

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E**  
**EXPERIMENTAL**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO**  
**DISCIPLINA TÉCNICAS BIOLÓGICAS EM PESQUISA**

Autores: Anna Claudia Cereja dos Santos  
Arla Adorno Scorzafava Gonçalves  
Caio Omori Pinheiro  
Cauê Cardeal Carbonara  
Gisele Mussato da Silva  
Renato Jimenez Gomez  
Maria Izabel Teixeira  
Zilmara Romero  
Yuri Souza Rodrigues

Professores: Elizabeth Cristina Perez Hurtado  
José Guilherme Xavier  
Leoni Villano Bnamin

**SÃO PAULO**  
**2025**

## Resumo

A disciplina Técnicas Biológicas em Pesquisa contempla aspectos teóricos e práticos das principais metodologias empregadas na pesquisa básica e translacional. O curso tem como objetivo capacitar os alunos para compreender, interpretar e discutir criticamente os principais ensaios laboratoriais descritos na literatura científica, promovendo o desenvolvimento de competências relacionadas ao planejamento experimental, análise de resultados e aplicação de técnicas biomédicas em diferentes áreas da pesquisa.

O presente documento, elaborado em formato de livro, constitui o trabalho de conclusão da disciplina e reúne a descrição detalhada dos fundamentos teóricos, aplicações experimentais, materiais, protocolos, recomendações técnicas, cuidados metodológicos e formas de interpretação dos resultados obtidos por metodologias amplamente utilizadas na rotina de laboratórios de pesquisa. Entre as técnicas abordadas destacam-se cultura celular, citometria de fluxo e ensaio imunoenzimático ELISA, ferramentas essenciais para investigação de processos biológicos, moleculares e celulares.

Além da descrição dos procedimentos experimentais, o material enfatiza aspectos relacionados à padronização metodológica, biossegurança, controle de qualidade e limitações técnicas, permitindo aos estudantes uma compreensão mais ampla sobre a execução e a reprodutibilidade dos experimentos científicos. Dessa forma, o conteúdo busca aproximar o conhecimento teórico da prática laboratorial, contribuindo para a formação acadêmica, científica e profissional dos discentes.

O material foi desenvolvido pelos próprios alunos a partir de informações obtidas em artigos científicos, protocolos experimentais e livros-texto atualizados, estimulando a busca ativa pelo conhecimento, a análise crítica da literatura científica e a integração entre ensino, pesquisa e prática experimental. Assim, este trabalho apresenta não apenas caráter didático, mas também relevância formativa para estudantes inseridos em atividades de pesquisa básica e aplicada.

**Palavras-chave:** técnicas de pesquisa; cultura celular; citometria de fluxo; ELISA; pesquisa básica.

## SUMÁRIO

<b>1. CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS.....</b>	<b>04</b>
1.1 Fundamento.....	04
1.2 Aplicações.....	05
1.3 Material e equipamentos.....	05
1.4 Passo-a-passo.....	06
1.5 Recomendações .....	07
1.6 Registro dos resultados.....	07
<b>2. VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....</b>	<b>08</b>
1.1 Fundamento.....	08
1.2 Aplicações.....	09
1.3 Material e equipamentos.....	09
1.4 Passo-a-passo.....	10
1.5 Recomendações .....	12
1.6 Registro dos resultados.....	12
<b>3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - TESTE ELISA.....</b>	<b>13</b>
3.1 Fundamento.....	13
3.2 Aplicações.....	16
3.3 Material e equipamentos.....	17
3.4 Passo-a-passo.....	18
3.5 Recomendações.....	19
3.6 Registro dos resultados.....	21
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>23</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>25</b>

# 1. CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS

## OBTENÇÃO E CULTURA DE CÉLULAS PERITONIAIS ADERENTES

Gonçalves AAS, Pinheiro COD, Gomez RJ

### 1.1 Fundamento

O início da cultura celular se dá no ano de 1882 quando Sydney Ringer desenvolveu uma solução salina simulando o ambiente fisiológico capaz de manter o funcionamento de células cardíacas de uma rã (YAO *et al.*, 2017). A fim de manter as células viáveis por mais tempo, no início do século XX, diversos cientistas modificaram e adaptaram a solução de Ringer, tendo como destaque: Ross G. Harrison, no qual manteve, durante semanas, o crescimento de fibras nervosas de um sapo em meio de fluido linfático da espécie adulta; Alexis Carrel, do qual, além de conceber um protótipo do frasco de cultura das células e a ideia da troca constante do meio, junto de Montrose T. Burrows, descobriram o plasma como o líquido ideal para a cultura de animais homeotérmicos; e Margaret R. Lewis e Warren H. Lewis, onde viram que a solução Locke-Lewis era mais eficaz para o cultivo de células embrionárias de galinha, pois eram suplementadas com aminoácidos, caldo e glicose (YAO *et al.*, 2017).

