanhamento do professor e/ou monitores.
- Comunique ao professor e/ou monitores qualquer incidente ou acidente, por menor que seja.
- Zelar pela conservação e preservação dos materiais e equipamentos.
- Não sentar ou se debruçar na bancada, nem sentar no chão.
- O laboratório é um local de estudo. Não se admite descuidos ou brincadeiras.
- Não comer e beber dentro do laboratório. Evite levar as mãos à boca ou ao rosto enquanto estiver trabalhando.
- Nunca provar ou cheirar os produtos. Os produtos químicos podem provocar danos às pessoas, materiais e meio ambiente; por isso devem ser manuseados com o máximo cuidado.

- Não usar frascos para beber nenhum líquido, mesmo que você tenha certeza absoluta de sua limpeza.
- Usar os equipamentos de proteção individual (EPI) de acordo com a especificidade de cada experimento. Quando for necessário, sob orientação do professor e/ou monitor utilize o lava-olhos e/ou chuveiro.
- Não mexer em trabalhos previamente montados e outros materiais não utilizados na aula.
- Não jogar nenhum material dentro da pia ou ralos. Coloque-os no cesto de lixo apropriado para descarte. Ao jogar qualquer material líquido nas pias, peça ajuda ao professor.
- Não abrir nenhum frasco e nem tocar neles sem a devida orientação do professor.
- Não misturar substâncias ao acaso.
- Não usar materiais de vidro quebrados ou rachados.
- Ter cuidado com o manuseio de material quente.
- Não atender ao celular. O seu uso pode distrair sua atenção e causar acidentes.
- A organização da bancada de trabalho é imprescindível para a realização de um trabalho eficiente e para evitar acidentes.

### **Princípios gerais das técnicas de laboratório:**

- Usar sempre uma microponteira, ou pipeta de plástico ou vidro para cada reagente a fim de evitar contaminações.
- Após o uso das microponteiras, descontamine-as nas soluções indicadas pelo professor e/ou monitores, ou despreze-as nas caixas de papelão amarelo próprias para materiais perfuro-cortantes.

- Evitar trocas de rolhas e/ou tampas de reagentes.
- Ao aquecer o tubo de ensaio na chama direta (bico de Bunsen), observar se o tubo está bem seco, caso contrário, seque-o antes de efetuar a operação. Para que o tubo seja uniformemente aquecido, utilizar pinças especiais ou um anel de papel para manutenção do tubo em constante agitação. Nunca dirigir a boca do tubo em direção a si mesmo ou ao colega, para evitar contato com o material trabalhado.
- Esperar sempre que o **vidro quente** volte a esfriar antes de pegá-lo. O vidro quente parece sempre estar frio.
- Ao terminar o uso do bico de Bunsen, verificar se as torneiras do gás estão bem fechadas, para evitar assim explosões e intoxicações.
- Nunca abrir frascos de líquidos inflamáveis (éter, álcool, acetona, benzeno etc.) nas proximidades de chamas.
- Ler duas vezes o rótulo dos frascos de reagentes antes de utilizá-los.
- Nunca devolver a solução para o frasco estoque, porque pode estar contaminada.
- Antes de introduzir microponteiras, pipetas de plástico ou vidro nas soluções, certificar se elas estão limpas.
- Para preparar soluções de ácidos fortes (sulfúrico, clorídrico, nítrico etc.), verter sempre o **ácido sobre a água**, nunca a água sobre o ácido, pois pode ocorrer uma reação exotérmica violenta.
- Para o preparo das soluções alcalinas como o hidróxido de sódio (NaOH), por exemplo, tome bastante precaução, pois a reação é exotérmica e corrosiva. Manter o frasco em banho de gelo para evitar quebras. Nunca aspirar vapores desprendidos da solução em questão.

- Para verificar o odor da substância, nunca leve o rosto diretamente sobre o frasco.
- Para preparar soluções alcoólicas, o álcool e a água devem ser medidos separadamente e depois reunidos, porque há diminuição do volume total.
- O material volumétrico vem calibrado com água destilada a uma temperatura pré-determinada (15°C, 20°C e 25°C).
- Como usar os micropipetadores:
  - Para volumes entre 0 e 1mL, usar micropipetador de 1mL graduado ao centésimo.
  - Entre 1 e 2mL, usar micropipetador de 2mL graduado ao centésimo.
  - Entre 2 e 5mL, usar micropipetador de 5mL graduado ao décimo.
  - Entre 5 e 10mL, usar micropipetador de 10mL graduado ao décimo.
- O líquido no interior da vidraria em contato com o ar forma um menisco. A leitura deve ser feita na parte inferior do menisco e na altura da linha dos olhos.
- Para medir substâncias corrosivas ou tóxicas, obter a extremidade superior da pipeta com um pouco de algodão ou usar uma bureta, que é mais segura. Recomenda-se também o uso de pipetadores automáticos ou do tipo pera.
- Ao pipetar sangue, ácido concentrado ou soluções alcalinas concentradas, lavar imediatamente com água o material utilizado.
- Deixar os materiais contaminados com sangue em solução com hipoclorito de sódio 1% e água durante 30 minutos.

## Técnicas de higienização das mãos

As mãos devem receber cuidadosa atenção antes e durante as aulas práticas, tanto para evitar a contaminação do material usado nos protocolos quanto para a proteção individual durante todo o procedimento. A higienização das mãos apresenta as seguintes finalidades: remoção da sujeira, suor, oleosidade, pelos, células descamativas e da microbiota da pele. A eficácia da higienização das mãos depende da duração e da técnica empregada.

- I. As mãos devem ser lavadas antes e após a realização dos procedimentos.
- II. Recomenda-se a utilização de luvas em caso de rachaduras ou ferimentos na pele das mãos, ou quando houver contato com material infeccioso.

*Importante:* antes de iniciar a higienização das mãos, é necessário retirar joias (anéis, pulseiras, relógio), pois sob tais objetos podem se acumular microrganismos, por exemplo. Tais objetos podem ser recolocados após a higienização.

### **Higienização simples das mãos: lavagem com água e sabão**

**Objetivo:** evitar a contaminação do material do laboratório, removendo microrganismos que colonizam as camadas superficiais da pele, bem como o suor, a oleosidade e as células mortas. Duração do procedimento: 40 a 60 segundos (Figura 1a).

#### **Importante:**

--> No caso de torneiras com contato manual para fechamento, sempre utilize papel-toalha.

--> O uso coletivo de toalhas de tecido é contraindicado, pois elas permanecem úmidas, favorecendo a proliferação bacteriana.

--> Deve-se evitar água muito quente ou muito fria na higienização das mãos a fim de prevenir o ressecamento da pele.

### **Procedimento:**

- Abrir a torneira e molhar as mãos, evitando se encostar na pia;
- Aplicar na palma da mão uma quantidade suficiente de sabão líquido para cobrir todas as superfícies das mãos.
- Ensaboar as palmas das mãos, friccionando-as entre si.
- Esfregar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa.
- Entrelaçar os dedos e friccionar os espaços interdigitais.
- Esfregar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos, com movimento de vai-e-vem e vice-versa.
- Esfregar o polegar direito com o auxílio da palma da mão esquerda, fazendo um movimento circular e vice-versa.
- Friccionar as polpas digitais e unhas da mão esquerda contra a palma da mão direita fechada em concha, fazendo um movimento circular e vice-versa.
- Esfregar o punho esquerdo, com o auxílio da palma da mão direita, utilizando movimento circular e vice-versa.
- Enxaguar as mãos, retirando os resíduos de sabão. Evitar contato direto das mãos ensaboadas com a torneira.
- Secar as mãos com papel-toalha descartável, iniciando pelas mãos e seguindo pelos punhos. Desprezar o papel-toalha na lixeira para resíduos comuns.

Figura 1b: Procedimento de higienização das mãos com álcool.



### Fricção antisséptica das mãos: álcool gel a 70%

Objetivo: reduzir a carga microbiana das mãos (não há remoção de sujidades). A utilização de gel alcoólico a 70% pode substituir a higienização com água e sabão quando as mãos não estiverem visivelmente sujas. Duração do procedimento: 20 a 30 segundos (Figura 1b).

#### **Importante:**

Para evitar ressecamento e dermatites, não higienize as mãos com água e sabão imediatamente antes ou depois de usar uma preparação alcoólica.

- Depois de higienizar as mãos com preparação alcoólica, deixe que elas sequem completamente (sem utilização de papel-toalha).

**Procedimento:**

- Aplicar na palma da mão uma quantidade suficiente de gel alcoólico a 70% para cobrir toda a superfície das mãos.
- Friccionar as palmas das mãos entre si.
- Friccionar a palma da mão direita contra o dorso da mão esquerda entrelaçando os dedos e vice-versa.
- Friccionar a palma das mãos entre si com os dedos entrelaçados.
- Friccionar o dorso dos dedos de uma mão com a palma da mão oposta, segurando os dedos e vice-versa.
- Friccionar o polegar esquerdo com o auxílio da palma da mão direita, fazendo um movimento circular e vice-versa.
- Friccionar as polpas digitais e unhas da mão direita contra a palma da mão esquerda, fazendo um movimento circular e vice-versa.
- Friccionar os punhos com movimentos circulares.
- Friccionar até secar. Não utilizar papel-toalha.

**Inferências e resultados:** o aluno deverá compreender a importância de uma boa conduta no laboratório.



## Órgãos e células do sistema imune

Nosso ambiente contém uma grande variedade de patógenos, os quais em contato com o hospedeiro podem causar doenças e até mesmo levar ao óbito. No entanto, observa-se que a maioria das infecções em indivíduos imunocompetentes têm uma curta duração, sem sequelas posteriores ao seu término. Isso ocorre graças ao sistema imune, que combate os patógenos.

Os patógenos podem penetrar no organismo por inúmeras vias, a saber, as vias respiratórias, oral, sexual e contato (pele). Desta forma, os tecidos e órgãos do sistema linfóide estão estrategicamente espalhados por todo o corpo, e as células do sistema imune estão presentes como células circulantes no sangue e na linfa, a fim de reconhecer e eliminar os patógenos do organismo pela geração de respostas imunes.

Todos os componentes do sangue, incluindo as células do sistema imune, originam-se de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea. Na presença de citocinas (mediadores solúveis da resposta imune) e alguns outros sinais de contato, as células hematopoiéticas pluripotentes da medula

óssea se diferenciam em células progenitoras mieloides e células progenitoras linfoides (Figura 1.1).

As células progenitoras mieloides se diferenciam nas seguintes subpopulações celulares:

- Megacariócito: células multinucleadas que se rompem originando as plaquetas (trombócitos), que são células presentes no processo de coagulação sanguínea.
- Eritroblastos/Eritrócitos: células de multiplicação rápida e na circulação sanguínea originam as hemácias.
- Mieloblastos: células que podem se diferenciar em neutrófilos, basófilos e eosinófilos.
- Monoblastos: células que dão origem na circulação sanguínea aos monócitos e nos tecidos aos macrófagos.
- Células dendríticas: são células especializadas na captura e apresentação de antígenos aos linfócitos, são consideradas a ponte entre a imunidade inata e adaptativa.

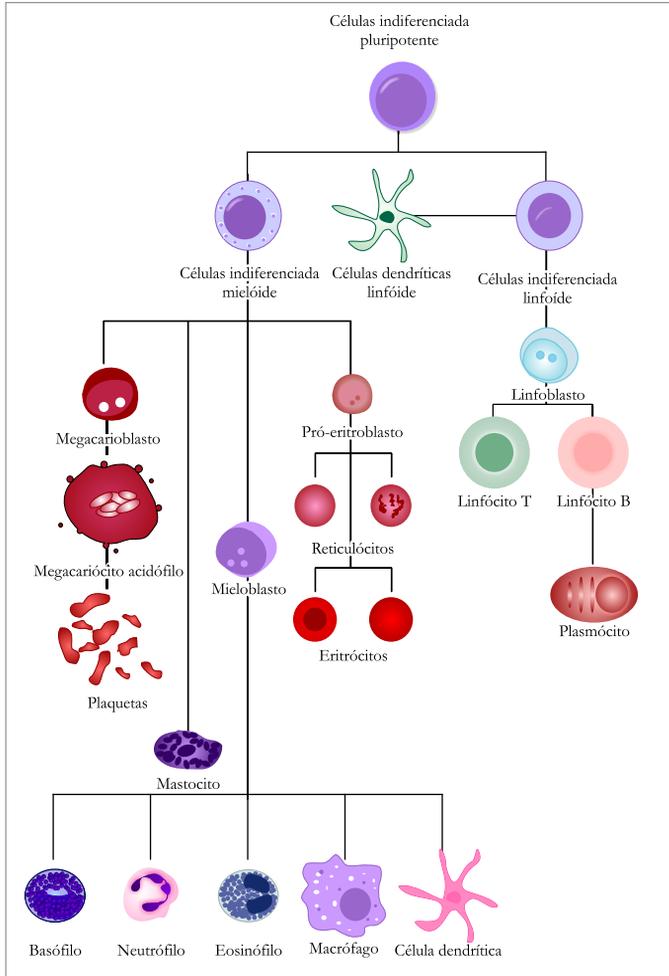
Em conjunto, os granulócitos, monócitos e células dendríticas são conhecidas como fagócitos (células capazes de realizar o processo de fagocitose).

As células progenitoras linfoides se diferenciam nas seguintes subpopulações celulares:

- Linfócitos T: são células formadas na medula óssea, mas seu processo de maturação acontece no timo. São as principais células efetoras na resposta imune celular.
- Linfócitos B: são células com origem e maturação na medula óssea e são responsáveis pela resposta imune humoral, quando já estão diferenciadas em plasmócitos, que são as células que produzem os anticorpos.
- Células *Natural Killer* (NK): têm origem na medula

óssea e são capazes de lisar células com baixa expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, podendo ser ativadas também por outros mecanismos.

Figura 1.1- Origem e diferenciação das células do sistema imune.

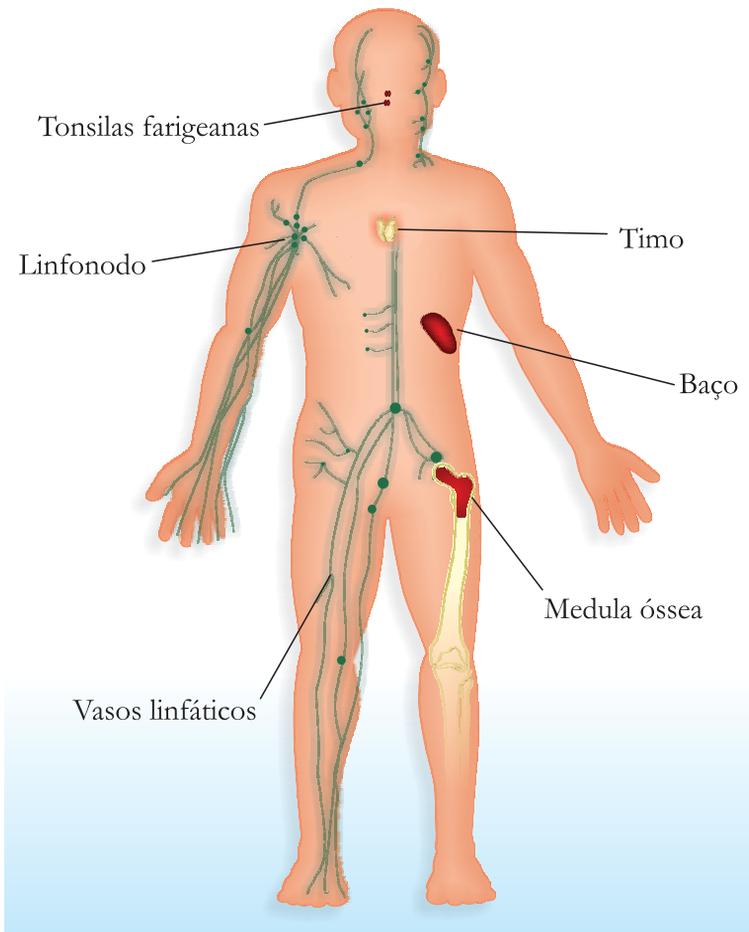


Fonte: Brígido, P.C

Os linfócitos T e B são células responsáveis pela imunidade adquirida, originados inicialmente na medula óssea. Entretanto, essas células ganham maturidade funcional em dois órgãos linfoides primários diferentes: os linfócitos T, no timo, e os linfócitos B, na medula óssea. Assim, o timo e a medula **óssea** são **órgãos linfoides primários**, ou seja, locais em que os linfócitos iniciam a expressão de seus receptores de antígeno específicos. Após deixar esses órgãos, os linfócitos circulantes no sangue migram para os **órgãos linfoides secundários**: linfonodos e baço, como ilustrado na Figura 1.2. Essas células podem deixar a circulação sanguínea por meio de vasos especializados, denominados veias endoteliais, migrando para os linfonodos. Nos linfonodos, os linfócitos ficam aglomerados (cada grama de linfonodo contém  $10^9$  linfócitos), sendo esses locais estratégicos para serem ativados especificamente por meio da apresentação de antígenos e colaboração de moléculas coestimulatórias. Os antígenos chegam aos linfonodos carregados por células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas (DC), macrófagos e linfócitos B.

