

AVALIAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE SEPARAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E COLORAÇÃO DE LINFÓCITOS POR MEIO DA REAÇÃO DE MICROLINFOCITOTOXICIDADE

Glicélia da Rosa*

Alessandra Valéria de Oliveira**

Sueli Donizete Borelli***

Luciene Christina Marques da Silva Pereira****

RESUMO: A reação de microlinfocitotoxicidade é rotineiramente utilizada para realizar a prova cruzada. Os linfócitos do doador, nesta reação, são alvos dos aloanticorpos anti-HLA que podem estar presentes no soro do receptor, e por isso é importante definir a metodologia de separação, diferenciação e coloração dos linfócitos. Devido à fragilidade celular dos linfócitos, principalmente dos linfócitos B, os métodos de separação, diferenciação e coloração apresentam influência direta no resultado da reação. O objetivo deste estudo foi comparar duas metodologias de separação, diferenciação e coloração de linfócitos: os métodos de *ficoll-hypaque/fluorobeads* e azul de tripan/*fluoroquent*, respectivamente. Vinte e sete provas cruzadas foram desenvolvidas utilizando o método de *ficoll-hypaque*/tripan e 42 provas cruzadas pelo método de *fluorobeads/fluoroquent*. Os resultados mostraram a superioridade do método *fluorobeads/fluoroquent* no processo de separação, diferenciação e coloração para as duas populações de linfócitos, T e B.

PALAVRAS-CHAVE: Microlinfocitotoxicidade; Prova cruzada; Anticorpos.

EVALUATION OF TWO METHODS OF ISOLATION, DIFFERENTIATION AND STAINING OF LYMPHOCYTES BY MEANS OF MICROLYMPHOCYTOTOXICITY REACTION

ABSTRACT: The Microlymphocytotoxicity reaction routinely is used to carry the cross match. The donor's lymphocytes, in this reaction, are target to anti-HLA alloantibodies that could be present on the receptor's serum, and because of this is so important to define the methodology of isolation, differentiation and staining of lymphocytes. Due to cellular fragility of lymphocytes, mainly B-lymphocytes, the methods of isolation, differentiation and staining show direct influence on the reactions result. The aim of this study was to compare two methodologies of isolation, differentiation and staining of lymphocytes: by *ficoll-hypaque/fluorobeads* and *tripan blue/fluoroquent* methods respectively. Twenty-seven crossed match were developed using *ficoll-hypaque*/tripan method and 42 crossed match by *fluorobeads/fluoroquent* methods. The final results showed that *fluorobeads/fluoroquent* method had better performance in the process of isolation, differentiation and staining for both lymphocytes populations, T and B.

KEY WORDS: Microlymphocytotoxicity; Cross match; Antibodies.

INTRODUÇÃO

A escolha de um doador para um determinado receptor de órgãos envolve várias etapas, entre elas a realização de testes imunológicos no intuito de minimizar as diferenças alôgenicas entre ambos. Entre os testes realizados estão a tipagem ABO, Rh, HLA, reatividade contra

painel de células e a prova cruzada. Embora métodos mais sensíveis estejam sendo estudados para a avaliação da resposta imuno-humoral específica, a prova cruzada realizada pelo método CDC (citotoxicidade celular dependente de complemento) é ainda rotineiramente utilizada na prevenção da rejeição hiperaguda em transplantes (AKALIN; BROMBERG, 2005; ALTERMANN et al., 2006).

* Acadêmica do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. E-mail: glicelia@hotmail.com

** Docente do Departamento de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. E-mail: alessoli@cesumar.br

*** Docente do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: sdborelli@uem.br

**** Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM. E-mail: lucimga@yahoo.com.br

A reação de microlinfocitotoxicidade celular dependente de complemento foi proposta por Terasaki e Mc Clelland em 1964 e modificada em 1977 por Bodmer e Bodmer. Esta reação pode ser utilizada para detectar a presença de anticorpos anti-HLA (*Human Leukocyte Antigen*) pré-formados no soro do receptor, dirigidos contra antígenos HLA presentes nos linfócitos do potencial doador de órgãos ou tecidos, sendo denominada de prova cruzada ou *cross match*.