Quase cinquenta anos depois Harry Eagle desenvolve o meio essencial mínimo (MEM) – composto por soro dialisado, glicose, seis sais inorgânicos, 13 aminoácidos e oito vitaminas solúveis em água; e o *Roswell Park Memorial Institute* desenvolve o meio RPMI 1640 (YAO *et al.*, 2017), ambos servindo como base até os dias atuais para o cultivo de células de mamíferos *in vitro*.

Dentro da cultura celular existem dois tipos principais de origem de células. Células primárias se referem às células isoladas diretamente de um de tecido vivo (HARPER, 2024), tal como aconteceram nos primeiros experimentos da cultura celular. Elas diferem das células de linhagem – células de origem carcinogênicas, cultivadas em experimentos a partir de 1940, com destaque para o descobrimento e utilização das células HeLa de câncer cervical em 1951 – devido à sua incapacidade proliferativa ilimitada (YAO *et al.*, 2017). Entretanto, sua utilização ainda se dispõem de vantagens tais como a obtenção de dados (idade, sexo, histórico reprodutivo etc.) que podem ser incluídos na pesquisa experimental, além da preservação da

morfologia celular tal como ela é encontrada, essenciais para sua função normal esperada (HARPER, 2024).

As células aderentes peritoniais contém uma variedade de células imunológicas, incluindo macrófagos e os linfócitos B e T (RAY *et.al.*, 2010). E dentre os linfócitos B, o subgrupo de células B-1, caracterizada pela diferença ontogênica e comportamento distinto dos linfócitos B convencionais (células B-2), chega a ser até 70% da população desse tipo de célula imunológica (HERZENBERG, 2000).

## **1.2 Aplicações**

A cultura primária de células peritoneais aderentes de B-1 e macrófagos pode ser utilizada quando se pretende estudar o sistema imune inato, estudos experimentais e pré-clínicos para tratamento de doenças infecciosas, autoimunes, cânceres e diabetes, além de estudos envolvendo o metabolismo glicêmico.

## **1.3 Material e equipamentos**

Material:

- Agulhas e seringas estéreis (para lavagens peritoneais)
- Pipetas automáticas + ponteiros estéreis
- Pipetador e pipetas graduadas estéreis (2, 5, 10, 25 ml)
- Tubos cônicos de 15 ml e 50 ml estéreis
- Placas de cultura de 6 poços
- Câmara de Neubauer
- Meio de cultura RPMI
- Soro fetal bovino
- Antibióticos
- PBS estéril

- Solução de *Trypan Blue* (para contagem celular).

Equipamentos:

- Capela de biossegurança limpa e desinfectada (álcool 70% + 15 minutos de luz UV)
- Estufa calibrada (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, umidade controlada)
- Centrífuga (para recuperação de células e sobrenadantes)
- Microscópio invertido (monitoramento da cultura)
- Banho-maria (para aquecer meio a 37 °C)
- Equipamentos de proteção individual (jaleco, luvas, touca)

#### **1.4 Passo-a-passo**

1. A coleta das células deve ocorrer através de lavagens intraperitoneais de camundongos BALB/c utilizando 2 ml de meio RPMI;
2. Após a coleta, a suspensão celular deve estar na concentração de  $1 \times 10^6$  células/200  $\mu$ l, e a contagem deverá ser realizada utilizando, por exemplo, a câmara de Neubauer;
3. A suspensão celular na concentração correta deve ser distribuída em placas de cultura de seis poços;
4. A placa de cultura será incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 40 minutos;
5. Após a primeira incubação, as células não aderentes são descartadas, e adicionado meio R10 (meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino) à fração de células aderentes;
6. As células são mantidas em cultura nas mesmas condições de temperatura e ambiente durante cinco dias, sem renovação do meio;
7. Após os cinco dias, as células B-1 constituem o principal tipo células da fração não aderente, enquanto os macrófagos permanecem aderidos. Estas células são

recuperadas, centrifugadas e, se necessário, purificadas por *cell sorting* para utilização em ensaios experimentais (ALVARES-SARAIVA *et al.*, 2015; THIES *et al.*, 2013).

Figura 1 - Fluxograma de realização do protocolo de cultura primária de células aderentes peritoneais.



Fonte: Autoria própria imagens *BioRender*®

## 1.5 Recomendações

Utilizar apenas material estéril durante o lavado peritoneal e manutenção da cultura para evitar contaminação.

Durante o lavado peritoneal, manter o material cirúrgico mergulhado em um béquer com álcool 70°. Quando estiver com a pipeta Pasteur na cavidade, tomar cuidado para não romper o intestino, sempre manter a pipeta próxima à parede da cavidade peritoneal. Por ser uma camada fina, é possível visualizar os órgãos da cavidade.

A partir do 3º dia de cultura as células B-1 começam a ficar em suspensão no meio, portanto, quando realizar troca de meio, não descartar a parte suspensa e realizar lavagens com RPMI na garrafa para obter todas as células presentes.

## 1.6 Registro dos resultados

Os resultados da técnica podem ser registrados através Citometria de Fluxo para avaliação de viabilidade e fenótipo, assim como Microscopia Eletrônica de Transmissão ou Varredura para avaliação morfológica a depender do objetivo e finalidade do estudo. Na Citometria de Fluxo, as células B-1 são identificadas pelo fenótipo CD19<sup>+</sup> CD23<sup>-</sup>, e os macrófagos pelo fenótipo CD11b<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup>. A viabilidade celular pode ser analisada por citometria através dos corantes 7AAD e Anexina.