As APC processam e apresentam os antígenos via MHC de classe I e/ou II para os linfócitos T, que por sua vez reconhecem os antígenos por meio de seu receptor de célula T (TCR), o qual resulta em uma cascata de sinais de transdução e produção de moléculas efetoras da resposta imune celular.

Figura 1.2 – Localização dos órgãos primários e secundários no corpo humano.



Fonte: Brígido, P.C.

Os órgãos linfóides primários são responsáveis pela origem das células do sistema imune, o timo é um órgão bilobulado situado no mediastino anterior. Cada lobo é dividido em múltiplos lóbulos por septos fibrosos e cada lóbulo

é constituído de um córtex externo e uma medula interna. O córtex contém uma densa quantidade de linfócitos T e a medula é composta por uma população mais esparsa desses linfócitos. O timo tem um rico suprimento vascular e vasos linfáticos eferentes que drenam os linfonodos mediastinais. Os linfócitos do timo (ou timócitos) são linfócitos T (LT) em vários estágios de diferenciação.

A *medula óssea* é um tecido “líquido” gelatinoso, que origina as células sanguíneas pelo processo de hematopoiese. Todas essas células se originam de um precursor pluripotente comum, chamado célula-tronco (*stem cell*) e se tornam gradualmente comprometidas a se diferenciarem em uma linhagem específica por meio do estímulo feito por citocinas.

Os **órgãos linfoides secundários** são órgãos responsáveis pela proliferação e maturação das células do sistema imune. O *baço* é um órgão localizado no quadrante superior esquerdo do abdômen humano. É suprido por uma artéria esplênica e por pequenas arteríolas, rodeadas por linfócitos denominados periarteriolas. O baço realiza várias funções não imunológicas, como a filtração do sangue e a conversão da hemoglobina em bilirrubina. As polpas branca e vermelha constituem os principais tipos de tecidos esplênicos. A polpa branca linfoide tem flóculos linfoides centrais, formados principalmente de linfócitos B. A polpa vermelha serve como um filtro para as hemácias danificadas ou envelhecidas e como um local de reserva para hematopoiese extramedular.

Os *linfonodos* são pequenos agregados nodulares de tecidos linfoides situados ao longo dos canais linfáticos do corpo. As mucosas dos tratos gastrointestinal e respiratório, bem como os tecidos conectivos e a maioria dos órgãos possuem drenagem linfática. Os antígenos que entram

no organismo são encaminhados aos vasos linfáticos e transportados aos linfonodos. Cada linfonodo é recoberto por uma cápsula fibrosa. Os linfonodos têm um córtex externo no qual encontramos agregados de células que constituem folículos, cujas áreas centrais são denominadas centros germinativos. É nesses centros que os linfócitos B (LB) são estimulados pelos antígenos, proliferam e originam a progênie de células produtoras de anticorpos (plasmócitos). Os LT estão localizados, predominantemente, entre os folículos e o córtex profundo, denominado área parafolicular.

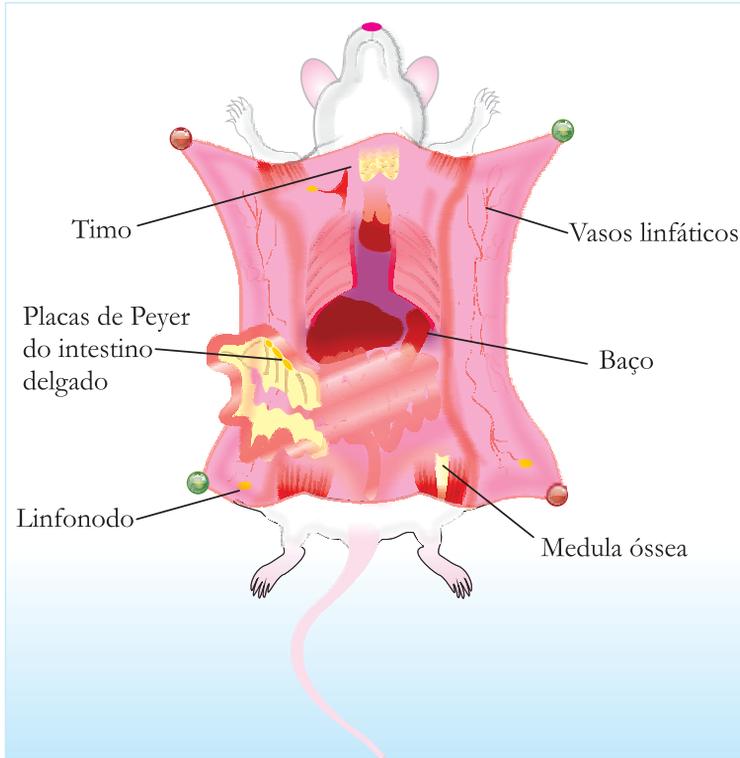
Além desses órgãos, temos os aglomerados de tecidos linfoides como:

O *tecido linfoide associado à mucosa (MALT)*: é um tecido formado por uma coleção de células linfáticas presentes na submucosa dos tratos gastrointestinal, respiratório, urinário, entre outros.

O *tecido linfoide associado ao intestino (GALT)*: é um tecido formado pelas placas de Peyer do intestino delgado e por folículos linfoides isolados e encontrados, predominantemente, na submucosa do cólon. As placas de Peyer consistem em um agregado de linfócitos com um folículo central de linfócitos B cercado por regiões de linfócitos T e macrófagos que atuam como APC.

O *tecido linfoide associado aos brônquios (BALT)*: é um tecido encontrado ao longo dos brônquios principais, em todos os lobos dos pulmões e está situado, predominantemente, nas bifurcações dos brônquios e bronquíolos.

Figura 1.3- Localização dos órgãos primários e secundários em modelo murino.



Fonte: Brígido, P.C

Objetivo da atividade prática: identificar, por meio de suas características morfológicas, as células do sistema imune presentes no sangue periférico humano e observar a distribuição dos órgãos linfoides primários e secundários em um modelo murinho (Figura 1.3).

Procedimento experimental: observar as células do sistema imune em lâminas previamente preparadas e os órgãos linfoides em camundongos eutanasiados e dissecados.

Inferências e resultados: o aluno deverá compreender a organização das células e órgãos do sistema imune.

Observação: procedimentos de experimentação animal devem ser aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da instituição de ensino antes da execução da aula prática.



## Separação de linfócitos do sangue periférico

O sangue é constituído por hemácias, leucócitos, plaquetas e representa, nos humanos, cerca de 7% do peso corporal. As hemácias são responsáveis pelo transporte de gases (oxigênio e gás carbônico) aos tecidos e os leucócitos pela defesa do organismo, ou seja, são células do sistema imune e as plaquetas são responsáveis pela coagulação sanguínea.

As células sanguíneas do sistema imune são: linfócitos (T, B, células NK) e APC (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B), sendo que os linfócitos são células envolvidas na resposta imune efetora.

O Ficoll-Hypaque consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros, hidrofílicos, de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. O nome Ficoll-Hypaque (FH) é uma marca registrada, atualmente de propriedade da GE Healthcare, Bio-Sciences. Os gradientes de FH são utilizados em laboratórios clínicos para separar os componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos etc.). Na presença do reagente FH, os elementos sanguíneos podem ser separados de

acordo com a densidade de cada componente celular. Após serem centrifugados, formam duas fases bem visíveis e a separação ocorre da seguinte maneira: na fase superior, o plasma e seus constituintes solúveis; na interface, os leucócitos mononucleares; em seguida o FH; e no fundo do tubo, sob a forma de um sedimento celular, os eritrócitos e granulócitos. Os linfócitos obtidos podem ser observados em suas características morfológicas e contados na câmara de Neubauer ao microscópio óptico.

A porcentagem de linfócitos, suas características morfológicas e funções estão diretamente relacionadas ao estado de saúde ou doença do indivíduo.

Objetivo da atividade prática: separar as células mononucleares de outras células sanguíneas com base em amostras do sangue periférico.

### **Procedimento experimental (Figura 2):**

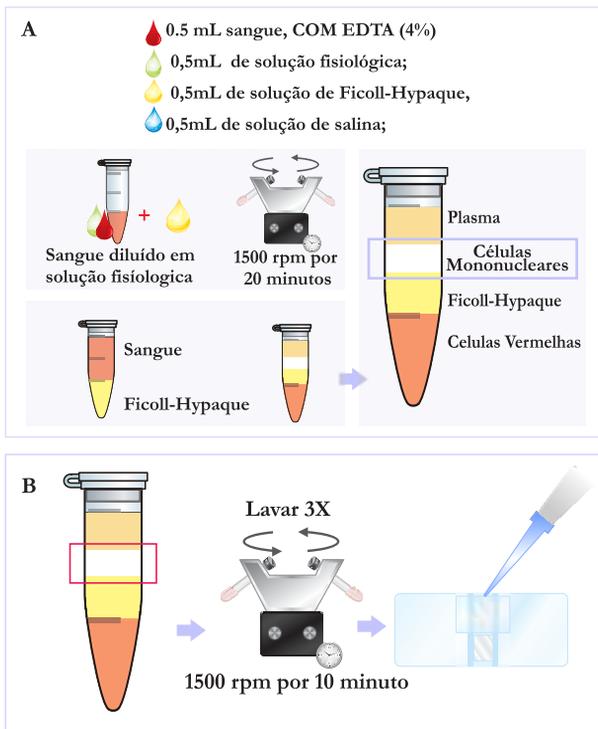
- Coletar 0,5mL de sangue periférico animal ou humano, utilizando EDTA (ácido etilendiaminotetracético) a 4% como anticoagulante.
- Diluir o sangue com 0,5mL de solução salina fisiológica (NaCl 0,9%).
- Depositar cuidadosamente pelas paredes do frasco, com pipeta Pasteur, 1mL de sangue diluído sobre 0,5mL de solução de FH.
- Centrifugar a solução final obtida a 1500rpm, por 20 minutos a temperatura entre 18°C/20°C.
- Retirar o tubo cuidadosamente da centrífuga e com uma pipeta Pasteur coletar a nuvem de linfócitos que se formou na interfase entre o plasma e o reagente de FH.
- Lavar as células recolhidas 3x para um volume final de 10mL de solução salina.

- Centrifugar a cada lavagem 1500rpm por 10 min.
- Ressuspender o *pellet* celular formado ao final em 0,5mL de solução salina.

Com a pipeta automática, colocar uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula e observar ao microscópio óptico ou preencher uma câmara de Neubauer e contar o número de células.

O procedimento para a contagem de células na câmara de Neubauer está descrito no Anexo 1.

Figura 2-Separação de linfócitos do sangue periférico por gradiente em *Ficoll-Hypaque*.



Fonte: Brígido, P.C



## Estimulação do Sistema Imunológico

Um *antígeno* é qualquer substância que pode ser especificamente reconhecida como não própria por uma molécula de anticorpo ou receptor de célula T. Anticorpos podem reconhecer como antígenos quase todos os tipos de moléculas biológicas, incluindo metabólitos intermediários, açúcares, lipídeos e hormônios, bem como macromoléculas, como proteínas, carboidratos complexos, fosfolipídios e ácidos nucleicos. Ao contrário, de uma maneira geral, os linfócitos reconhecem apenas os antígenos na forma de peptídeos e somente macromoléculas podem estimular linfócitos B. Os antígenos podem ser solúveis (ex: proteínas, carboidratos, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, entre outras moléculas), associados a membranas ou particulados (ex: células, bactérias, protozoários, vírus, helmintos, entre outras estruturas).

As moléculas antigênicas que estimulam respostas imunes são chamadas de *imunógenos*. Em contrapartida, moléculas com baixo peso molecular que se ligam aos componentes do sistema imune, mas não são capazes de estimular uma resposta imunológica, não são imunogênicas e são denominadas *haptenos*.

Os haptenos podem atuar como imunógenos desde que ligados a uma macromolécula biológica denominada carreador. Para ser considerada imunogênica uma molécula necessita de quatro características básicas:

- Ser estranha ao organismo (não própria).
- Ter alto peso molecular (> 600kDa).
- Ter complexidade química.
- Capacidade de sofrer degradação enzimática.

Outros fatores também influenciam a imunogenicidade de uma substância:

- Composição genética de um indivíduo.
- Repertório de células T e B.
- Dosagem e a via de administração do antígeno e o número de doses administradas.

Geralmente, as macromoléculas biológicas são maiores que a região de ligação aos receptores do sistema imune adaptativo, como o TCR e BCR e anticorpo. Em relação a esses últimos, todos os anticorpos se ligam apenas a uma porção da macromolécula antigênica, chamada de *determinante antigênico* ou *epítipo*.

As macromoléculas antigênicas contêm múltiplos determinantes antigênicos, alguns dos quais podem estar repetidos, e cada um deles pode se ligar a um anticorpo.

A presença de múltiplos determinantes idênticos em um antígeno é referida como *polivalência* ou *multivalência*.

Para potencializar uma resposta imune contra um determinado imunógeno, utilizamos diversos aditivos ou veículos denominados *adjuvantes* (do latim: *adjuvare*, “ajudar”). Um adjuvante é uma substância que aumenta a resposta imune contra um imunógeno quando adicionada a este. É importante salientar que um adjuvante não confere imunogenicidade a haptenos.

**Objetivo da atividade prática:** compreender como os antígenos estimulam o sistema imunológico e a importância de uma resposta imune eficaz para a proteção do organismo.

### **Procedimento experimental:**

#### **Imunização de animais para produção de anticorpos policlonais**

- Realizar sangria prévia nos animais: para camundongos, coletar cerca de 100 a 200 $\mu$ L de sangue por animal, sem anticoagulante, via plexo retro-orbital, centrifugar e armazenar o soro para utilizar em experimento futuro, como avaliação do controle do sucesso da imunização.
- Para imunização de camundongos, utilizar o antígeno na faixa de 5 a 50 $\mu$ g/mL de solução proteica.
- Preparar a emulsão com adjuvante completo de Freund (ACF) mais a solução proteica na mesma proporção de (1:1) com auxílio de uma seringa de vidro.
- Inocular a emulsão nos animais por via subcutânea (200 a 500 $\mu$ L) ou no coxim plantar (50 $\mu$ L). Para antígenos sem adjuvantes oleosos ou particulados, pode-se utilizar a via intraperitoneal ou endovenosa (200 a 500 $\mu$ L), representação esquemática Figura 3a.
- A cada 2 ou 4 semanas após a primeira imunização (1<sup>a</sup> dose), deve-se dar um reforço com a mesma dose (ou metade da dose), volume e via, utilizando adjuvante sem *Micobacterium sp*, ACF ou hidróxido de alumínio.
- Realizar sangrias de prova (Figura 3b) no período das imunizações (cerca de sete dias após o último reforço).
- Ao atingir um título considerável de anticorpos (32 a 64, ensaios por Imunodifusão ou ELISA), realizar a sangria final.