A prova cruzada é realizada em microplacas de Terasaki, onde o soro do receptor é incubado com as células do potencial doador, mediante a adição do complemento, sendo que, caso haja anticorpos pré-formados no soro do receptor contra as células do doador, estas serão lisadas e o resultado será positivo, indicando, desta maneira, que este doador não é apropriado para o receptor. Esta sensibilização prévia dos candidatos a transplante decorre, freqüentemente, da produção de aloanticorpos anti-HLA da classe IgG, podendo ser dirigida contra os antígenos de classe I e/ou classe II. Quando presentes, estes anticorpos podem fixar-se na superfície das células do enxerto e provocar a fixação do complemento, com a conseqüente lise celular (SEIGNALET; MOURAD; MION, 1990).

Esta reação é também muito utilizada na reatividade contra painel (do inglês, *Panel Reactivity Antibodies*), onde o soro do receptor é analisado contra um painel de células provenientes de diferentes indivíduos previamente tipados para os antígenos HLA. Este painel de células é selecionado para representar a distribuição dos antígenos HLA da população, e, por conseguinte, a positividade contra esse painel reflete o grau de sensibilização do receptor frente aos antígenos contidos no painel, e da mesma forma contra a população estudada (DUQUESNOY et al., 1990).

A avaliação do receptor quanto à possível presença de anticorpos de histocompatibilidade contra o doador específico, bem como a análise do percentual de reatividade contra o painel de células (PRA), é de fundamental importância no preparo de um paciente para o transplante (GEBEL; BRAY, 2000).

Para o desenvolvimento da reação de microlinfocitotoxicidade é necessário definir a metodologia de separação, diferenciação e coloração das células provenientes do doador e/ou receptor. A separação de linfócitos consiste na retirada das células mononucleadas do sangue periférico, onde a predominância é de linfócitos. Essa separação pode ser realizada pelo método de *ficoll-hypaque*, e resultará em um concentrado de linfócitos totais.

Os métodos empregados para essa separação podem ser inespecíficos, utilizando-se fibras de náilon ou hemácias de carneiro, as quais se ligam espontaneamente aos receptores dos linfócitos T, formando rosetas (FRÖLAND, 1972; JONDAL; HOLM; WIGZELL, 1972.); ou podem ser específicos, através da separação por esferas imunomagnéticas, que constituem partículas superparamagnéticas com anticorpos monoclonais anti-CD2 para linfócitos T e anti-CD19 para linfócitos B, acoplados nas respectivas superfícies. As esferas podem ser recolhidas

utilizando-se um campo magnético, que após a retirada não deixa nenhum magnetismo residual nas esferas (BOLHUIS et al., 1986).

Quando se realiza a separação de linfócitos pelo método do *Ficoll-hypaque*, freqüentemente, é utilizada a coloração destes pelos corantes azul de Tripán ou Hematoxilina-Eosina (BOYUM, 1968; BELL; MATHESON; HO-YEN, 1990). A separação de linfócitos por microesferas, "beads", requer a coloração por reagentes fluorescentes.

Devido à fragilidade celular dos linfócitos, principalmente dos linfócitos B, os métodos de separação, diferenciação e coloração têm influência direta no resultado final da reação de microlinfocitotoxicidade, podendo dificultar a leitura e a interpretação dos resultados.

Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo entre duas metodologias de separação/diferenciação e coloração de linfócitos: os métodos de *ficoll-hypaque/fluorobeads* e azul de tripán/*fluoroquent* respectivamente, através da reação de microlinfocitotoxicidade.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1 Soro

Foram coletados 5mL de sangue periférico humano, em tubo seco sem anticoagulante, e posteriormente centrifugados a 800g durante 15 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e armazenado em microtubos de 1,5mL, a uma temperatura de -20°C.

2.1.2 Linfócitos

Os linfócitos foram obtidos a partir de 10mL de sangue periférico humano, coletados em tubos com anticoagulante ACD (ácido citratodextrose), e posteriormente utilizados conforme recomendado.