## **2. VIABILIDADE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dos Santos ACD, Carbonara CC, Avalo ZR

### **2.1 Fundamento**

A jornada da técnica de análise celular conhecida como citometria de fluxo é o resultado da convergência de diversas inovações que remontam a meados do século XX. Embora a ideia de analisar células em movimento remonte a propostas como a de Moldavan, em 1934, o desenvolvimento prático da citometria de fluxo moderna ganhou impulso significativo a partir de meados dos anos 1950 e 1960 (COSTA, 2022). O trabalho pioneiro de Wallace H. Coulter, que desenvolveu o princípio de contagem de células por resistência elétrica (o Princípio Coulter), e as contribuições cruciais de pesquisadores como Mack J. Fulwyler e Leonard A. Herzenberg foram fundamentais, Fulwyler combinou a contagem eletrônica com a tecnologia de separação por jato de tinta, criando o primeiro aparelho capaz de separar células, enquanto Herzenberg, em 1972, cunhou o termo FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) e impulsionou o uso de anticorpos ligados a fluoróforos, pavimentando o caminho para a análise multiparamétrica que conhecemos hoje (FIOCRUZ, 2024).

No Brasil, a história teve início em 1988 com a instalação do primeiro equipamento no Rio de Janeiro, a demanda cresceu fortemente a partir de 1992, principalmente no diagnóstico de HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e em doenças hematopoiéticas (FIOCRUZ, 2024).

Atualmente, novas frentes vêm sendo exploradas, como citometria com imagem espectral e nanométrica, permitindo análises mais versáteis e detalhadas,

inclusive de partículas muito pequenas, como vírus e vesículas extracelulares (COSTA, 2022).

## 2.2 Aplicações

A citometria de fluxo é uma técnica analítica poderosa e de alta precisão que revolucionou a biologia celular, imunologia, medicina e microbiologia (FIOCRUZ, 2024). Ela permite a análise rápida e quantitativa de milhões de células ou partículas em suspensão (COSTA, 2022). O princípio básico é que as células são marcadas com fluorocromos (moléculas fluorescentes) que se ligam a componentes específicos da célula, como proteínas de superfície, DNA ou RNA, essas células marcadas são, então, direcionadas em uma única linha através de um feixe de laser (COSTA, 2022).

Quando o laser atinge uma célula, a luz é dispersa em diferentes direções e os fluorocromos vibrantes emitem luz em comprimentos de onda específicos, assim, os detectores do citômetro de fluxo capturam tanto a luz dispersa quanto a emitida (COSTA, 2022). A análise desses sinais fornece informações detalhadas sobre as características de cada célula, como:

- ✓ Tamanho e granularidade (complexidade interna): A luz dispersa em direção frontal (FSC - forward scatter) é proporcional ao tamanho da célula, enquanto a luz dispersa lateralmente (SSC - side scatter) reflete a granularidade e a complexidade interna.
- ✓ Expressão de proteínas ou antígenos: A intensidade da fluorescência emitida por um fluorocromo específico indica a quantidade de uma proteína ou antígeno presente na superfície ou no interior da célula.
- ✓ Viabilidade celular: Testes de viabilidade permitem distinguir células vivas de células mortas, pois o corante só penetra nas células com a membrana danificada.
- ✓ Análise do ciclo celular: Corantes de DNA são usados para quantificar a quantidade de DNA em cada célula, permitindo a análise das diferentes fases do ciclo celular.

## 2.3 Material e equipamentos

Este protocolo baseia-se na utilização de corantes de exclusão Iodeto de Propídio (PI) ou 7-AAD. Estes corantes fluorescentes interagem com o DNA, mas, devido às suas propriedades, não conseguem atravessar membranas celulares íntegras (característica de células viáveis). Apenas células com a membrana comprometida (células mortas ou em apoptose tardia) permitem a entrada do corante, que se liga ao DNA, tornando-se fluorescentes. Será necessário:

- Amostra de suspensão celular em concentração conhecida ( $1 \times 10^6$  células/ml).
- Tampão de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) frio.
- Iodeto de Propídio (ex: 1 mg/ml) requer manuseamento cuidadoso e proteção da luz.
- 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) pode ser utilizado em alternativa ao PI e também requer proteção da luz.
- Tubos de Citometria como tubos de polipropileno (ex: 5 ml, 12x75 mm).
- Meio de Cultura para neutralizar enzimas, se aplicável (ex: tripsina).

## 2.4 Passo-a-passo

### 1. Preparação da Amostra

- Células Aderentes: Retire o meio, lave com PBS e tripsinize as células. Neutralize com meio completo.
- Células em Suspensão: Transfira para um tubo de centrífuga.
- Lavagem: Centrifugue a suspensão celular e descarte o sobrenadante.
- Ressuspenda o *pellet* em PBS.
- Conte as células no hemocítmetro.
- Ajuste a concentração desejada de células por tubo.
- Distribua 1 ml da suspensão celular (contendo células) nos tubos de citometria.