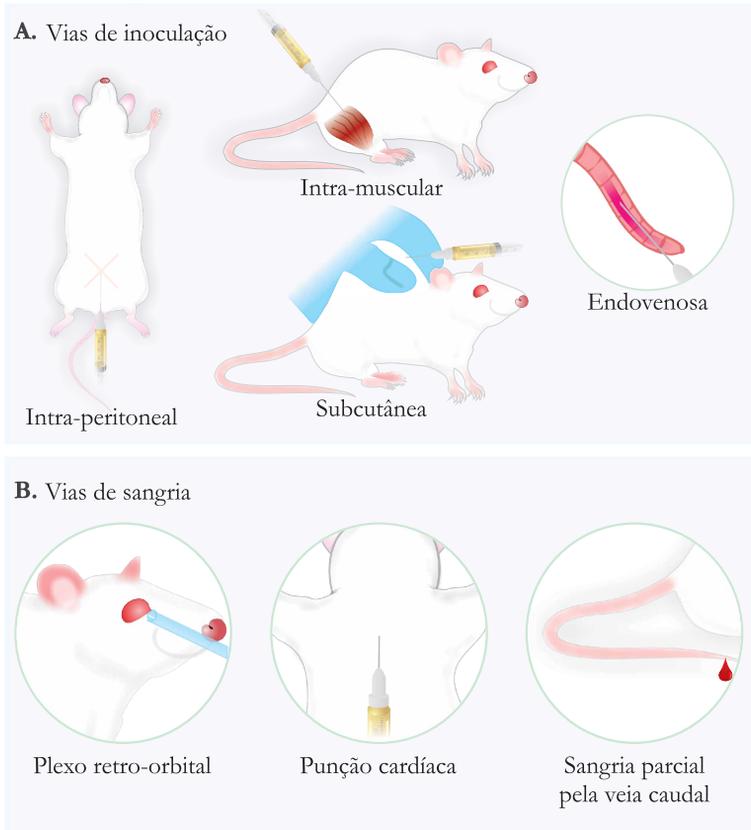
O quadro abaixo apresenta os principais adjuvantes em uso para vacinas humanas licenciadas e em testes experimentais.

### Relação de adjuvantes

Tipo de <b>adjuvante</b>	De uso rotineiro	<b>Experimental*</b> <b>ou tóxico</b> p/ animais/humanos#
<b>Sais inorgânicos</b>	Hidróxido de alumínio Fosfato de alumínio Fosfato de cálcio	Hidróxido de berílio
<b>Sistemas de liberação</b>		Lipossomos* ISCOMS* BCG Formulações de liberação lenta*
<b>Produtos bacterianos</b>	<i>Bordetella pertussis</i> (com toxoides diftéricos ou tetânicos)	<i>Mycobacterium bovis</i> e Óleo (adjuvante completo de Freund) Muramil-dipeptídeo (MPD)#
Citocinas	IL-1; IL-2; IL-12; IFN-g	

*Inferências e resultados:* o aluno deverá compreender como estimular o sistema imunológico, as diferentes vias de inoculação de antígenos, o uso dos adjuvantes e a produção de anticorpos policlonais.

Figura 3-a- Vias de inoculação de antígenos para imunização dos camundongos. b- via de coleta de sangue (sangria) em camundongos.



Fonte: Brígido, P.C



## Isolamento de Imunoglobulinas do Soro

O sangue é um tecido conjuntivo líquido circulante por um sistema de vasos fechados do sistema vascular em espécies com sistema circulatório fechado. O sangue é composto pelos elementos celulares (células e fragmentos celulares) e o plasma. O plasma humano é a parte líquida do sangue obtida após a sua centrifugação, o qual contém proteínas, eletrólitos, nutrientes, metabólitos e vitaminas. Sendo assim, as proteínas são os componentes mais expressos, como as proteínas carreadoras, anticorpos, enzimas, inibidores enzimáticos, fatores da coagulação e proteínas com outras funções. Diversas patologias clínicas agudas e crônicas são diagnosticadas na análise de exames laboratoriais das concentrações de proteínas séricas e as proporções das diferentes frações de proteína no plasma.

O isolamento de imunoglobulinas/anticorpos, totais ou específicas do soro de pacientes, é necessário para avaliação clínica. As imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM, IgE e IgD) diferem entre si em tamanho, cargas elétricas, composição de aminoácidos e no conteúdo de carboidratos.

O isolamento de imunoglobulinas de soro geralmente é realizado por fracionamento sequencial das proteínas, envolvendo:

- **Precipitação das gamaglobulinas** em sulfato de amônio saturado.

O fracionamento de proteínas por precipitação é utilizado como uma etapa preliminar da purificação, em razão do seu baixo custo e capacidade de processar grandes volumes/massas em um curto espaço de tempo. Já o método de separação por cromatografia é a técnica mais refinada para obtenção de uma biomolécula com alto grau de pureza, baseado na separação das moléculas de acordo com suas características físico-químicas, como peso molecular, carga elétrica e ligantes específicos (Figura 4).

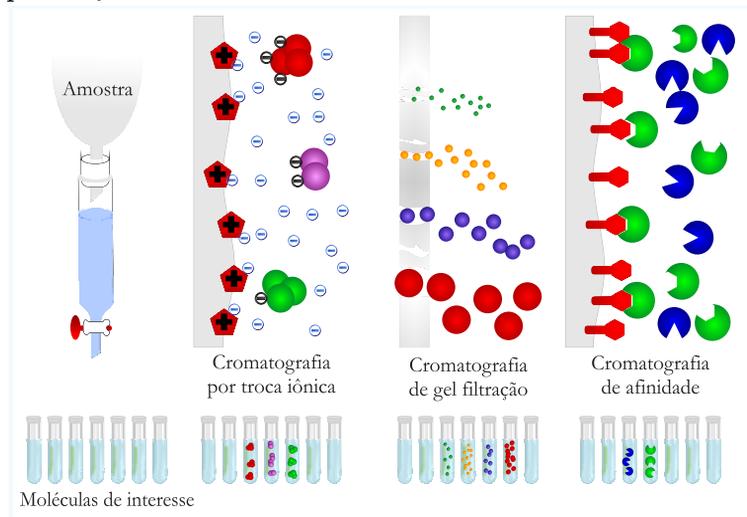
**Cromatografia por troca iônica:** são aquelas em que as resinas são carregadas com cargas positivas ou negativas. As com carga negativa repelem moléculas com carga positiva e vice-versa. A retirada das moléculas retidas na matriz é feita pelo aumento da força iônica do tampão (adição gradativa de sal ao tampão de equilíbrio) ou alteração do pH do tampão de equilíbrio.

**Cromatografia de gel filtração:** são resinas que separam moléculas de acordo com o tamanho. Moléculas de peso molecular menor entram pelos poros e passam mais vagarosamente pela coluna. Moléculas de peso molecular maior percorrem a resina paralelamente aos poros e saem primeiro.

**Cromatografia de afinidade:** a resina de afinidade contém moléculas de interesse específicas covalentemente ligadas a elas.

Nas amostras biológicas estão presentes moléculas com afinidade com essa molécula específica, as quais se ligam à matriz e posteriormente são eluídas por gradiente de sal ou alteração de pH. Por exemplo, a resina de proteína A tem como ligante a proteína A, que é um componente da parede celular de *Estafilococos*, a qual se liga às regiões Fc (Cg2 e Cg3-domínios constantes) da maioria das imunoglobulinas das subclasses de IgG.

Figura 4. Métodos de separação cromatográficos usados na purificação de biomoléculas.



Fonte: Brígido, P.C.

**Objetivo da atividade prática:** separar anticorpos presentes na fração gamaglobulínica das demais proteínas do soro.

**Material:**

- Soro de animal ou humano.
- Solução de sulfato de amônio a 80% de saturação a 4°C.
- Solução salina (NaCl 0,9%) a 4°C.

- Frascos, bastão, pipetas, gelo, agitador magnético, tubos de ensaio, centrífuga.

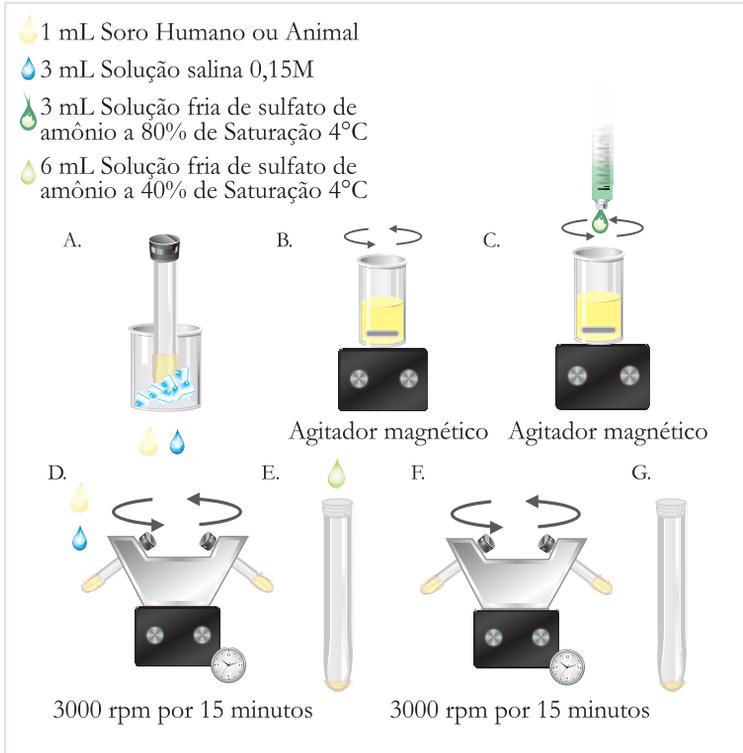
#### **Procedimento experimental (Figura 5):**

- Pipetar 1mL de soro (humano ou animal) com auxílio de micropipeta em um tubo de ensaio e colocá-lo no gelo.
- Completar o volume para 3,0mL com solução salina.
- Colocar a mistura no agitador magnético.
- Adicionar, gota a gota, sob agitação magnética, 3,0mL de solução fria de sulfato de amônio a 80% de saturação (4°C); centrifugar a mistura a 3.000 rpm por 15 minutos.
- Ressuspender o sedimento em 6,0mL de solução de sulfato de amônio a 40% de saturação (4°C).
- Centrifugar novamente até obter um sedimento livre de contaminantes. No *pellet* resultante está presente a fração contendo as imunoglobulinas.

**Comentários:** após a obtenção do sedimento, realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para análise da pureza da amostra obtida e proceder ao fracionamento cromatográfico para isolar a fração de interesse.

**Inferências e resultados:** ao final da aula prática, o aluno deverá ser capaz de explicar o processo de isolamento de imunoglobulinas no soro e a importância desse procedimento em estudos de casos clínicos.

Figura 5. Ilustração do procedimento de purificação de imunoglobulinas do soro.



Fonte: Brígido, P.C.



## Reações imunológicas no diagnóstico de patologias

As reações imunológicas baseadas na interação molecular entre antígeno e anticorpo nos ensaios imunes com reagentes não marcados detectam e quantificam as consequências da interação antígeno-anticorpo (precipitação, aglutinação e atividade hemolítica). Já os ensaios com reagentes marcados detectam e quantificam diretamente a interação antígeno-anticorpo por meio de marcadores fluorescentes, por exemplo, os ensaios de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), imunofluorescência, imuno-histoquímica, *slot-blot*, *Western blotting* e citometria de fluxo.

### **Ensaio imune baseado em reagentes não marcados Reações de aglutinação**

A reação de aglutinação se caracteriza pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e partículas insolúveis que contêm determinantes antigênicos em sua superfície.

A aglutinação pode ocorrer tanto com partículas que apresentam determinantes antigênicos naturais em sua superfície (hemácias, bactérias, protozoários etc.) como com as que apresentam partículas inertes (partículas de látex, poliestireno, bentonita etc.), ou mesmo com células antigenicamente não relacionadas (hemácias, bactérias) às quais se adsorvem ou se fixam antígenos solúveis.

A aglutinação ocorre porque os anticorpos são pelo menos bivalentes, ou seja, têm pelo menos dois sítios *Fab* de interação com o antígeno. Os dois sítios na imunoglobulina e os múltiplos sítios no antígeno resultam na malha antígeno-anticorpo.

As reações de aglutinação são muito empregadas no diagnóstico laboratorial de patologias causadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos, doenças autoimunes, na detecção de hormônios, na tipagem de grupos sanguíneos (sistemas ABO e Rh) etc. Os testes de aglutinação podem ser realizados em tubos ou placas e as reações de aglutinação podem ser direta ou indireta.

### **Teste de aglutinação ativa ou direta**

Na reação de aglutinação direta ativa se utilizam partículas antigênicas insolúveis em sua forma íntegra ou fragmentada, por exemplo, hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser anticorpos específicos realizados empregando-se diluições em série do anticorpo, anteuma quantidade constante de antígeno.

Após um período de incubação, a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso como o título do antissor, isto é, a máxima diluição em que ocorre a aglutinação.

## O sistema ABO

O sistema ABO foi descrito por Karl Landsteiner em 1901. Os grupos sanguíneos são baseados na ocorrência de antígenos naturais (isoaglutininas) contra os antígenos A e B (aglutinogênios) expressos na superfície das hemácias. São conhecidos diversos tipos de sistemas sanguíneos. O sistema ABO é o de maior importância na prática transfusional por ser o mais antigênico, ou seja, por ter maior capacidade de provocar a produção de anticorpos, seguido pelo sistema Rh.

Os genes do sistema ABO estão localizados no braço longo do cromossomo 9. Indivíduos do tipo A têm anticorpos contra antígenos do grupo sanguíneo B. Esses anticorpos que são capazes de aglutinar e lisar hemácias revestidas com antígenos B são chamados anticorpos anti-B. Os indivíduos do tipo B têm anticorpos contra antígenos do grupo sanguíneo A que são chamados anticorpos anti-A. Em indivíduos tipo AB ambos os antígenos A e B são expressos nas hemácias e os anticorpos anti-A e anti-B não estão presentes no soro. Os indivíduos do tipo O não expressam ambos os antígenos A e B nas hemácias e os anticorpos anti-A e anti-B estão presentes no soro (Figura 6).

**Objetivo da atividade prática:** determinar o tipo sanguíneo de cada amostra teste.

### Reagentes e Soluções:

- 1 gota de sangue para reagir com cada um dos anticorpos.
- Aglutininas: anticorpos:
- anti-A
- anti-B

### Procedimento experimental:

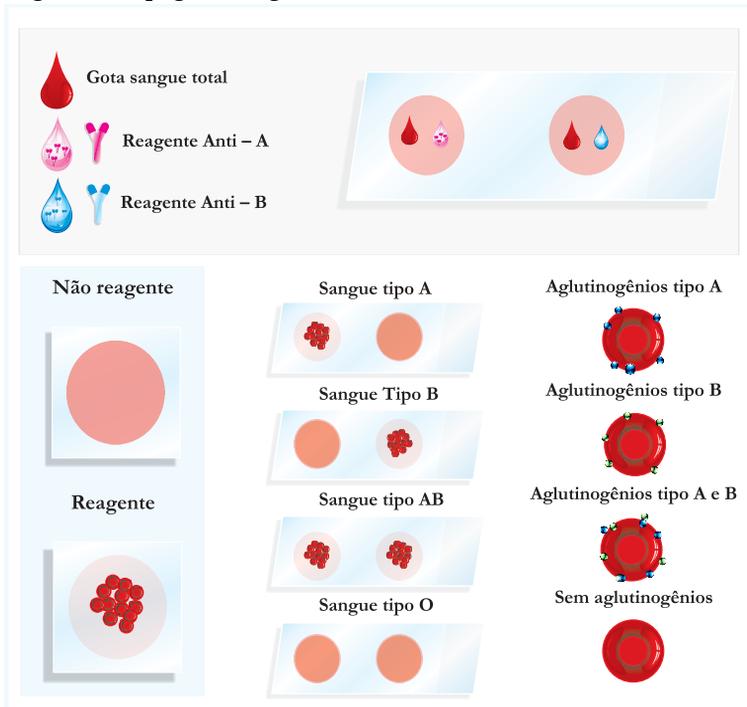
1. Colocar uma gota de sangue total em cada extremidade de uma lâmina de vidro.
2. Sobre uma delas, adicionar uma gota do reagente anti-A, e sobre a outra uma gota do reagente anti-B.
3. Homogeneizar cada reação com misturador diferente (ponteira), cuidando para não misturar uma a outra.
4. Observar a aglutinação após dois minutos.