2.2 MÉTODO DE SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS POR FICOLL-HYPAQUE

2.2.1 Separação de linfócitos (T)

O sangue periférico foi centrifugado a 800g, durante 10 minutos, para separar a camada leucocitária (*buffy coat*). Com auxílio da pipeta Pasteur, o *buffy-coat* foi retirado e diluído em aproximadamente 7mL de PBS (*phosphate buffer saline*) e adicionado delicadamente sobre 2mL da solução de *Ficoll-Hypaque™plus*. Em seguida o material foi centrifugado a 1000g por 20 minutos para obtenção do anel de linfócitos. Após a obtenção do anel de linfócitos, foram efetuadas duas lavagens, centrifugando a amostra a 600g, durante 10 minutos, desprezando-se o

sobrenadante após cada uma das centrifugações. Após a última lavagem os linfócitos foram ressuspensos em meio enriquecido *McCoy* (*McCoy* 5^A MEDIUM CAT. CODM 4892. SIGMA). A concentração dos linfócitos foi acertada para 3×10^6 linfócitos/mL.

2.2.2 Separação de linfócitos (B)

O sangue periférico foi centrifugado a aproximadamente 800g, durante 10 minutos, para separar a camada leucocitária (*buffy coat*). Com auxílio da pipeta Pasteur o *buffy-coat* foi retirado e diluído em aproximadamente 7mL de PBS (*phosphate buffer saline*) e adicionado delicadamente sobre 2 mL da solução de *Ficoll-Hypaque™ plus*. Em seguida o material foi centrifugado a 1000g por 20 minutos para obtenção do anel de linfócitos. Após obtenção do anel de linfócitos, foram efetuadas duas lavagens, centrifugando a amostra a 600g, durante 10 minutos, desprezando-se o sobrenadante após cada uma das centrifugações. Após a última lavagem, os linfócitos totais foram ressuspensos em 1mL de meio enriquecido *McCoy* e distribuídos na superfície de um cotonete de fibras de náilon (pré-aquecido em banho-maria) e levados à estufa durante 30 minutos, à temperatura de 37°C. Em seguida, com o auxílio da pipeta Pasteur, foram efetuadas lavagens com PBS para a liberação dos linfócitos T da superfície das fibras. Os linfócitos B foram obtidos após agitação do cotonete em 7mL de meio enriquecido e posterior centrifugação a 600g, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os linfócitos B foram ressuspensos em meio enriquecido. A concentração dos linfócitos T e B foi acertada para 3×10^6 linfócitos/mL.

2.3 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS POR FLUOROBeads

2.3.1 Separação de linfócitos (T)

Em tubo de ensaio de 5mL foram adicionados 60µL de *fluorobeads-T* (*One Lambda, Inc.*, 2004) em 2mL de sangue periférico. Após homogeneização manual por 3 minutos foram adicionados 2mL de solução *Developer* (*One Lambda, Inc.*, 2004) e em seguida o sangue foi homogeneizado novamente. A seguir, o tubo de ensaio com o material biológico foi colocado em uma base magnética por 3 minutos, para separação dos linfócitos juntamente com as “*beads*” específicas para linfócitos T. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta Pasteur. Após 2 lavagens com 2mL de PBS o sobrenadante foi ressuspensão em 500µL de meio enriquecido com soro bovino fetal.

2.3.2 Separação de linfócitos (B)

Em um tubo de ensaio de 5mL, foram adicionados aproximadamente 2mL de camada leucocitária, obtida a partir da centrifugação por 10 minutos

a 800g de 10mL de sangue periférico e 4mL de PBS Citrato, (*One Lambda, Inc.*). Após adição de 100µL de *fluorobeads-B* (*One Lambda, Inc.*) e agitação manual da amostra por 3 minutos, esta foi colocada em um suporte magnético durante 2 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Após lavagens com PBS Citrato, as “*beads*” foram ressuspensas em 100µL de meio enriquecido com soro bovino fetal.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As provas cruzadas, realizadas através da reação de microinfocitotoxicidade, foram desenvolvidas em paralelo e com o mesmo material biológico, utilizando dois métodos de separação, diferenciação e coloração de linfócitos. A separação dos linfócitos totais a partir do sangue periférico foi desenvolvida pelo método de *ficoll-hypaque* (BELL; MATHESON; HO-YEN, 1990). A diferenciação dos linfócitos a partir desta separação foi realizada através do método não-específico, utilizando fibras de náilon (BOYUM, 1986). Ao final desta diferenciação foram obtidas as duas populações de linfócitos - T e B - necessárias para a realização da prova cruzada.