### 2. Adição do Corante

- Adicione a concentração de PI ou 7-AAD otimizada para o seu ensaio (geralmente 1–5 g/ml) a todos os tubos (Controle Positivo e Amostras).
- Adicione o corante o mais próximo possível do momento da aquisição (máximo

15 minutos antes).

- Incube por 5-10 minutos no escuro.

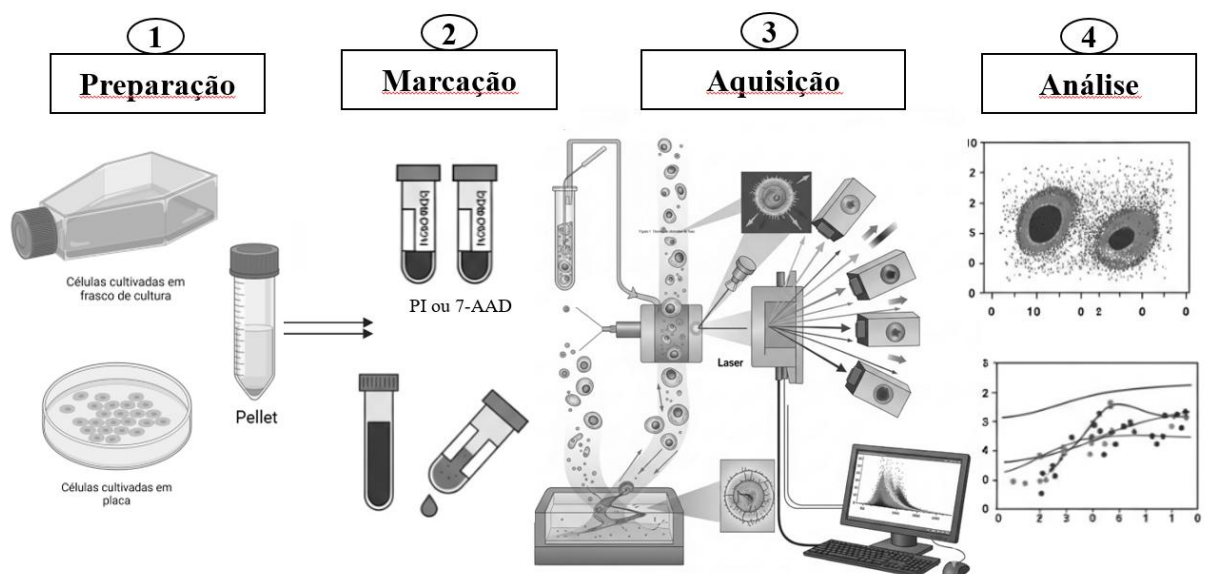
### 3. Aquisição

- Passe as amostras no citômetro de fluxo imediatamente após a incubação.
- Parâmetros: PI: Detectado no canal FL2 (ou equivalente). 7-AAD: Detectado no canal FL3 (ou equivalente).
- Utilize o Controle Positivo para ajustar a voltagem (ganho) de forma que a população positiva para o corante fique claramente separada da população negativa.

### 4. Análise de Dados:

- Gate de Viabilidade: Crie um histograma ou um gráfico de pontos do canal de fluorescência (PI/7-AAD) vs. contagem (ou FSC-A).
- Células Viáveis: Serão negativas para o corante.
- Células Não Viáveis (Mortas): Serão positivas para o corante (alta fluorescência).
- A porcentagem de viabilidade celular é dada pela porcentagem de células negativas para o corante na sua população total de interesse.

Figura 2 - Viabilidade celular por citometria de fluxo



Fonte: Autoria própria imagens *BioRender*®

## Dicas essenciais para o sucesso

- Proteção da Luz: O PI e o 7-AAD são sensíveis à luz. Mantenha as amostras e os corantes no escuro o tempo todo.
- Tempo: A incubação com o corante deve ser breve. Se as células ficarem no corante por muito tempo, pode começar a haver captação por células viáveis, resultando em dados falsos.
- Corantes Múltiplos: Se realizar imunofenotipagem, por exemplo, o PI/7-AAD deve ser sempre o último reagente a ser adicionado, após a marcação com os anticorpos.

## 2.5 Recomendações

Trata-se de uma técnica fundamental em diversas áreas, desde a contagem de células sanguíneas e o diagnóstico de leucemias e linfomas até a pesquisa em imunologia, onde é usada para identificar e quantificar diferentes subpopulações de células imunes. Sua capacidade de analisar múltiplas características celulares simultaneamente a torna uma ferramenta indispensável para a pesquisa e o diagnóstico modernos (COSTA, 2022).

O objetivo da técnica é traduzir as características físicas e biológicas das células em dados quantitativos e gráficos, fornecendo informações precisas para estudos e desenvolvimento de novas terapias (COSTA, 2022).