Tipo sanguíneo	Antígeno ou Aglutinogênio	Anticorpo ou aglutinina	
		Anti-A	Anti-B
<b>A</b>	A	+	-
<b>B</b>	B	-	+
<b>AB</b>	AB	+	+
<b>O</b>	-	-	-

(+): presença da aglutinação (-): ausência da aglutinação

**Inferências e resultados:** o aluno deverá ser capaz de determinar o tipo sanguíneo de cada amostra de acordo com a figura 6 e compreender a importância da tipagem sanguínea para as transfusões sanguíneas.

Figura 6: Tipagem sanguínea: sistema ABO.



Fonte: Brígido, P.C

## Teste de aglutinação passiva ou indireta

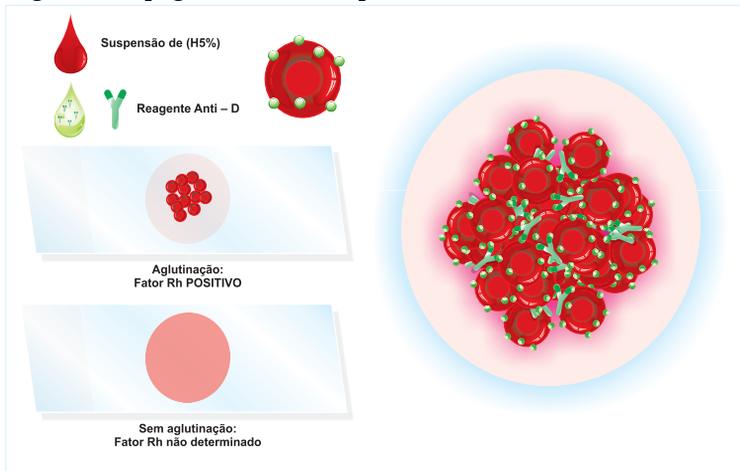
Para o teste de aglutinação passiva ou indireta, as hemácias e as partículas inertes (látex, bentonita, sepharose, leveduras etc.) podem ser sensibilizadas por adsorção passiva, em virtude do contato direto com os antígenos solúveis ou por adsorção via agentes químicos, como ácido tânico, cloreto de cromo e por conjugação do antígeno, por meio de ligações químicas covalentes, fornecendo reagentes estáveis. Em razão da grande diversidade de antígenos que podem se ligar às células ou partículas, a aplicação dos testes de aglutinação passiva é muito variada.

## Classificação Rh em tubos (Du)

### Tipagem em lâmina (Figura 7):

1. Colocar sobre uma lâmina de microscópio uma gota da suspensão de hemácias à 5% (H5%) em contato com uma gota do anticorpo anti-Rh (anti-D).
2. Se houver aglutinação: fator Rh positivo.
3. Se não houver aglutinação: fator Rh ainda não determinado.

Figura 7: Tipagem em lâmina para determinação do fator Rh.



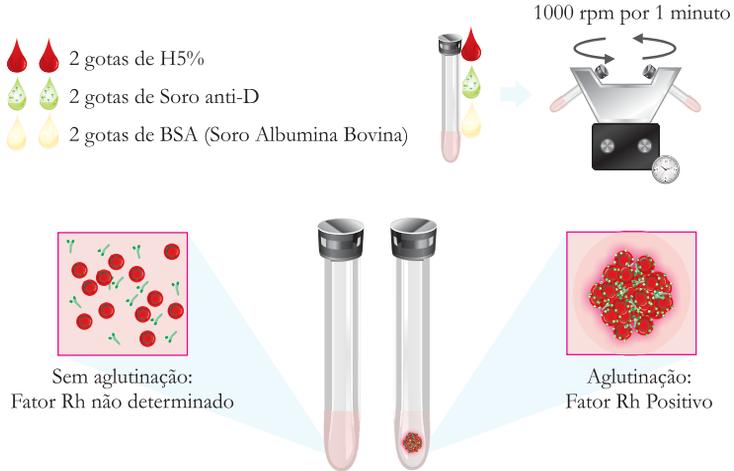
Fonte: Brígido, P.C

Passar então para:

4. Tipagem em tubos (Figura 8):
5. Em tubo de hemólise, colocar 2 gotas de soro anti-D + 2 gotas de (H5%) + 2 gotas de soro albumina bovina (BSA). Centrifugar à 1000rpm por 1 minuto. Agitar suavemente e observar a aglutinação. Neste ponto da

detecção, caso a aglutinação seja positiva, o Rh já está determinado (Rh positivo).

Figura 8: Tipagem em tubos para determinação de fator Rh.



Fonte: Brígido, P.C.

Caso contrário, prosseguir o ensaio:

#### Pesquisa do fator Du:

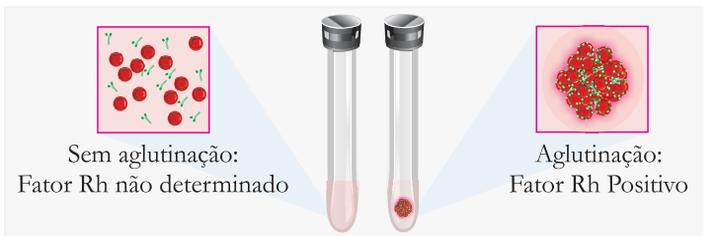
- Incubar o tubo a 37 °C por 15 minutos.
- Acrescentar 3mL de salina e centrifugar à 1000rpm por 1 minuto.
- Desprezar o sobrenadante e repetir este passo de lavagem com salina mais duas vezes; após a última lavagem, decantar a salina e adicionar 2 gotas de soro de Coombs (Soro Antiglobulina Humana - soro de coelho previamente imunizado com globulinas ou soro humano).
- Centrifugar a 1000rpm por 1 minuto.

- Agitar suavemente para observar a aglutinação.
- Resultado: presença de aglutinação-fator Rh positivo.

Figura 9: Pesquisa do fator Du para determinação do fator Rh.



Agitar suavemente e analisar



Fonte: Brígido, P.C.

## Reação de microaglutinação: diagnóstico VDRL

A sífilis é uma doença infecciosa sistêmica causada pela bactéria *Treponema pallidum*. A sífilis pode ser transmitida durante relações sexuais, por transfusões sanguíneas com sangue contaminado e/ou via transplacentária (mãe infectada para o bebê durante a gestação ou o parto).

Cerca de 7 a 20 dias após o contato inicial se apresentam os primeiros sintomas da doença. Os órgãos sexuais apresentam pequenas feridas e caroços nas virilhas (ínguas) indolores, ausentes de pus e coceira, cicatrizando mesmo sem tratamento e não deixam cicatrizes visíveis. No entanto, a pessoa continua com a patologia, que se desenvolve e, em estágio mais avançado, causa queda dos cabelos e manchas pelo corpo (inclusive mãos e pés).

Após algum tempo, que varia de pessoa para pessoa, as manchas também desaparecem, dando a ideia de melhora. A doença pode ficar estacionada por meses ou anos, até o momento em que surgem complicações graves como cegueira, paralisia, doença cerebral e problemas cardíacos, podendo, inclusive, levar à morte.

O diagnóstico da sífilis é baseado em avaliação clínica e testes sorológicos. O recurso diagnóstico mais frequentemente utilizado é o teste sorológico, visto que o paciente, na maioria das vezes, ao procurar o serviço de saúde já não se encontra mais na fase inicial da doença, que se caracteriza pelo surgimento da úlcera ou cancro. As provas sorológicas constituem o único meio de identificação para a forma latente da sífilis adquirida, nas quais não são observados quaisquer sinais ou sintomas clínicos que sugiram na presença da doença. Dois grupos de testes sorológicos são utilizados para o diagnóstico:

- Testes antigênicos não treponêmicos ou testes lipídicos:  
VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*);  
RPR (*Rapid Plasm Reagin*).
- Testes treponêmicos ou pesquisa de anticorpos verdadeiros:  
FTA-ABS (*Fluorescent Treponema Antigen Absorvent*);  
MHA-TP (*Micro hemagglutination for Treponema pallidum*);  
EIA/ELISA (*Enzyme immunoassay for antibody anti-Treponema*); PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

O treponema tem uma fração lipídica, comparável à cardiolipina (fosfolípido) em sua constituição antigênica. Os testes não treponêmicos ou lipídicos utilizam reações tendo por base a cardiolipina, na qual se detectam os anticorpos denominados reaginas.

Processos patológicos, como doenças autoimunes, determinadas infecções bacterianas e virais, algumas protozooses

e outras situações, como a gravidez, idade avançada e dependência química, também podem liberar antígenos lipídicos, os quais levam à produção de reaginas, traduzindo-se em resultados falsos positivos para sífilis, demonstrando assim a não especificidade das reações não treponêmicas.

Os testes treponêmicos utilizam antígenos de *T. pallidum* por meio de reações imunológicas de elevada sensibilidade e especificidade. São testes confirmatórios, úteis para exclusão de falsos positivos à sorologia não treponêmica. No entanto, por utilizarem procedimentos mais complexos, são testes de alto custo e, por consequência, não estão disponíveis como exames de rotina e são considerados inadequados para avaliação da resposta terapêutica.

A prova do VDRL é um dos testes não treponêmicos utilizados rotineiramente no imunodiagnóstico da sífilis. Em virtude do baixo custo e praticidade quanto à sua realização, ele é utilizado em larga escala na maioria dos laboratórios de unidades de atenção primária de saúde. Apresenta uma técnica rápida de microfloculação, na qual utiliza antígenos extraídos de tecidos como a cardiolipina, um fosfolípido derivado do coração de bovinos. A cardiolipina, quando combinada com lecitina (fosfolípido fosfatado) e colesterol, forma um antígeno sorologicamente ativo, capaz de detectar anticorpos humorais presentes no soro durante a infecção sífilítica, de uma a quatro semanas após o aparecimento do cancro primário.

As dosagens quantitativas do VDRL, expressas em títulos, em geral se elevam até o estágio secundário. A partir do primeiro ano da doença, os títulos tendem a diminuir, podendo a reatividade desaparecer mesmo sem tratamento. Com a infecção corretamente tratada, o VDRL tende a se negativar entre 9 e 12 meses, embora a reatividade em baixos títulos ( $\leq 1:8$ ) possa perdurar por vários anos ou até por toda a vida. Essa reatividade

residual se denomina “memória” sorológica. Dessa maneira, títulos baixos podem significar doença muito recente ou muito antiga, tratada ou não.

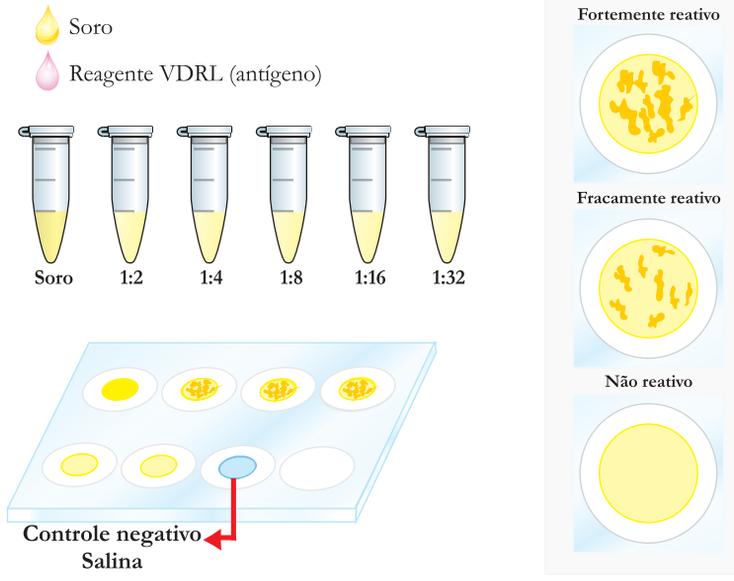
**Objetivo da atividade prática:** realizar o teste de diagnóstico para sífilis.

**Procedimento experimental:**

- Diluir o soro do paciente à 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 (diluições seriadas).
- Colocar uma gota de soro puro e uma gota de cada uma das diluições seriadas numa lâmina escavada e, a seguir, adicionar 1 gota do reagente de VDRL (antígeno),
- Misturar cada reação com um misturador diferente e com movimentos rotacionais por mais ou menos 4 minutos.
- Ler a reação a olho nu ou sob a luz de um microscópio óptico.
- Fazer um controle negativo com solução salina.
- Relatar o título do soro do paciente, que será determinado pela maior diluição onde ainda se observou floculação.

*Interpretação dos resultados:* consideramos o teste positivo quando encontramos partículas agrupadas em médios e grandes grumos. Muitas vezes, encontramos o fenômeno de *pró-zona*, em que grumos começam a aparecer somente a partir das diluições de 1:2 ou 1:4. Isso ocorre quando os títulos do soro são superiores a 1:32 e os anticorpos específicos em alta concentração no soro do paciente promovem a inibição da floculação.

Figura 10: reação de microaglutinação para o diagnóstico VDRL.



Fonte: Brígido, P.C.



## Imunoprecipitação

A precipitação é uma técnica usada para mensurar a presença e a concentração de antígeno-anticorpo. Essa técnica pode ser realizada em meio sólido (imunodifusão radial, imunoeletroforese) ou em meio líquido (turbidimetria e nefelometria).

A difusão de uma substância solúvel em um meio fluido é um processo pelo qual a substância é transportada de uma parte para outra, como resultado do movimento molecular ao acaso. A difusão pode ser efetuada em meio gelificado, o que impede a formação de correntes, por diferenças de temperatura. Se os poros do gel são consideravelmente maiores do que o tamanho das partículas, a difusão se realiza em meio fluido. Quando os imunoprecipitados (complexo antígeno-anticorpo) são formados no gel de ágar, o tamanho dos agregados fica maior do que o diâmetro dos poros e se evita a difusão dos complexos de antígeno-anticorpo.

A formação do precipitado depende de eletrólitos usados no tampão, do pH, da temperatura, do tempo de reação, da

pureza do ágar e, especialmente, das concentrações do antígeno e do anticorpo.

A precipitação máxima ocorre em áreas de equivalência, ou seja, concentrações semelhantes de antígeno e anticorpo, diminuindo em áreas de excesso de um dos componentes.

A imunodifusão é uma técnica que pode ser realizada por difusão simples ou dupla. Na imunodifusão simples, o antígeno ou o anticorpo incorporado ao meio sólido (ágar) e amostra teste se difunde, formando o complexo antígeno – anticorpo (imunocomplexo) até ocorrer sua precipitação. Já na imunodifusão dupla, tanto o antígeno como o anticorpo incorporado ao meio sólido se movem um em direção ao outro, até haver a precipitação do imunocomplexo. A imunodifusão em ambos os casos pode ser linear (unidimensional) ou radial (bidimensional).

### **Imunodifusão radial simples**

#### **Reação de Carbonari-Mancini:**

Esta técnica se baseia na difusão de um antígeno solúvel por meio de um gel ao qual já se encontra incorporada uma concentração conhecida de anticorpo específico. O ágar é misturado com a diluição apropriada do anticorpo específico para determinado antígeno e, em seguida, a mistura é colocada em placa de Petri ou lâmina de vidro. Em locais apropriados do gel são feitos orifícios, nos quais se pipetam volumes adequados das soluções de antígeno a serem testadas, bem como soluções-padrão com pelo menos três concentrações conhecidas do antígeno. A reação é incubada em câmara úmida de 48 a 72 horas para que ocorra a difusão. Após a incubação, a área do halo de precipitação formado é medida com auxílio de uma régua. Para uma dada concentração de anticorpo, a área do halo formado ao

término da difusão é diretamente proporcional à concentração do antígeno (Figura 11). A sensibilidade do teste pode variar com a concentração de anticorpos no soro. Uma concentração baixa de anticorpos aumenta a sensibilidade, mas não permite a medida de concentrações de antígeno em excesso. Por outro lado, uma alta concentração de anticorpos diminui a sensibilidade, mas permite a quantificação de concentrações maiores de antígeno.

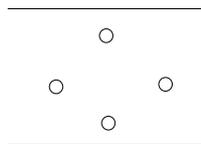
**Objetivo da atividade prática:** determinar e quantificar a concentração de antígeno e anticorpo por meio da imunodifusão de imunocomplexos.