Através da reação de microinfocitotoxicidade foram realizadas 27 provas cruzadas com linfócitos T e 12 para linfócitos B utilizando o método de *ficoll-hypaque* para a separação de linfócitos totais, diferenciação destes linfócitos com fibras de náilon e posterior coloração com azul de tripan.

Conforme a Tabela 1, das 27 provas cruzadas realizadas, 24 apresentaram, ao final da reação, viabilidade linfocitária superior a 80%. Três reações apresentaram viabilidade inferior a 80%, sendo necessária a realização de nova separação de linfócitos através da obtenção de novo material biológico.

Tabela 1. Análise da viabilidade dos linfócitos T ao final da reação de microinfocitotoxicidade utilizando o método de *ficoll-hypaque* para a separação, fibras de náilon para a diferenciação e azul de tripan como corante das células mortas

Número de provas cruzadas realizadas pelo método de microinfocitotoxicidade (N=27)	Percentual da viabilidade celular dos linfócitos T separados pelo método de <i>ficoll-hypaque</i> e diferenciados pelas fibras de nylon
23	≥ 90%
1	85%
3	≤ 70%

Conforme mostra a Tabela 2, foram realizadas 12 provas cruzadas para linfócitos B utilizando o método de *ficoll-hypaque* para a separação de linfócitos totais, a diferenciação destes linfócitos

com fibras de nylon e posterior coloração com azul de tripan. Dentre estas provas, 7 apresentaram, ao final da reação, viabilidade igual ou superior a 80%. Cinco amostras apresentaram viabilidade inferior a 70%, impossibilitando a análise e interpretação da reação.

Tabela 2. Análise da viabilidade dos linfócitos B ao final da reação de microlinfocitotoxicidade utilizando o método de ficoll-hypaque para a separação, fibras de náilon para a diferenciação e azul de tripan como corante das células mortas.

Número de provas cruzadas realizadas pelo método de microlinfocitotoxicidade (N=12)	Percentual da viabilidade celular dos linfócitos B separados pelo método de ficoll-hypaque e diferenciados pelas fibras de nylon
2	90%
5	≥ 80%
5	≥ 80%

Conforme mostra a Tabela 3, foram realizadas 42 provas cruzadas utilizando o método de separação das células pelo método de *fluorobeads* e coloração com o corante *fluoroquent*. Dentre estas provas, 30 foram realizadas com linfócitos T e 12 com linfócitos B. Dentre as 42 provas cruzadas realizadas, 41 apresentaram percentual de viabilidade celular superior a 80%. Podemos ressaltar que, das 41 provas cruzadas, 37 tiveram percentual de viabilidade igual ou superior a 90%. Somente em uma prova cruzada foi observado um percentual de viabilidade celular inferior a 80%.

Tabela 3. Análise da viabilidade dos linfócitos T e B ao final da reação de microlinfocitotoxicidade utilizando o método de separação das células pelo método de fluorobeads e coloração com o corante fluoroquent.

População de linfócitos	Número de provas cruzadas realizadas pelo método de microlinfocitotoxicidade (N=42)	Percentual da viabilidade celular dos linfócitos B pelo método de separação <i>fluorobeads</i> e coloração com o corante <i>fluoroquent</i>
T	30	≥ 90%
B	7	≥ 90%
B	4	≥ 80%
B	1	≥ 80%

O método de microlinfocitotoxicidade celular dependente de complemento, utilizado para a realização das provas cruzadas, depende, entre outros fatores, de uma população de linfócitos com viabilidade celular adequada para a interpretação dos resultados (GARAVOY et

al., 1983; CHAPMAN et al., 1985; TALBOT et al., 1988). Na tentativa de aprimorar a obtenção de linfócitos para o desenvolvimento desta reação, propusemo-nos a melhorar a viabilidade destas células através de um estudo comparativo entre duas metodologias de separação, diferenciação e coloração de linfócitos.