## 2.6 Registro dos resultados

- A análise dos dados ocorre em modo de lista usando o software apropriado.
- Siga as instruções do software para adquirir os dados das amostras e dos controles de processo.
- Verifique se os valores dos controles de processo estão dentro dos intervalos esperados.
- Os dados são registrados no software após a aquisição, e o processo inclui a criação de painéis para a análise e a geração de relatórios.

## ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - TESTE ELISA

Da Silva GM, Da Silva MIT e Rodrigues YS

### 3.1 Fundamento

O teste ELISA que significa do inglês: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Esta técnica usa conjugados marcados com enzimas e substratos enzimáticos que geram mudanças de cor (AYDIN, 2015). Trata-se de um teste bioquímico imunológico utilizado para identificar e quantificar anticorpos, antígenos, peptídeos, proteínas, glicoproteínas e hormônios em amostras biológicas (AYDIN, 2015).

Embora as técnicas ELISA e radioimunoensaio (RIA) tenham suas raízes em um princípio básico desde 1941, o método RIA foi aplicado pela primeira vez por *Yalow e Berson* nos anos 1960, com o intuito de medir os níveis de insulina endógena no plasma. Simultaneamente, o ELISA foi desenvolvido por duas equipes de pesquisa, sendo amplamente creditado aos cientistas suíços *Engvall e Perlmann*, que faleceram em 2005. Eles introduziram o método ELISA em 1971 ao modificar a técnica RIA. Em termos simples, a inovação consistiu em substituir os radioisótopos marcados em RIA por enzimas ao invés de iodo radioativo <sup>125</sup>I para criar um método imunológico. Essa nova abordagem foi utilizada para mensurar os níveis de IgG no soro de coelhos. No mesmo ano, outra equipe foi capaz de quantificar a gonadotrofina coriônica humana na urina utilizando a enzima peroxidase de rábano com o método EIA, e solicitaram patentes nos EUA e na Europa (PEREIRA FILHO, 2023).

Após o surgimento do ELISA, diversos pesquisadores o aplicaram: *Carlson* e colaboradores em 1972, *Holmgren e Svennerholm* no campo da microbiologia diagnóstica em 1973, *Ljungstrom* e sua equipe para detectar triquinose em parasitologia em 1974, e *Voller* e outros para diagnosticar malária em 1975. Também em 1978, 1979 e 1981, *Bishai e Galli*, *Leinikki e Ukkonen*, respectivamente, utilizaram o método ELISA para identificar infecções por vírus influenza, parainfluenza e caxumba. Em 1980, *Siegle* e sua equipe adaptaram o teste ELISA e incorporaram placas de microtitulação para determinar as concentrações de diversos hormônios,

peptídeos e proteínas. Com o tempo, esse método, que passou a ser aplicado em várias áreas, se consolidou como uma técnica rotineiramente utilizada em laboratórios de pesquisa e diagnóstico ao redor do mundo (PEREIRA FILHO, 2023).

O teste ELISA se baseia na detecção de moléculas, sejam elas antígenos ou anticorpos, por meio de reações que envolvem enzimas. A análise geralmente ocorre em uma placa de microtitulação revestida com antígenos específicos, que se ligam aos anticorpos desejados através de uma série de etapas: começando pela sensibilização da placa com o antígeno, seguida pelo bloqueio das áreas não ocupadas usando proteínas não reativas, como albumina ou caseína derivada do leite. Após esse processo, realiza-se uma lavagem com PBS e *Tween 20* para remover o excesso do bloqueio, após esse processo o soro contendo o anticorpo é incubado. Se o soro for de um paciente positivo para a doença em questão, ele conterá anticorpos que se ligarão ao antígeno; caso contrário, não haverá anticorpos suficientes para essa ligação e, conseqüentemente, a reação de revelação não ocorrerá. Após outra lavagem com PBS e *Tween 20*, realiza-se a incubação com um anticorpo secundário que está ligado a uma enzima (por exemplo, peroxidase ou fosfatase alcalina). Após mais uma lavagem com PBS e *Tween 20*, acontece a incubação com o substrato (OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + Solução Citrato). Dependendo da enzima associada ao anticorpo secundário e do substrato utilizado, a reação final poderá apresentar cores como verde, laranja ou azul (PEREIRA FILHO, 2023).

O teste ELISA pode ser classificado em quatro formatos principais: ELISA direto, ELISA indireto, ELISA em sanduíche e ELISA competitivo (AYDIN, 2015).