**Reagentes e Soluções:**

- Solução de ágar 1%:
- 1g de ágar em 100mL de H<sub>2</sub>O destilada.
- Aquecer a solução de ágar no micro-ondas até sua completa fusão (coloração transparente).
- Resfriar até aproximadamente 55°C antes da adição do anticorpo.

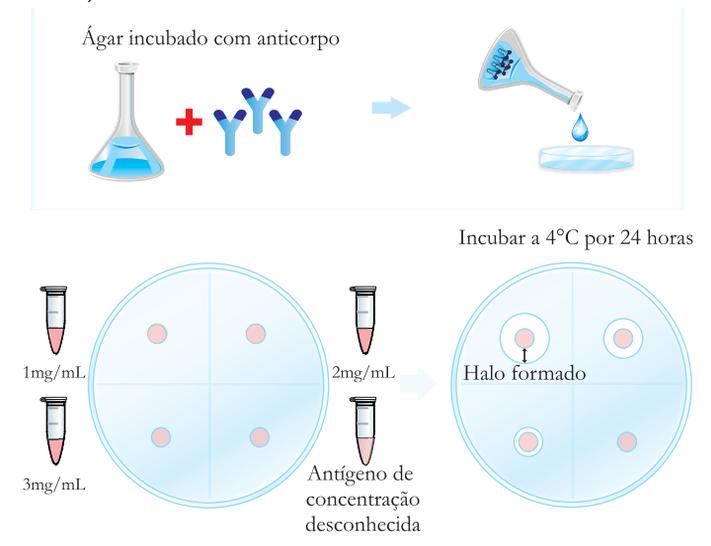
**Procedimento Experimental:**

- Incorporar a uma solução de ágar a 1% o anticorpo antiantígeno preestabelecido.
- Distribuir a solução sobre uma placa de acrílico dividida em quatro quadrantes.
- Após a solidificação do ágar, fazer um orifício no centro de cada quadrante com o auxílio de um molde (em anexo).



- Preencher esses orifícios com o antígeno, sendo que três deles serão ocupados com concentrações definidas que servirão como referência para a curva-padrão (Ex: padrões de 1mg/mL, 2mg/mL e 3mg/mL). No 4º orifício colocar o antígeno de concentração desconhecida.
- Cobrir a placa e incubar a 4°C por 24 horas.
- Efetuar a leitura observando a formação dos halos de precipitação (Figura 11).
- O diâmetro de cada halo com o auxílio de uma régua.
- Em papel milimetrado, construa a curva-padrão colocando nas ordenadas o diâmetro elevado ao quadrado e nas abscissas a concentração dos padrões.
- A concentração do antígeno desconhecido será definida pela medida do seu diâmetro e projeção no gráfico.

Figura 11: Imunodifusão Radial Simples (Reação de Carbonari-Mancini).



Fonte: Brígido, P.C.

## Imunodifusão Radial Dupla

### Reação de Ouchterlony:

Essa técnica se baseia na precipitação que ocorre na região de equivalência quando o antígeno e o anticorpo se difundem no ágar. O complexo antígeno-anticorpo se apresenta sob a forma de linha ou arco de precipitação. O teste é realizado colocando-se uma camada de ágar em lâminas de vidro ou placas de Petri previamente recobertas com uma fina camada de ágar. Após a solidificação, são feitos orifícios no ágar, de acordo com o sistema a ser analisado. As soluções contendo o antígeno e o anticorpo são pipetadas nos orifícios do ágar, as placas ou lâminas são incubadas em câmara úmida de 18 a 24 horas. Cada linha em um espectro de precipitação corresponde a um complexo antígeno-anticorpo. A ausência do antígeno ou do anticorpo é indicada pela ausência da linha. Cada precipitado funciona como uma barreira para os reagentes que o formam e impede sua difusão além do sítio da precipitação. Essa barreira é imuno específica e a difusão de outros reagentes não é impedida, a menos que a densidade dos agregados provoque um obstáculo mecânico.

O método de Ouchterlony permite a comparação de vários sistemas antigênicos, desde que colocados em orifícios adjacentes contra um mesmo sistema de anticorpos, formando vários padrões que indicam a existência, ou não, de determinantes antigênicos comuns. As linhas formadas podem ser completamente coalescentes, no caso de antígenos com os mesmos determinantes (identidade total); podem apresentar um “esporão”, como no caso de antígenos parcialmente relacionados (identidade parcial); ou podem formar uma interseção, indicando a ausência de relação entre os antígenos (não identidade); (Figura 12). Quando os reagentes estão em quantidades equimolares, a

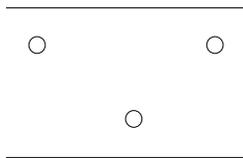
linha de precipitação formada terá a curvatura voltada para o orifício que contém a substância de maior peso molecular, que se difunde mais lentamente.

Esta técnica pode ser utilizada para avaliações semiquantitativas, quando se conhece a especificidade das linhas de precipitação, por exemplo, na titulação de antígenos ou de anticorpos. Podem-se caracterizar antígenos de vários agentes infecciosos empregando-se anticorpos de especificidade e reatividade conhecidas. A formação de uma única linha de precipitação indica a pureza do antígeno ou do anticorpo, porém de um modo não muito preciso.

O método apresenta algumas limitações, como baixa sensibilidade quando comparado a outras técnicas baseadas na reação antígeno-anticorpo, o tempo de incubação para que a reação se processe, não sendo útil em casos em que se necessita de um método rápido de diagnóstico.

**Procedimento experimental:**

1. Colocar 4mL de uma solução a 1% de ágar sobre duas lâminas de vidro.
2. Esperar a solidificação da solução de ágar a temperatura ambiente.
3. Com o auxílio de um molde, fazer três orifícios como mostra a figura:



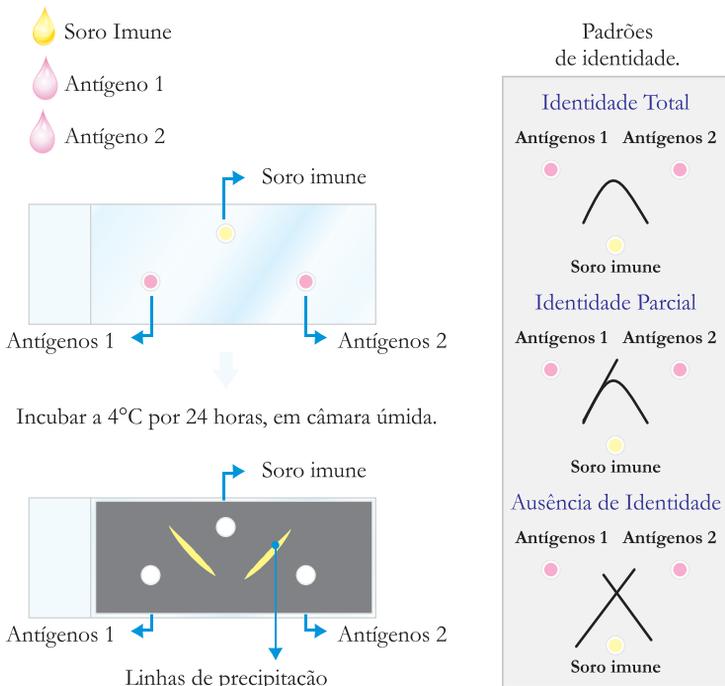
- Nos dois orifícios superiores, aplica-se os antígenos 1 e 2, respectivamente. No orifício inferior, colocar o soro imune a ser testado.

- Incubar a reação 4°C por 24 horas, em câmara úmida.
- Observar a formação de linhas de precipitação.

1. Determinar o padrão de identidade dessa reação de acordo com o esquema da figura 12.1.

**Comentários:** após a determinação da identidade imunológica entre antígeno e anticorpo testados, realizar a titulação do soro para uma melhor caracterização da reação de imunoprecipitação.

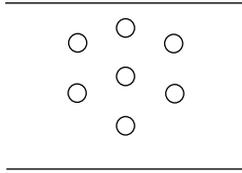
Figura 12.1: Determinação de identidade entre antígeno e anticorpo pelo método de Imunodifusão Radial dupla (Reação de Reação de Outcherlony).



Fonte: Brígido, P.C.

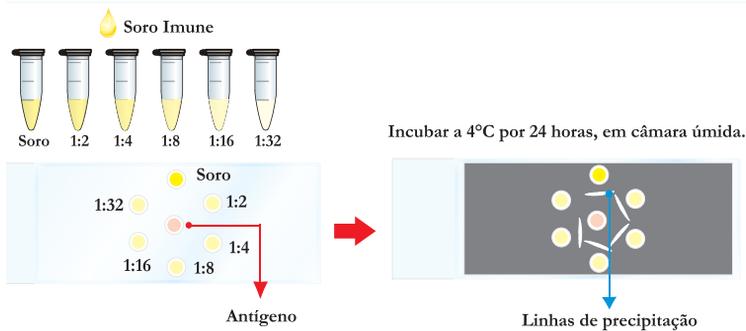
## Titulação do soro:

a. Com o auxílio de um molde, fazer orifícios.



- Diluir o soro nas proporções: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32.
- Aplicar as diluições em cada um dos orifícios, sendo que no último deve-se colocar o soro puro.
- Preencher o orifício central com o antígeno.
- Incubar a 4°C por 24 horas em câmara úmida.
- Observar as linhas de precipitação.
- O título de anticorpos no soro corresponde a maior diluição onde ocorreu precipitação.

Figura 12.2: Titulação da reação entre antígeno e anticorpo pelo método de Imunodifusão Radial dupla (Reação de Reação de Outcherlony).



Fonte: Brígido, P.C.

## Imuno-hemólise

O complemento foi descoberto por Jules Bordet e descrito no soro de animais imunizados como um fator termolábil responsável pela lise de bactérias e eritrócitos. Esse fator foi denominado “alexina” e, posteriormente, “complemento”, por complementar a ação dos anticorpos.

A primeira função atribuída ao complemento foi a sua capacidade de lisar microrganismos e células. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que o complemento é um sistema com múltiplos componentes, complexo e altamente evoluído que, além de proteger o organismo contra patógenos invasores, também contribui para a regulação de outros sistemas de defesa do hospedeiro, principalmente aqueles relacionados à imunidade adaptativa.

O sistema complemento participa dos principais mecanismos efetores da resposta imune humoral. Esse sistema é constituído por proteínas séricas e de membrana, que interagem de maneira altamente regulada para gerar como produtos proteínas biologicamente ativas. Essas proteínas participam em diferentes funções efetoras envolvidas com a

eliminação de antígeno, tais como: lise osmótica de células estranhas; quimiotaxia; liberação de mediadores inflamatórios; fagocitose e proliferação celular.

Na organização e funcionamento do sistema complemento também se incluem múltiplos receptores na superfície de diferentes células, os quais têm especificidade para os produtos ativos do complemento, bem como proteínas de membrana reguladoras, as quais impedem a ativação autóloga do complemento, protegendo as células do hospedeiro.

A maioria das proteínas do complemento se encontra na forma inativada na circulação ou em baixos níveis de ativação espontânea. A ativação desse sistema ocorre de maneira sequencial, pela clivagem proteolítica dos componentes por enzimas do sistema, ativadas previamente.

O sistema complemento pode ser ativado por três vias distintas: via clássica, via alternativa e via das lectinas. A ativação dessas vias converge para a clivagem de C3, componente central do sistema complemento. As reações subsequentes são comuns para as três vias e terminam com a formação do “complexo de ataque à membrana” (MAC).

O esquema a seguir demonstra como são desencadeadas as três diferentes cascatas enzimáticas do sistema complemento, as quais são denominadas vias de ativação deste sistema. Estas três vias dependem de um único substrato enzimático que é o componente C3, que é clivado em C3a e C3b, sendo este último componente o responsável por desencadear a ativação dos componentes terminais destas cascatas enzimáticas, formando finalmente o MAC (Complexo de Ataque à Membrana), que envolve a participação dos componentes de C5 a C9.

Figura 12: Ativação do complemento.



Legenda:  
 MBL=Proteína Ligadora de Manose  
 MASP= Serina Protease Associada a MBL

Fonte: Brígido, P.C.

**Objetivo da atividade prática:** observar uma das atividades biológicas do sistema complemento: lise celular.

**Material:**

**Reagentes e soluções:**

- Solução salina: NaCl (cloreto de sódio) 0,9%.
- Hemácias de carneiro.
- Hemolisina: soro de coelho imunizado com hemácias de carneiro e inativado a 56°C durante 30 minutos.
- Sistema hemolítico: consiste na reação do antígeno (hemácias de carneiro) com o anticorpo (hemolisina) anti-hemácias de carneiro produzido em coelho.
- Soro de carneiro (sistema complemento).

**Preparo das soluções:**

- Preparo da solução salina: usar 0,9 de NaCl em 100mL de H<sub>2</sub>O.
- Preparo da hemolisina: diluição da hemolisina: 100mL em 12mL de solução salina.
- Preparo das hemácias de carneiro:
- Lavar a suspensão de hemácias 3 vezes com salina, em seguida ressuspender 500mL da “papa” de hemácia em 12mL de salina.
- Preparo do sistema hemolítico:
- Misturar a suspensão de hemácias e a hemolisina v/v (12mL com 12 mL).
- Manter a mistura em banho-maria a 37°C (15 minutos).

**Procedimento experimental (Figura 13):**

Numerar os tubos de ensaio de 1 a 7.

Em seguida pipetar os reagentes de acordo com o esquema abaixo:

Tubos	Soro (μL)	Solução salina (μL)	Sistema hemolítico (μL)	Reação positiva
1	500	-	500	
2	400	100	500	
3	300	200	500	
4	200	300	500	
5	100	400	500	
6	50	450	500	
7	-	500	500	

- Incubar em banho-maria a 37°C por 15 minutos.
- Centrifugar a 1.500 rpm por 1 minuto.
- Observação e relato dos resultados:

Relatar em quais tubos da reação ocorreu à hemólise das hemácias. Em seguida, calcular a porcentagem de atividade hemolítica de acordo com a equação abaixo:

$$AH = 100 \times (1 - VS/VT)$$

Onde:

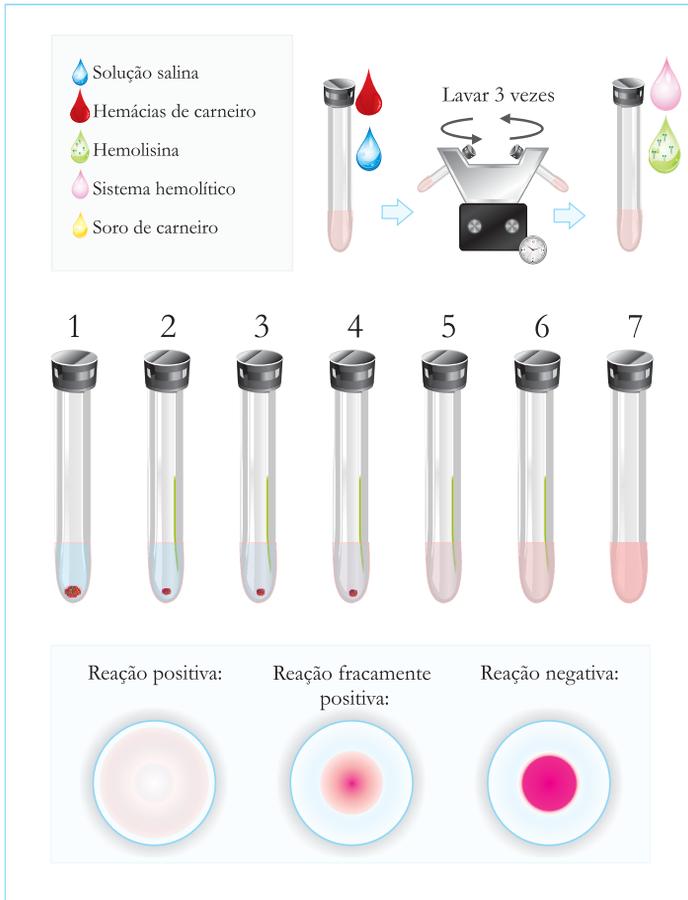
VS: volume de soro no tubo com hemólise parcial;

VT: volume de soro + salina (500 mL).