A literatura é escassa no que se refere à utilização de diferentes metodologias para separação, diferenciação e coloração de linfócitos e sua utilização na reação de microlinfocitotoxicidade, e, justamente por esta razão, dispusemo-nos a relatar os resultados encontrados neste estudo, com o intuito de auxiliar os profissionais da área na escolha de uma metodologia adequada.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para a realização da prova cruzada, os linfócitos devem apresentar viabilidade, preferencialmente, igual ou superior a 80%. Devido aos períodos de incubação exigidos pela técnica de microlinfocitotoxicidade, os linfócitos podem sofrer, ao final da reação, alguma alteração em sua viabilidade celular, sugerindo uma escolha cuidadosa da metodologia a ser utilizada para a separação, diferenciação e coloração destas células.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a metodologia de diferenciação e coloração pelo método *fluorobeads/fluoroquent* respectivamente mostrou-se superior ao método de separação, diferenciação e coloração por *ficoll-hypaque*, fibras de náilon e azul de tripan respectivamente, pois, além de apresentar viabilidade superior tanto para linfócitos T como para linfócitos B, a leitura da reação e sua interpretação foi possível até 2 dias após a coloração dos linfócitos, sem afetar sua viabilidade.

REFERÊNCIAS

- ALTERMANN, W. W. et. al. Comparison of the established standart complement-dependent cytotoxicity and flow cytometric crossmatch assays with a novel ELISA-based HLA crossmatch procedure. **Histol Histopathol**, Spain, v. 21, n. 10, p. 1115-24, 21 Oct. 2006.
- AKALIN, E.; BROMBERG, J. S. Intravenous immunoglobulin induction treatment in flow cytometry cross-match-positive kidney transplant recipients. **Hum Immunol**. United States, v. 66, n. 4, p. 359, 2005.
- BELL T. A.; MATHESON B. A.; HO-YEN D. O. Improvements in complement fixation testing. **Med Lab Sci**., England, v. 47, n. 2, p. 138, 1990.
- BODMER, W. F.; BODMER, J. Cytofluorochromasia. In: RAY, J. G. et al. **Manual of tissue typing techniques**. United States (NIH): Dhew Publ., 1977. p. 31-34.

- BOLHUIS, R. L. et. al. Induction and blocking of histolysis in CD2+, CD3- NK and CD2+, CD3+ cytotoxic T lymphocytes via CD2 50 KD sheep erythrocyte receptor. **J. Immunol**, United States, v. 136, n. 11, p. 3939-44, Jun. 1986.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand. J. Lab. Clin. Invest.**, Norway, v. 97, n. 21, p. 77-89, 1986.
- _____. Separation of Leukocytes from Blood and Bone marrow. **Scand. J. Clin. Lab. Invest**, Norway, v. 97, n. 7, 1968.
- CHAPMAN, Jr. et. al. Analysis of flow cytometry and cytotoxicity crossmatches in renal transplantation. **Transplant Proc.**, United States, v. 17, p. 2480, 1985.
- DUQUESNOY, R. J. et. al. Multiscreen serum analysis of highly sensitized renal dialysis patients for antibodies toward public and private class I HLA determinants. Implications for computer-predicted acceptable and unacceptable donor mismatches in kidney transplantation. **Transplantation.**, United States, v. 50 n. 3. p. 427-37, Sep. 1990.
- FRÖLAND, S. Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T-lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, England, v. 1, p. 269-281, 1972.
- GARAVOY, M. R. et. al. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. **Transplant Proc.**, United States, v. 15, p. 1939, 1983.
- GEBEL, H. M.; BRAY, R. A. Sensitization and sensitivity: defining the unsensitized patient. **Transplantation**, United States, v. 69, n. 7, p. 1370, 2000.
- JONDAL, M.; HOLM, G.; WIGZELL, H. Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. **J. Exp. Med.**, United States, v. 136, n. 2, p. 207-215, 1 Aug. 1972.
- SEIGNALET, J.; MOURAD, G.; MION, C. Immunoabsorption in the sensitized transplant recipient. **Kidney Int.**, United States, v. 38, n. 2, p. 350-358, 1990.
- TALBOT, D. et al. The nature of donor-specific IgG isotypes identified by flow cytometry in the preoperative crossmatch. **Transplant Proc.**, United States, v. 20, n. 84, 1988.
- TERASAKI, P. I.; McCLELLAND, J. D. Micro droplet assay of human serum cytotoxins. **Nature**, London, v. 204, p. 998-1000, 1964.