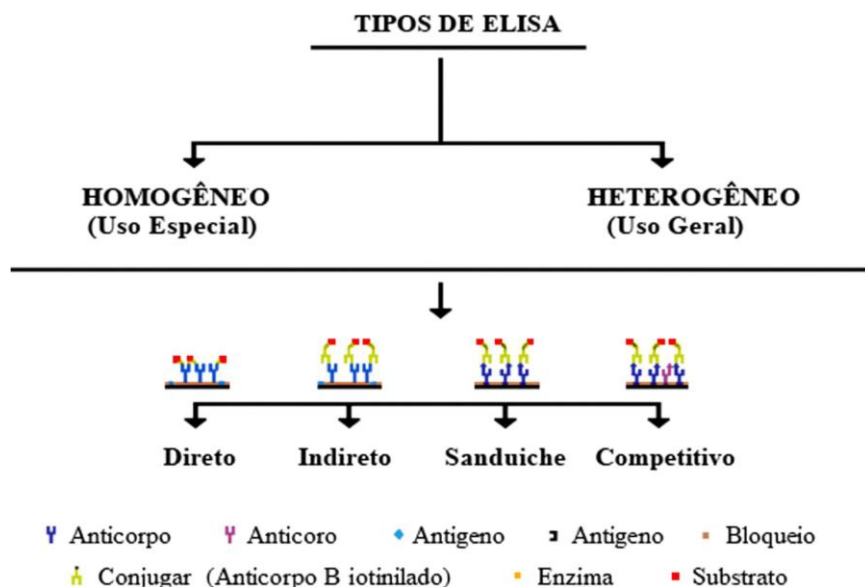
- ELISA direto: A superfície da placa é revestida diretamente com o anticorpo ou antígeno. Um anticorpo ou antígeno marcado com enzima é usado para a medição. Após a incubação, ocorre uma lavagem para remover antígenos ou anticorpos não ligados. Em seguida, um substrato é adicionado para gerar uma coloração, que é medida para determinar a quantidade de antígeno ou anticorpo (AYDIN, 2015).

- ELISA indireto: O antígeno é revestido na placa. O soro é adicionado, formando um complexo antígeno-anticorpo. Um anticorpo secundário marcado com enzima, que reconhece o anticorpo primário, é adicionado. Após a adição do substrato, ocorre a coloração, indicando a concentração do antígeno (AYDIN, 2015).

- ELISA em sanduíche: A placa é revestida com um anticorpo de captura. O antígeno é adicionado e ligado ao anticorpo. Após a lavagem, um anticorpo secundário marcado com enzima é adicionado. O substrato é então adicionado, gerando coloração. A presença de coloração indica um resultado positivo (AYDIN, 2015).

- ELISA competitivo: A superfície da placa é revestida com um anticorpo específico para o antígeno ou vice-versa. O antígeno ou anticorpo da amostra compete com um antígeno ou anticorpo marcado com enzima para se ligar ao anticorpo ou antígeno na placa (AYDIN, 2015).

Figura 1 - Tipos de Elisa.



Fonte: AYDIN et al 2015.

AYDIN et al. (2025) destaca como principais vantagens no teste de ELISA:

- Alta Sensibilidade e Especificidade: Capaz de detectar concentrações muito baixas de substâncias, como 1 pg/ml;
- Procedimento Simples e Direto: Fácil de realizar, com instrumentos amplamente disponíveis em laboratórios.
- Custo Acessível: Reagentes de baixo custo e longa vida útil;
- Versatilidade: Pode medir hormônios, peptídeos e outras moléculas em fluidos biológicos como soro, plasma, saliva e extratos celulares;

- Ampla Aplicação: Usado para detectar infecções, incluindo COVID-19, e monitorar doenças endócrinas, metabólicas, cardiovasculares e microbiológicas;
  - Avanços Tecnológicos: Métodos como ELISA digital e ELISA com amplificação por thio-NAD aumentam a sensibilidade, permitindo a detecção de concentrações extremamente baixas;
- AYDIN et al. (2025) também destaca como desvantagens:
- Efeito Gancho (*Hook Effect*): Pode levar a resultados falsamente baixos em altas concentrações de analitos;
  - Limitações de Sensibilidade: O formato direto do ELISA é menos sensível em comparação com os formatos indireto ou sanduíche;
  - Disponibilidade de Anticorpos: Requer anticorpos específicos e de alta qualidade, que podem ser difíceis de obter para certos antígenos;
  - Detecção de Análises Únicas: Não é adequado para multiplexação (detecção de múltiplos antígenos simultaneamente);
  - Ruído de Fundo: Ligação não específica pode gerar sinais de fundo, reduzindo a precisão;
  - Faixa Dinâmica Restrita: Menor faixa linear para quantificação em comparação com outros formatos;
  - Reatividade Cruzada: Pode levar a resultados falsos positivos devido à interação com antígenos relacionados;
  - Consumo de Tempo: Requer múltiplas etapas de incubação e lavagem, tornando-o menos prático para configurações de alto rendimento;
  - Variação nos tipos de kit: As amostras de ELISA podem ter 96 como pode não ter 96 poços, depende de cada kit de ELISA – se o kit é fornecido em placa, se atentar em usar a placa inteira deixar claro que o kit, depende do fornecedor, as vezes o fornecedor fornece a placa já com a sensibilização (já com os anticorpos).

### **3.2 Aplicações**

Na atualidade, os métodos de ELISA são muito usados no diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças, entre elas as de origem endócrina, metabólica, cardiovascular e microbiológica. Ela é de uma das técnicas mais sensíveis para a detecção de substâncias como peptídeos, proteínas e hormônios, tendo a

capacidade de identificar concentrações extremamente baixas, na faixa de 5 a 10 pg/ml (AYDIN, 2015).