**Inferências e resultados:** os valores normais- 90 a 96% de atividade (tubo 6 ao 8) com hemólise total ou parcial.

A ausência de hemólise em humanos pode ocorrer em virtude de alguma deficiência em componentes do sistema complemento, portanto o teste de hemólise mediada pelo sistema complemento é usado no diagnóstico para imunodeficiências e quadros patológicos (Figura 13).

Figura 13: Reação de imuno-hemólise mediada pelo sistema complemento.



Fonte: Brígido, P.C.

# 10

## Fagocitose

O sistema fagocítico mononuclear (SFM) representa a segunda maior população celular do sistema imune, cuja função principal é a fagocitose. Todas as células do SFM se originam na medula óssea e após maturação e/ou ativação podem apresentar morfologia variada. Os monócitos representam o primeiro tipo celular, estão incompletamente diferenciados ao deixarem a medula óssea e permanecem na circulação por longos períodos. Após penetrar nos tecidos, os monócitos se diferenciam em macrófagos teciduais, que podem ser encontrados no tecido conjuntivo subepitelial, no interstício dos órgãos parenquimatosos, nos linfonodos, revestindo os sinusoides vasculares do fígado (células de Kupffer) e do baço.

No sistema nervoso central os fagócitos são denominados micróglia, nos ossos os fagócitos multinucleados são denominados osteoclastos, e nos pulmões, macrófagos alveolares. Então, esses fagócitos estão estrategicamente localizados nos principais sítios de entrada de micro-organismos no hospedeiro.

Os fagócitos mononucleares apresentam um papel central na imunidade inata e adaptativa e são células efetoras importantes na eliminação de micro-organismos. Essas células possuem receptores na sua superfície que se ligam a micro-organismos: os receptores de reconhecimento padrão (PAMP) que medeiam sua internalização, como os receptores para manose, que são lectinas na superfície dos macrófagos que se ligam a resíduos terminais manose/fucose de glicoproteínas e glicolipídeos, que são açúcares típicos da parede celular de micro-organismos, sendo que glicoproteínas e glicolipídeos de mamíferos contêm ácido siálico ou N-acetilgalactosamina terminal. Portanto, receptores dos macrófagos reconhecem células não próprias (estranhas) ao organismo hospedeiro. Os receptores para opsoninas promovem a fagocitose de células revestidas por vários tipos de proteínas (opsoninas), ou seja, moléculas como anticorpos principalmente da classe IgG; componentes do sistema complemento (C3) e lectinas.

A fagocitose é um processo de englobamento de partículas grandes (0,5  $\mu$ m) dependente do citoesqueleto celular. Após a ligação do receptor de membrana do fagócito com o micro-organismo (bactérias, partículas virais), a membrana emite projeções que envolvem a partícula, formando uma vesícula membranosas – o fagossoma, no interior do fagócito. Essa vesícula irá se fundir com lisossomas, formando o fagolisossoma, onde ocorre a degradação do material contido dentro das vesículas por meio das enzimas lisossômicas ou de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO).

Além da fagocitose, os macrófagos ativados produzem citocinas, por exemplo, TNF, IL-1, IL-12 e quimiocinas que induzem a resposta inflamatória.

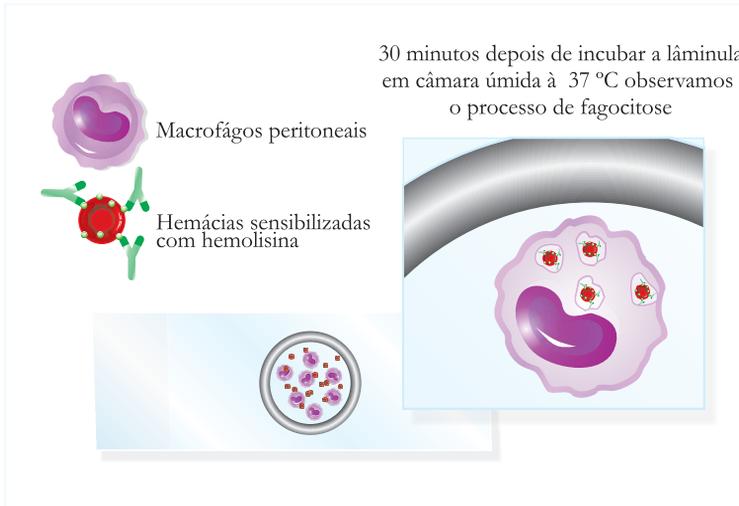
*Objetivo da atividade prática:* demonstrar o processo de fagocitose em macrófagos mediada por anticorpos.

**Procedimento experimental (Figura 14):**

- Sacrificar os animais por deslocamento vertical. Após o sacrifício, fazer uma incisão longitudinal na região abdominal, rebatendo a pele para exposição do peritônio.
- Injetar 2mL de solução tioglicolato 3% por via peritoneal, massagear durante 30 segundos.
- Coletar intraperitonealmente, com o auxílio de seringa, o líquido rico em macrófagos após 72h de inoculação.
- Colocar 0,1mL dessa solução no interior de cada anel, aderido à lâmina de microscopia. Acrescentar de 2 a 3 gotas de suspensão EA (hemácias sensibilizadas com hemolisina).
- Recobrir com lamínula e incubar a 37°C durante 30 minutos, em câmara úmida.
- Deslocar o anel, mergulhar a lâmina durante 1 minuto em solução salina para retirar EA não fagocitado.
- Colocar 1 gota de corante (azul de toluidina a 0,1%) e recobrir com lamínula. Examinar ao microscópio.

Obs.: hemolisina (anticorpos anti-hemácias).

Figura 14: Fagocitose mediada por macrófagos.



Fonte: Brígido, P.C

## Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa encontrada em pequenas quantidades no ar atmosférico, tóxica em virtude da presença de radical livre (elétron desemparelhado), espécies químicas altamente reativas. O NO diluído sofre oxidação de nitrito a nitrato, sendo sua meia vida menor do que 10 segundos. O NO se liga à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme, levando ao término de sua atividade biológica.

A biossíntese do óxido nítrico (NO) no organismo ocorre via oxidação de L-arginina, catalisada pela enzima NO sintetase (NOS) na presença de nicotinamida adeninadineucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH) como um doador de elétron e  $\text{Ca}^{2+}$  como um cofator, sendo o produto final L-citrulina e NO.

As funções de NO são complexas e até mesmo antagonísticas, e podem ser benéficas ou malélicas dependendo da concentração. O NO é um mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular desencadeado por NO, em geral, é realizado por meio de receptores transmembranosos presentes na superfície da membrana na célula-alvo, desencadeando

uma “cascata” de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula.

Pelas suas características químicas de alta difusibilidade, a sinalização do NO é exercida diretamente em nível intracelular, sem receptores transmembranosos. Em razão da sua penetração intracelular sem intermediários membranosos, o organismo utiliza o NO em funções fisiológicas em que é necessária uma resposta rápida.

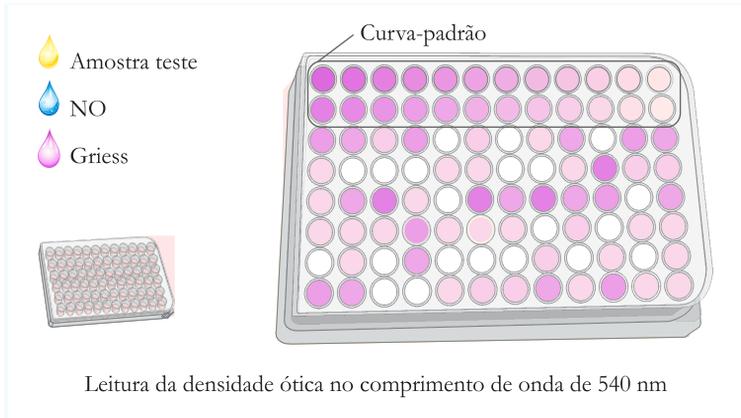
O NO também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrada sua ação antibacteriana, antiparasitária e antiviral. Nesses casos, o NO atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos micro-organismos invasores.

**Objetivo da atividade prática:** determinar a presença de NO em sobrenadante de meio de cultura de esplenócitos (48 horas de cultivo em estufa de CO<sub>2</sub>), os quais foram estimulados com as citocinas IFN-g ou IL-4.

**Procedimento experimental (Figura 15):**

- Utilizar placas de plástico rígido de 96 poços.
- Adicionar amostras testes não diluídas e as diluições da curva-padrão a um volume de 50µL por poço.
- A curva-padrão de NO é feita com uma concentração inicial de 200µM/mL e em 11 diluições seriadas subsequentes com fator de diluição 2, até a concentração final de 0,195µM/mL.
- Incubar as amostras testes e a curva-padrão em temperatura ambiente por 10 minutos com o reagente de Griess.
- Proceder a leitura da reação calorimétrica em um leitor de microplacas com filtro de 540nm.

Figura 15: Dosagem de NO (óxido nítrico) para determinação de estresse oxidativo.



Fonte: Brígido, P.C



## Teste cutâneo de puntura (*Prick Test*)

As alergias são doenças inflamatórias crônicas, heterogêneas, que afetam a qualidade de vida de milhares de crianças e adultos. Segundo a Organização Mundial de Alergia, as doenças alérgicas afetam de 30 a 40% da população mundial, e a prevalência dessas doenças está aumentando em proporções epidêmicas. Entre as crianças de países desenvolvidos, o percentual fica em torno de 40% e essas continuarão alérgicas durante a vida adulta, com sintomas de asma e rinite alérgicas, por exemplo.

As doenças alérgicas são caracterizadas por manifestações clínicas diversas desencadeadas pelo contato com substâncias estimulantes, os alérgenos, que para maioria das pessoas é tolerável, pois apresenta efeito inócuo. Essas manifestações clínicas são chamadas de hipersensibilidade do Tipo I ou Imediata e a alergia, uma dessas manifestações, é marcada pela presença de mecanismos imunológicos mediados por células e por anticorpos, como a IgE.

O diagnóstico de alergia deve ser feito por meio de uma minuciosa anamnese, acompanhada da determinação da IgE

total e do teste cutâneo de leitura imediata (*prick test*). A IgE total geralmente é solicitada para avaliação de condições alérgicas, pois níveis séricos de IgE total elevados são observados na maioria dos casos de dermatite/eczema atópico e/ou asma alérgica e, mais raramente, nas rinites alérgicas. É importante considerar que, por si só, a IgE total elevada não é sinônimo de doença alérgica. Em algumas situações, quando o alérgeno é conhecido, a determinação de IgE específica complementa o diagnóstico. Entretanto, o teste cutâneo de leitura imediata (*prick test*) é considerado o principal método para confirmação de sensibilização alérgica mediada por IgE. É pouco invasivo e tem boa reprodutibilidade, além disso, o teste permite que os pacientes visualizem na pele a resposta inflamatória alérgica que lhes acomete olhos, nariz, brônquios e trato gastrointestinal, o que torna o procedimento educativo.

A resposta positiva aos alérgenos colocados na pele é dada pelo aparecimento de pápulas e eritemas iguais ou maiores que 3mm de diâmetro acompanhadas de prurido. O teste negativo não quer dizer que a substância testada não seja o agente etiológico primário da manifestação em estudo e isso porque nem sempre há imunoglobulinas fixadas na derme, mas somente nos chamados “órgãos de choque”. Para alérgenos alimentares, uma resposta positiva não indica necessariamente que o alimento será a causa de uma reação alérgica quando ingerido, mas apenas que a pele reage ao alimento. O teste pode, entretanto, auxiliar na determinação de possíveis alérgenos.

Alguns medicamentos como anti-histamínicos e antidepressivos interferem nos resultados do teste alérgico, portanto, antes dos testes, recomenda-se a interrupção do uso de medicamentos por pelo menos 15 dias.

Alguns alérgenos não podem ser testados por *prick test*, devendo o teste ser feito *in vitro*, por exemplo, pessoas com

extrema hipersensibilidade não devem realizar o teste em virtude do risco de anafilaxia. A dermatite severa ou eczema também podem tornar o teste cutâneo intolerável.

O teste tem bateria padrão mínima com aeroalérgenos (que comumente causam alergias nos brasileiros) e alguns alimentos. Fazem parte da bateria os seguintes alérgenos: *Dermatophagoides pteronissinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*

(presentes na poeira doméstica), fungos do ar, epitélios de animais (cão e gato), alimentos como leite, ovo (crianças principalmente) e, em casos especiais, alguns pólenes.

### **Objetivo da atividade prática:**

observar uma reação de hipersensibilidade tipo I ou imediata na pele.

### **Material:**

- Algodão e álcool 96°.
- Lanceta.
- Caneta dermatográfica ou qualquer outra para marcação da pele.
- Extratos antigênicos.
- Controle negativo: NaCl 0,9%.
- Controle positivo: histamina.
- Régua específica para teste de puntura.

### **Procedimento experimental:**

1. Assepsiar o antebraço.
2. Aplicar os alérgenos em gotas (distância de  $\pm$  3cm). Evitar zonas de flexão e sangramento.
3. Realizar a puntura no local da gota; penetrar somente a ponta do puntor.

4. Aguardar de 15 a 20 minutos para leitura.
5. Retirar as amostras de alérgenos com algodão seco.
6. Proceder à leitura e medida das pápulas e eritema.

**Inferências e Resultados:** são consideradas positivas as reações com pápulas e eritemas iguais ou maiores que 3mm de diâmetro (Figura 16).

Soluções	Pápula (mm)	Eritema (mm)
Solução salina (controle negativo)		
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
Epitélio de cão		
<i>Dermatophagoides farinae</i>		
Epitélio de gato		
<i>Blomia tropicalis</i>		
Barata (mix)		
<i>Alternaria sp</i> (fungo)		
<i>Lolium perenne</i> (pólen)		
Histamina (controle positivo)		

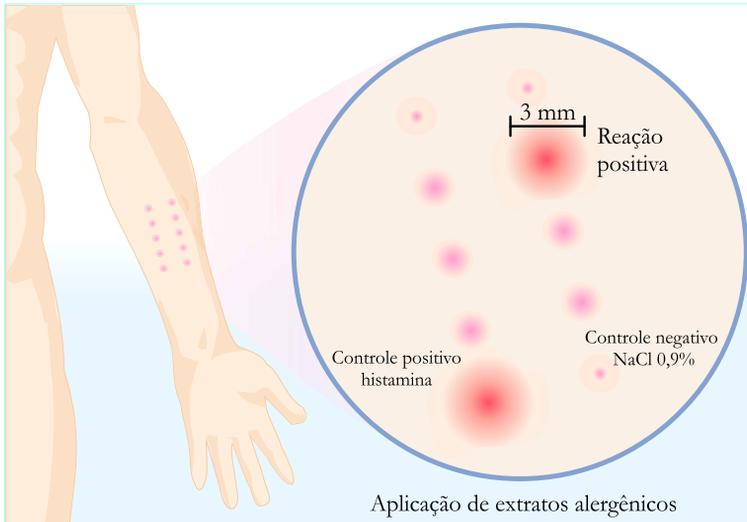
**O falso positivo ou falso negativo:**

7. O alérgeno pode ter sido usado em baixa concentração, pode ter havido contaminação, o alérgeno não neutro ou não isotônico.
8. Falha técnica (puntura superficial ou muito profunda, mistura de alérgenos, material contaminado).

9. Fatores inerentes ao indivíduo (sensibilidade ao veículo, dermatografismo, infecções crônicas ou virais).
10. Execução dos testes em períodos refratários (logo após crises alérgicas agudas, uso de medicamentos que interferem nos resultados).

**Comentários:** o teste alérgico é um procedimento médico, portanto deve ser feito com o acompanhamento de um profissional e em ambiente adequado.

Figura 16: Teste cutâneo de leitura imediata (*prick test*).