### **3.3 Material e equipamentos**

Para garantir a execução adequada do ELISA, segundo (AYDIN, 2015). são necessários certos tipos de materiais e equipamentos.

Material:

- Pipetas automáticas (10, 100, 1000  $\mu$ L)
- Tubos para coleta de material biológico
- Papel seco,
- Vortex
- Frascos (50–500 mL),
- Tubos eppendorf,
- Pipeta multicanal (50–100  $\mu$ L)
- Reservatório de solução,
- Buffers,
- Selador de placa de acetato
- Diagrama de ensaio,
- Placa imunológica de 96 poços.
- Água destilada,
- Selador de placa
- Amostra
- Inibidor de protease
- Solução de HCl 2N
- Peptídeo biotilado
- Tampão de ensaio concentrado
- Peptídeo padrão, controle positivo
- Streptavidina-peroxidase de rábano (HRP)
- Solução substrato (TMB)

Equipamentos:

- Leitor de microplacas ELISA,
- Lavadora e impressora

- Banho-maria
- Incubadora
- Agitador de placas

### **3.4 Passo-a-passo**

1. Sensibilização: a sensibilização da placa é feita com o objetivo de imobilizar o antígeno, em alguns kits de ELISA não há a necessidade de fazer essa etapa pois a placa já vem sensibilizada com antígeno, vai depender do fornecedor da placa. Na ELISA convencional essa sensibilização acontece para a placa receber o antígeno ou anticorpo e ele ficar grudado no fundo da placa, o tempo para a sensibilização vai de 30 minutos a 2 horas.

2. Bloqueio: consiste em fazer um bloqueio dos espaços livres da placa, que consiste em adicionar uma proteína inerte (albumina sérica bovina), também chamada de BSA. Isso é feito para cobrir as partes da placa, evitando uma ligação não esperada.

3. Adição da amostra: consiste em adicionar nossa amostra (soro, plasma, saliva entre outros) que contém a molécula que queremos encontrar. O processo consiste em diluir o antígeno ou anticorpo em uma solução tampão, ligando e ficando grudada a placa.

4. Lavagem: esse passo consiste em fazer uma lavagem para remover toda a solução que não grudou na placa, deixando apenas as que houve ligação, essa lavagem é feita com um tampão de fosfato salino (PBS) e esse passo pode se repetir várias vezes ao longo da técnica de ELISA.

5. Adição do anticorpo de detecção: consiste em adicionar a amostra um anticorpo de detecção. Esse anticorpo está marcado por uma enzima específica, esse anticorpo vai se conectar a amostra que ficou presa na placa formando um complexo.

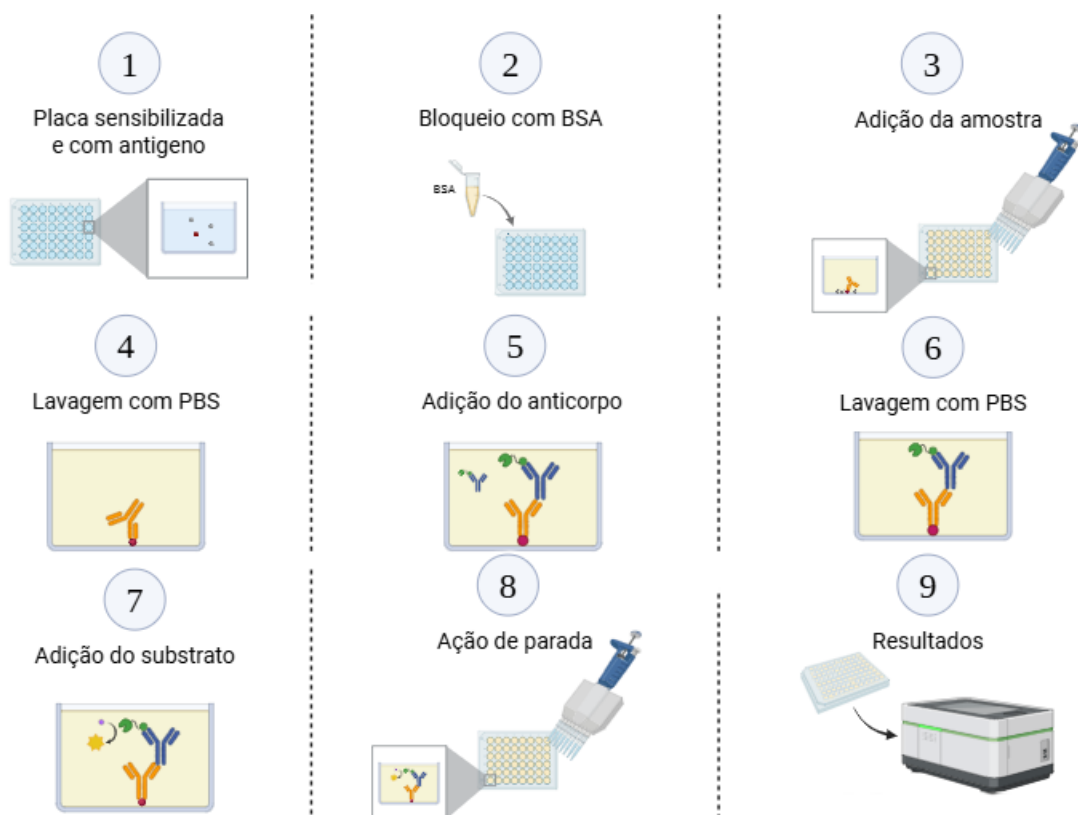
6. Lavagem: consiste em fazer novamente uma lavagem com PBS igual ao passo quatro, essa lavagem serve para eliminar os anticorpos que não se ligaram a solução que já estava na placa, mantendo somente os anticorpos que se ligaram com a substância da placa e formaram o complexo.