Fonte: Brígido, P.C

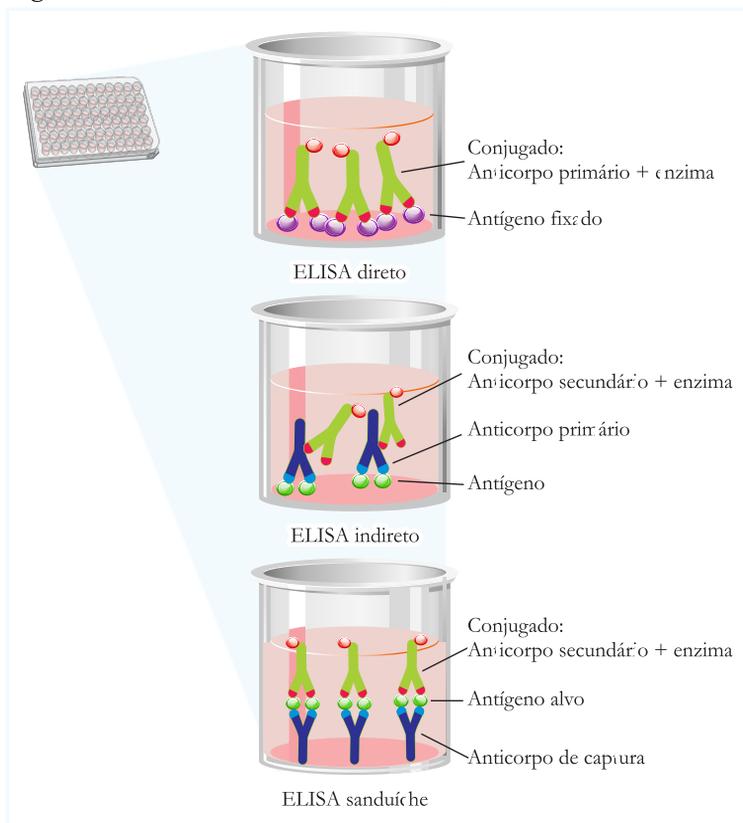


## Ensaio imunoenzimático

*ELISA* (*Enzyme – Linked Immunosorbent Assay*), o teste de “ELISA” (do inglês “**E**nzyme **L**inked **I**mmunono**S**orbent **A**ssay”) é um método de análise quantitativo desenvolvido inicialmente por Engvall e Perlman (1971), na Universidade de Estocolmo (Suécia) e simultaneamente por Van Weeman e Schuurs (1971), como alternativa ao radioimunoensaio. O teste é baseado na interação antígeno-anticorpo detectável por meio de reação enzimática. A enzima mais utilizada é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) mais oxigênio ( $O_2$ ).

O ensaio pode ser usado para pesquisa de antígenos ou de anticorpos específicos de determinado antígeno em diversos tipos de amostras biológicas (fluidos corporais, sobrenadantes de cultura de células etc.). Existem vários modelos de testes de ELISA, o mais simples, chamado ELISA direto; indireto e sanduíche (Figura 17).

Figura 17: Técnicas de ELISA: direto, indireto e sanduíche.



Fonte: Brígido, P.C

O ELISA direto é uma técnica utilizada para detecção de antígeno em uma amostra teste, por exemplo, no diagnóstico da hepatite B.

O ensaio de ELISA indireto detecta o anticorpo em uma amostra teste e é utilizado no diagnóstico de doenças como aids, toxoplasmose, doença de Chagas, dengue, entre outras.

As placas de microtitulação são sensibilizadas com antígeno correspondente ao anticorpo alvo. Após a sensibilização,

as placas são lavadas para retirar o excesso de antígeno não ligado e, em seguida, realiza-se o bloqueio de sítios inespecíficos pela incubação de uma solução proteica que ocupará os espaços vazios do poço não ocupados pelo reagente da sensibilização. A solução de bloqueio pode ser leite desnatado, caseína, albumina sérica bovina (BSA), soro fetal bovino (SFB) e gelatina, nas concentrações previamente padronizadas.

Caso o anticorpo esteja presente na amostra teste (por exemplo, soro humano), ele se ligará ao antígeno, formando o complexo antígeno-anticorpo, posteriormente detectado pela adição de um segundo anticorpo reativo contra imunoglobulinas da espécie, em que se busca detectar os anticorpos (humanos, no caso), os quais são ligados à peroxidase. O anticorpo anti-IgG, ligado à enzima, denomina-se conjugado. Em seguida, adiciona-se o substrato adequado à enzima ( $H_2O_2$ ) e cromógeno, e a enzima catalisa a sua transformação dando cor à reação. A atividade enzimática (intensidade da cor) é proporcional à concentração de antígeno ou de anticorpo ligado e mensurado por espectrofotômetro (leitora de placas), com emissão de luz no comprimento de onda adequado para cada cromógeno. A concentração do anticorpo presente na amostra testada pode ser determinada por comparação da coloração do produto da reação de uma curva-padrão conhecida.

O teste ELISA sanduíche detecta o antígeno em amostra teste, usado para dosagem de hormônios, proteínas séricas, citocinas, antígenos tumorais etc.

As placas de microtitulação são sensibilizadas com anticorpo específico, lavadas e bloqueadas. Em seguida, adiciona-se a amostra teste (antígeno de interesse), posteriormente o conjugado, a solução reveladora (enzima + cromógeno) e por fim a solução *stop* (solução ácida). Os resultados são determinados como descrito anteriormente.

## **iELISA (ELISA indireto) para diagnóstico da toxoplasmose**

O teste para detecção de toxoplasmose se baseia na técnica de ELISA e tem por finalidade detectar anticorpos da classe IgG para *Toxoplasma gondii* no soro humano e animal. Neste ensaio, placas de 96 poços são revestidas com antígeno *T. gondii* inativado e purificado. Após incubação e lavagem, as cavidades são tratadas com o conjugado, composto de anticorpos monoclonais anti-IgG marcados com peroxidase. Após a segunda etapa de incubação e lavagem, as cavidades são incubadas com o substrato ortofenilenodiamina (OPD). Uma solução ácida (0,2M de ácido sulfúrico) de interrupção é adicionada e o grau de reposição enzimática do substrato é determinado pela medida de absorbância em comprimento de onda a 492nm. A medida de absorbância é diretamente proporcional à concentração de anticorpos anti-*T. gondii* IgG presentes.

### **Material:**

- Placas revestidas com antígeno *T. gondii*.
- Tampão de ensaio: PBS com detergente não iônico (PBS Tween 20).
- Controle negativo: soro isento de anticorpos anti-*Toxoplasma* IgG.
- Controle positivo: soro contendo anticorpos anti-*Toxoplasma* IgG, diluído em tampão a base de proteína com conservante isento de mercúrio.
- Anticorpo conjugado marcado com enzima: anticorpos monoclonais marcados com peroxidase anti-IgG.
- Solução cromógena: OPD em tampão citrato com peróxido de hidrogênio.
- Solução de parada: 0,2M de ácido sulfúrico.

### Procedimento experimental (Figura 18):

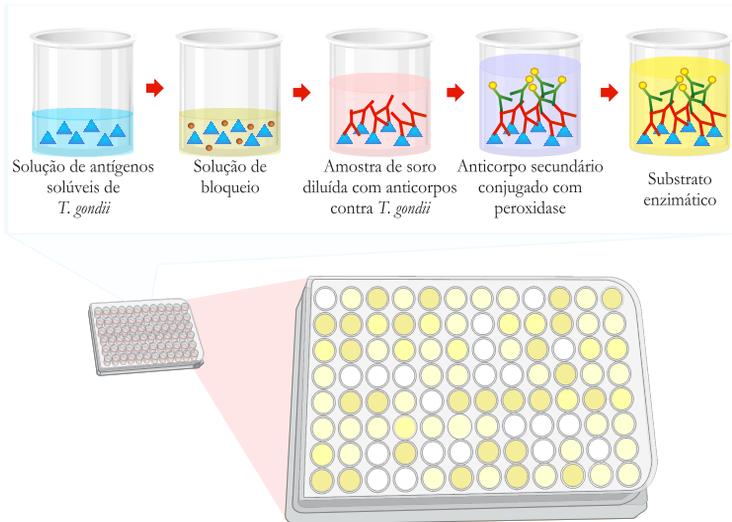
- Sensibilizar as placas com 50mL/poço de uma solução de antígenos solúveis de *T. gondii* na concentração de 5mg/ mL, em tampa carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. Incubar a 4°C por 24h.
- Lavar as placas 3 vezes com PBS-T 0,1% após o período.
- Diluir os soros teste e controles a partir de 1/2, na razão de 2, em 1% de molico PBS (0,15M pH 7,2) - Tween 20 (0,1%).
- Adicionar 50ml das amostras dos soros diluídas em duplicata. Incubar a 37°C por 30 minutos.
- Lavar as placas 3 vezes.
- Diluir o conjugado enzimático 1mL (anti-IgG do soro se testado marcado com peroxidase) em 9mL PBS – T 0,1%.
- Adicionar 50mL do conjugado previamente diluído em PBS – T 0,1%. Incubar a 37°C por 30 minutos.
- Lavar as placas 3 vezes.
- Preparar o substrato enzimático, consistindo de 5mg de OPD (orto-fenilenodiamina) em 12,5mL de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, preparada na hora do uso.
- Adicionar 50mL do substrato previamente preparado e incubar por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente, em câmara escura.
- Interromper a reação enzimática adicionando 25mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 17mL de água destilada).
- Fazer a leitura a 492nm em leitor de microplacas.

## Inferências e resultados:

$Cut-off = 3 \times DP$  (desvio padrão).

Resultado positivo igual ou superior ao *cut-off*.

Figura 18: ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* no soro.



Fonte: Brígido, P.C

## Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Alguns materiais têm a propriedade de absorver energia quando expostos à luz em um determinado comprimento de onda. A luz emitida tem baixa energia e uma cor diferente da luz incidente. A luz emitida é chamada de fluorescente e a fluorescência é a capacidade de uma substância de emitir luz quando exposta a radiações do tipo ultravioleta (UV), raios catódicos ou raios X. As radiações absorvidas (invisíveis ao olho humano) se transformam em luz visível, ou seja, com um comprimento de onda maior que o da radiação incidente.

Nos testes de imunofluorescência são empregados conjugados constituídos de anticorpos ligados covalentemente a moléculas reveladoras denominadas fluorocromos. Os fluorocromos são substâncias que absorvem luz ultravioleta e emitem luz visível, ou seja, ficam fluorescentes. O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é o fluorocromo mais utilizado na imunofluorescência. O FITC é excitado por uma luz azul de alta energia no comprimento de onda 450-550nm e emite fluorescência na luz amarelo-esverdeada de baixa energia no comprimento de onda 500-550nm.

O filtro de excitação do microscópio de fluorescência restringe a passagem de luz de um comprimento de onda (por exemplo, 470nm). A luz filtrada é projetada sobre a amostra fluorescente. A luz fluorescente emitida no comprimento de onda 520-550nm passa por um espelho dicróico e por um filtro de barreira e, então, torna-se uma luz visível ao microscópio.

A técnica de imunofluorescência tem como princípio a capacidade das moléculas de anticorpo se ligarem covalentemente aos fluorocromos; é um método qualitativo e semiquantitativo o qual permite a detecção e localização de antígenos em células e tecidos utilizando anticorpos específicos, marcados com fluorocromos, de modo que a localização dos antígenos se torna visível ao microscópio de fluorescência. De acordo com o mesmo princípio, podemos detectar e localizar anticorpos em fluidos biológicos usando seu antígeno correspondente.

São dois tipos de imunofluorescência, a direta e a indireta. Na imunofluorescência direta, os anticorpos estão conjugados com fluorocromo. Na imunofluorescência indireta, o anticorpo secundário é ligado ao fluorocromo após a ligação antígeno-específica do anticorpo primário. A imunofluorescência direta pode ser usada para dois ou mais antígenos ao mesmo tempo. Na imunofluorescência indireta a amostra pode ser fixada para tornar a membrana celular permeável para identificação de antígenos intracitoplasmáticos.

### **Imunofluorescência indireta para detecção de *Neospora caninum***

*N. caninum* é um protozoário intracelular obrigatório intimamente relacionado com *T. gondii*, responsável pela infecção de cães domésticos e selvagens, ruminantes e outros animais em todo o mundo. A neosporose, doença causada pela infecção

com *N. caninum* tem como consequência o aborto e a morte fetal, especialmente no gado leiteiro, o que causa perdas econômicas.

O diagnóstico laboratorial é realizado pela detecção de anticorpos específicos para *N. caninum*. Entre os métodos sorológicos, são empregados imunofluorescência indireta (IF), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), *imunoblotting* (IB) e aglutinação direta, usando taquizoítas intactos ou antígenos de taquizoítas (formas rápidas de multiplicação do parasito). A história clínica do animal e/ou rebanho também auxilia no diagnóstico correto. Segue a descrição da técnica de imunofluorescência indireta (IF) para detecção de *N. caninum*.

**Objetivo da atividade prática:** identificar em uma amostra biológica a presença do parasito *Neospora caninum*.

### **Procedimento experimental:**

- **Fixação dos antígenos de *N. caninum*:**

1. Formas taquizoítas de *N. caninum* obtidas por meio de cultura de células devem ser sedimentadas por centrifugação a 720 x g a 4°C por 10 min.
2. Em seguida, lavar o *pellet* 2x com PBS e formalizar com formol a 4% por 2, posteriormente, lavar 2x com água destilada e pingar a solução de parasitos em concentração adequada na lâmina.

### **Bloqueio de sítios inespecíficos:**

- Colocar a(s) lâmina(s) em uma jarra de Coplin, ou similar, e incubá-las com 100mM de glicina por 5 minutos no volume de 50mL, em seguida, lavá-la(s) com PBS.

- Remover a(s) lâmina(s) do Coplin e retirar o excesso de PBS, sacudindo-a(s) sobre papel absorvente.
- Incubar as lâminas com PBS-BSA 3% por 30 minutos.

#### **Permeabilização:**

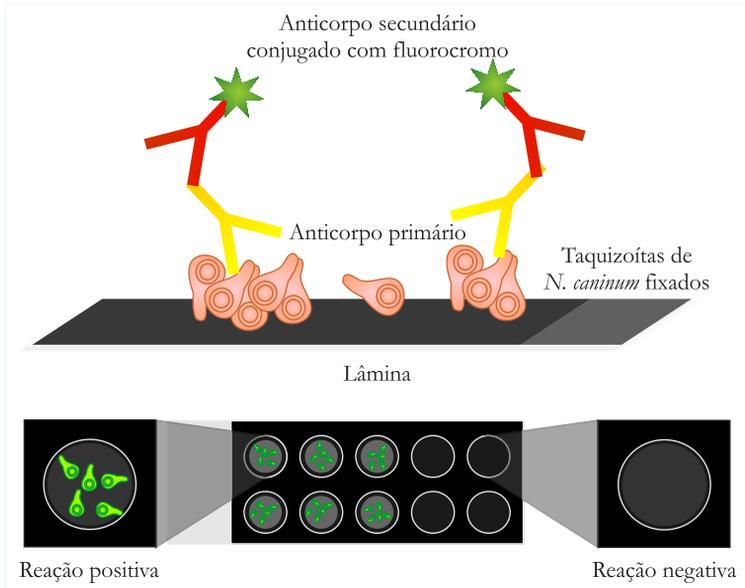
1. Incubar as lâminas com PBT (PBS, 3% BSA, 0,1% Triton X-100) por 20 min.

#### **Reação Ag/Ac:**

1. Adicionar o anticorpo primário na diluição de 1/25 [soro de camundongo positivo (amostra teste) e soro de camundongo negativo (amostra controle) para *N. caninum*] em um volume final de 10 $\mu$ L por poço.
2. Lavar as lâminas 3x com PBS.
3. Adicionar o anticorpo secundário (Alexa 488-IgG anti-mouse produzido em cabra na presença de azul de Evans 1% ou Alexa 594-IgG anti-coelho produzido em cabra na ausência de azul de Evans 1%).
4. Lavar as lâminas 1x com PBS.
5. Montar a lâmina com 1 gota de glicerina tamponada sobre cada poço e cobrir com a lamínula para visualização no microscópio de fluorescência.

**Inferência e resultados:** o aluno deverá ser capaz de identificar o parasito na lâmina de imunofluorescência.

Figura 19: Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção da presença de *Neospora caninum*.



Fonte: Brígido, P.C



*SLOT-BLOT*

O *slot-blot* é uma técnica de biologia molecular usada para detectar biomoléculas para detecção, análise e identificação de proteínas. É uma simplificação das metodologias *Northern-blot*, *Southern-blot* ou *Western-blot*, nas quais as biomoléculas, para serem detectadas, são separadas pela eletroforese e transferidas para membranas específicas (PVDF - difluoreto de polivideno e nitrocelulose) e posteriormente incubados com anticorpo de detecção e revelados na presença de cromógeno e água oxigenada. Enquanto isso, o *slot-blot* da molécula a ser detectada é aplicado diretamente na membrana de nitrocelulose ou PVDF com auxílio de uma bomba de sucção à vácuo, em canaletas pré-definidas no molde do kit. Em seguida são adicionados os anticorpos e a solução reveladora. Amostras positivas são reveladas pelo aparecimento de bandas de coloração marrom-alaranjada. Amostras negativas não são marcadas. É uma metodologia rápida, no entanto, não oferece informação sobre o tamanho da biomolécula-alvo. Além disso, se forem detectadas duas moléculas de tamanhos diferentes,

elas ainda aparecem como um único ponto. O *slot-blot*, portanto, só pode confirmar a presença ou ausência de uma biomolécula que pode ser detectada pelo anticorpo.

**Procedimento experimental:**

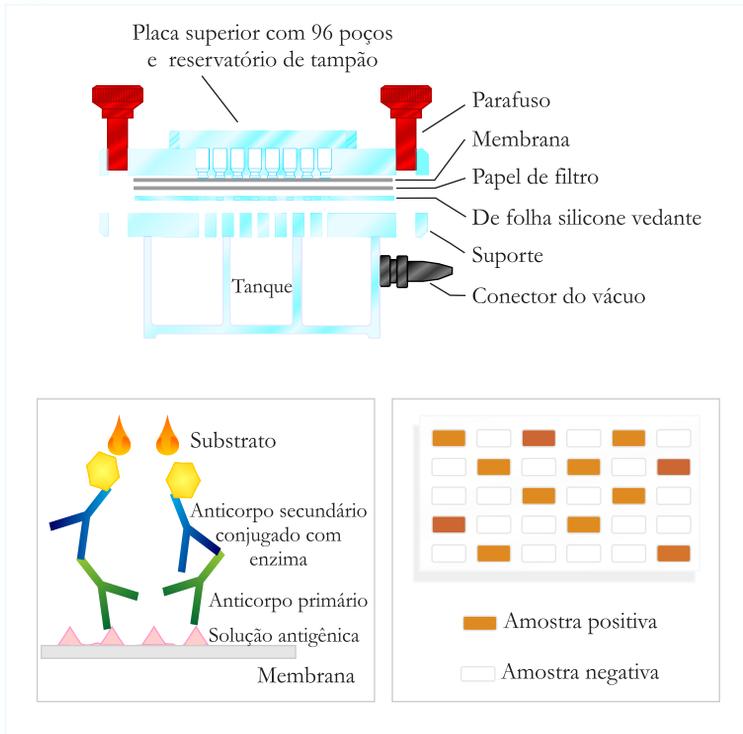
- Cortar a membrana de nitrocelulose em tiras e colocar em placas para a impregnação da solução antigênica por meio da sucção da bomba de vácuo.
- Bloquear a membrana com PBS-Tween a 0,05% contendo leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente.
- Aspirar a solução bloqueadora e lavar 1x com PBS-TM a 1%.
- Adicionar 500 µL dos anticorpos primários diluídos a 1:50 em PBS-TM *overnight* à temperatura ambiente.
- Lavar com PBS-T a 0,05% por 6 ciclos de 5 minutos.
- Incubar com anticorpo secundário (marcado com enzima) na diluição ótima de uso, em PBS-TM a 1% por 1 hora à temperatura ambiente.
- Lavar com PBS-T a 0,05% por 5 ciclos de 5 minutos e com apenas PBS por mais 5 minutos.
- Revelar com a solução cromógena, substrato com 2,5mg de diaminobenzidina (DAB) em 15mL de PBS (frasco escuro ao abrigo da luz) e, no momento do uso, adicionar 225µL de água oxigenada a 30%.
- Após o aparecimento de bandas de cor marrom, bloquear a reação lavando as tiras com água destilada por várias vezes.
- Secar as tiras entre 2 folhas de papel de filtro.

### Interpretação dos resultados:

Amostra positiva: bandas de coloração marrom-alaranjada.

Amostra negativa: ausência de marcação de bandas.

Figura 20: Técnica de *Slot Blot*.



Fonte: Brígido, P.C



### 1. Contagem de células em câmara de *Neubauer*

A câmara de Neubauer ou hemocitômetro é um instrumento laboratorial usado para determinar a concentração de células numa amostra líquida. A câmara é formada por uma lâmina própria com duas subcâmaras para inclusão da amostra.

Cada quadrante da câmara é coberto por uma lamínula, que representa um volume total de  $0,1\text{mm}^3$ . Como  $1\text{cm}^3$  é equivalente a  $1,0\text{mL}$ , a quantidade de células por mL e o número total de células pode ser determinado. A profundidade central da câmara é de  $1\text{mm}$ . No desenho figuram, nove grandes áreas de  $1\text{mm}^2$ . As quatro áreas grandes angulares (L) são subdivididas em 16 áreas com  $0,25\text{mm}$  de cada lado. Elas servem para contagem de leucócitos. A grande área central é subdividida em 25 grupos quadrados de  $0,2\text{mm}$  de cada lado. Cada grupo é composto de 16 miniáreas com  $0,05\text{mm}$  de lado, tendo cada área  $0,0025\text{mm}^2$ . Os cinco grupos marcados (E) são usados para contagem de eritrócitos. Observa-se que todas as áreas têm uma borda tripla

em cada lado. A linha central é o limite e determina quando uma célula deve ser incluída na contagem ou não.

### **Procedimento experimental:**

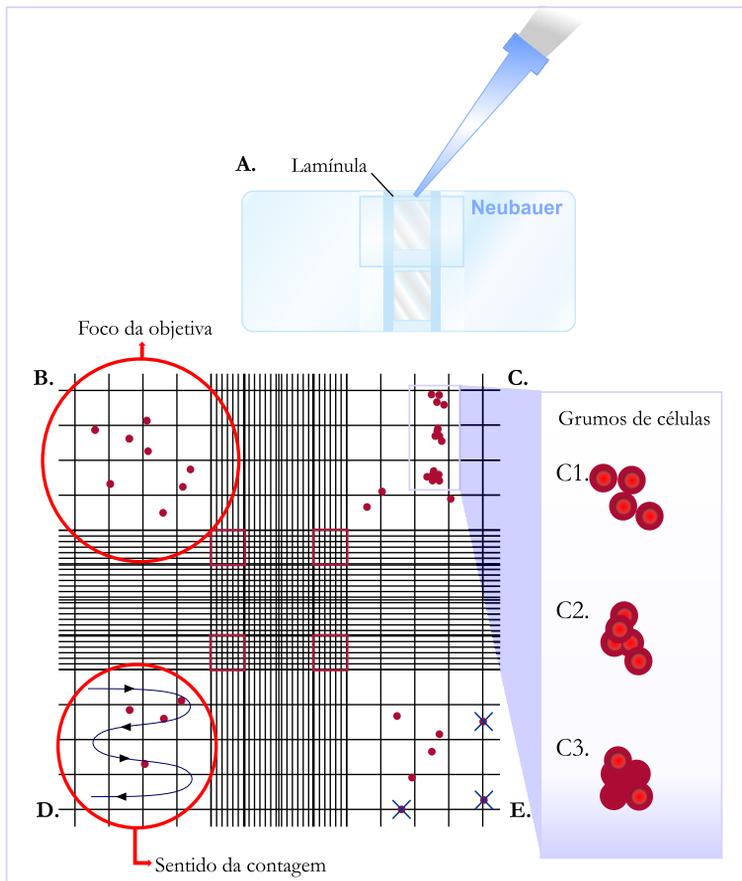
1. Colocar a lamínula sobre a área marcada na câmara de contagem. Usar lamínulas especiais que fornecem a profundidade correta da câmara de contagem. Não usar lamínulas comuns.
2. Homogeneizar bem a suspensão celular. Retirar uma alíquota para colocar na câmara.
3. Encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencher cuidadosamente a câmara de contagem. O líquido deve preencher apenas um lado da câmara e não deve chegar aos canais de cada lado da área de contagem (Figura 20).
4. Deixar as células sedimentarem por 1 minuto.
  - Focalizar a área demarcada da câmara de contagem com a objetiva de menor aumento (Figura 20). Nas áreas 1, 2, 3 e 4, o volume com a lamínula colocada corresponde a  $0,1\text{mm}^3$  (ou  $0,1\text{mL}/\text{quadrante}$ ).
  - Contar as células nas quatro áreas de um lado da câmara de contagem e dividir o valor por 4 para obter o número médio de células.

### **Crítérios para contagem** (Figura 20):

- a. Enumerar células com núcleo bem visível.
- b. Contar células isoladas como 1 célula (A).
- c. Contar grumos constituídos por células facilmente distinguíveis por seus núcleos e citoplasmas como grumos de células isoladas e contar cada célula (B).
- d. Grumos, cujas células são difíceis de serem

- distinguidas umas das outras, devem ser contados como um único grupo (C).
- e. As células que se encontram na linha de grade da câmara devem ser contadas com critério diferenciado. As células localizadas nas linhas superiores à direita de um quadrado não devem ser contadas, as células na parte inferior esquerda devem ser contadas (D).
  - f. A concentração de células não deve ser muito elevada ou muito baixa!
  - g. Se a concentração for muito elevada, as células se sobreporão, dificultando a contagem. A baixa concentração de apenas algumas células por resultados quadrados implicam em um maior erro estatístico, sendo necessário contar mais quadrados. As suspensões que têm uma concentração muito elevada devem ser diluídas de 1:10, 1:100 e 1:1000. A diluição deve ser posteriormente considerada no cálculo da concentração final.

Figura 21: Procedimento para contagem de células em câmara de Neubauer.



Fonte: Brígido, P.C





## Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*, 8ed., Philadelphia: Sanders, 2014, 576p.
- ADMYRE, C.; TELEMO, E.; ALMQVIST, N; et al. Exosomes: nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy*, v.63, n.4, p.404-408, 2008.
- BATISTA, A. A; QUEIROZ, S. L. Funções biológicas do óxido nítrico. *Química Nova*, São Paulo, v.22, p.584-590, 1999.
- BERNSTEIN, I. L; LI, J. T.; BERNSTEIN, D. I.; et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, USA, v.100, p.1-148, 2008.
- Bradley, P.J; Ward, C.; Cheng, S.J; Alexander, D.L; Coller, S.; Coombs, G.H; Dunn, J.D; Ferguson, D.J.; Sanderson, S.J.; Wastling, J.M., Boothroyd, J.C. Proteomic analysis of rhoptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.40, p.34.245-34.258, 2005.
- BURMESTER, G. R.; PEZZUTTO, A. *Color Atlas of Immunology*. Thieme, 2003, 338p.
- DA SILVA, A. C. Diagnóstico da Neosporose Bovina. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.13, p.133-138, 2004.
- DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. *Essential Immunology*. 12ed. , Wiley-Blackwell, 2011, 560p.

Dot blot protein. Disponível em: [http://www.csb.pitt.edu/faculty/clark/files\\_protocols/Western\\_DotBlot.pdf](http://www.csb.pitt.edu/faculty/clark/files_protocols/Western_DotBlot.pdf). Acesso em: 10 de março de 2015.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA): quantitative assay of Immunoglobulin G, *Immunocytochem*, Oxford, v.8, n.9, p.871-879, 1971.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v.46, p.265-271, 2000.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. *Nature*, London, v.454, n.7203, p.445-454, 2008.

HAMILTON, R. G.; ADKINSON, N. F. Clinical laboratory assessment of IgE-dependent hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.111, p.687-701, 2003.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. *Manual de Biossegurança*. 2ed. São Paulo: Manole, 2012, 384p. Disponível em: <http://www.biomedicinapadrao.com/2011/09/como-fazer-e-calcular-diluicoes.html>. Acesso em: 10 de março de 2015.

JOHANSSON, S. G. et al. Revised nomenclature of allergy for global use: Report of the Nomenclature Committee of the World Allergy Organization, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, October 2003., St Louis, v.113, n.5, p.832-836, 2004.

KIM, J. S; O'GORMAN, M. R. G. Chapter 31: Common *in vitro* tests for allergy and immunology. *Allergy Asthma Procediment*, v.25, p.57-58, 2012.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. *Immunobiology of Janeway*. 7ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 868p.

MASTROENI, M. F. *Biossegurança Aplicada a Laboratórios e Serviços de Saúde*. São Paulo: Ateneu Rio, 2005, 338p.

OPPENHEIMER J.; NELSON H. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, v.96, p.19-23, 2006.

OPRANDY, J.J., OLSON, J.G., SCOTT, T.W. A rapid dot immunoassay for the detection of serum antibodies to Eastern equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses in sentinel chickens. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v.38, p.181-186, 1998.

Protein Blotting Applications Guide, *Technical Protocol TP001*, 1997, Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA.

SANTANA, L. R.; PARAHYBA, M. J. P. C. Teste VDRL para o diagnóstico

da sífilis. Avaliação dos resultados em uma unidade de atenção primária de saúde. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*, v.38, p.71-73, 2006.

Serviço de Transfusão do Laboratório de Compatibilidade. Unicamp. Disponível em: <[http://www.criobanco.com.br/documentos/MANUAL\\_DE%20ORIENTACAO\\_%20TRANSFUSIONAL\\_-\\_Edicao\\_02.pdf](http://www.criobanco.com.br/documentos/MANUAL_DE%20ORIENTACAO_%20TRANSFUSIONAL_-_Edicao_02.pdf)>2010>. Acesso em: 8 de julho de 2015.

Sífilis. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 22 de maio de 2015.

SINOGAS, C. *Imunologia*: Manual de apoio às sessões laboratoriais. Universidade de Évora. Disponível em: [www.ensino.uevora.pt/imuno](http://www.ensino.uevora.pt/imuno).

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. *Biossegurança: Uma Abordagem Multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2010, 442p.

Teste de imunofluorescência indireta para a determinação de anticorpos contra o *Treponema pallidum* em soro humano e líquidos biológicos. Disponível em: <<http://www.interlabdist.com.br/dados/produtos/bula/doc/659932384480f3d2f6eb9c.pdf>>. Acesso em: 22 de maio de 2015.

Uso da câmera de Neubauer. Disponível em: <<http://protocolos3.dominiotemporario.com/index.html>>. Acesso em: 04 de agosto de 2015.

VAN WEEMAN, B. K.; SCHUURS, A. H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, Amsterdam, v.15, n.3, p. 232-236, 1971.

WEHR, N. B.; LEVINE, R. L. Quantitation of protein carbonylation by dot blot *Analytical Biochemistry*, v.428, p.241-245, 2012.

## **Sobre o livro**

Formato      15 cm x 21 cm  
Tipologia     Adobe Caslon Pro

Este Manual busca integrar a imunologia teórica com a prática de uma forma visualmente atrativa, direcionada a diferentes tipos de leitores: acadêmicos dos cursos de graduação em Biomédicas, pós-graduandos e profissionais da área que queiram conhecer o passo-a-passo de diversos procedimentos e seus respectivos objetivos. Aqui estão as normas de biossegurança para laboratoristas, mostrando a preocupação dos autores em “discutir” sobre o alerta ao leitor em relação à segurança do profissional e comunidade. Além disso, apresenta diversos procedimentos in vitro, como separação de linfócitos do sangue periférico, imunoprecipitação, dosagem de óxido nítrico, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI), entre outros, muitos deles rotineiramente empregados como recursos no diagnóstico de diversas doenças. Outro importante assunto é a execução da avaliação da resposta alérgica in vivo, pelo teste de puntura a aeroalérgenos.

Editora filiada à



Associação Brasileira  
das Editoras Universitárias



Editora da Universidade  
Federal de Uberlândia

[www.edufu.ufu.br](http://www.edufu.ufu.br)

ISBN 978-85-7078-445-2



9 788570 784452