7. Adição do substrato: consiste em colocar um substrato incolor (normalmente peroxidase de raiz forte, chamado de HRP), esse substrato se liga a enzima formando uma cor e podendo identificar a ligação e por consequência o que está se procurando com essa técnica de ELISA.

8. Ação de parada: consiste em parar a reação, entre o substrato incolor e a enzima, esse processo é feito para que a cor não continue mudando, podendo dessa forma fazer uma leitura e ter um resultado de forma estável.

9. Resultados: consiste em avaliar o resultado obtido, esse resultado é avaliado pela cor final ao qual quem faz a leitura dessa cor é um aparelho chamado espectrofotômetro, a intensidade e mancha da cor identifica a quantidade e o tipo de célula na amostra.

Figura 2 - Fluxograma da técnica de ELISA.



Fonte: Autoria própria imagens *BioRender*®

### 3.5 Recomendações

De acordo com BORGES, DERMARCOS & HATANAKA, 2022. para garantir a precisão e a confiabilidade dos testes ELISA é fundamental que parâmetros claros de qualidade e controles rigorosos sejam implementados.

- Parâmetros de Qualidade:

- Seleção e estabilidade dos reagentes: é essencial que todos os reagentes, como anticorpos, enzimas, substratos e soluções disponíveis, estejam dentro

do prazo de validade e em condições ideais de conservação (pH estável conforme orientações do fabricante);

- Integridade das amostras: as amostras devem ser corretamente armazenadas e manuseadas para evitar degradação ou contaminação, o que pode comprometer significativamente os resultados do teste;
  - Temperatura e tempo de incubação: cada etapa do teste deve respeitar rigorosamente os parâmetros de tempo e temperatura definidos pelo fabricante ou protocolo validado. Pequenas variações podem gerar resultados falsos positivos/negativos;
  - Lavagem das placas: é um passo crítico na execução do ensaio e desempenha um papel fundamental na obtenção de resultados confiáveis e precisos. Esta etapa é essencial para remover resíduos de reagentes não ligados e não específicos, bem como para reduzir a possibilidade de resultados falsos positivos ou falsos negativos. Alguns dos problemas mais comuns incluem:  
Contaminação cruzada: Se as placas não forem lavadas adequadamente entre cada etapa do ensaio, pode ocorrer contaminação cruzada entre as amostras, levando a resultados imprecisos. Adsorção não específica: Resíduos de reagentes não ligados podem ficar presos à superfície das placas, resultando em adsorção não específica de moléculas durante a etapa de detecção. Isso pode levar a resultados falsos positivos ou negativos, comprometendo a interpretação dos resultados. Ruído de fundo elevado: A presença de resíduos não ligados pode aumentar o ruído de fundo do ensaio, reduzindo a sensibilidade e a especificidade do mesmo. Variação nos resultados: A falta de lavagem adequada pode resultar em variação nos resultados entre diferentes corridas do ensaio, dificultando a comparação entre amostras e a reprodução dos resultados.
- Boas Práticas e Padronização:
- Seguir rigorosamente protocolos validados e recomendações de órgãos reguladores como a Anvisa e normas internacionais atualizadas;
  - Documentar todos os controles, padrões utilizados, lotes de reagentes e desvios ocorridos no ensaio de rastreabilidade e segurança laboratorial;

- Realizar treinamentos e verificações periódicas das condições dos equipamentos e competência técnica da equipe envolvida (PEREIRA FILHO, 2023).

### 3.6 Registro dos resultados

Após a execução do ensaio, a leitura da placa gera valores de absorvância (OD, densidade óptica) para cada poço. A interpretação dos resultados do teste ELISA se baseia na comparação entre as leituras de absorvância das amostras e curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas. Primeiramente verificam se os controles (branco, negativo e positivo) que servem como indicadores de qualidade do ensaio (NUMMER, 2018).

- Controle branco (Blank): deve apresentar OD próxima de zero ( $<0,15$ ). Valores altos indicam problemas no bloqueio, contaminação ou substrato;
- Controle negativo: deve ter OD baixa, semelhante ao branco. Caso esteja elevado, sugere reação inespecífica;
- Controle positivo: deve ter OD elevada e previsível. Caso esteja baixa o ensaio pode ter falhado (anticorpos vencidos, substrato degradado, tempo de incubação inadequado)

Em seguida, analisam se as replicatas para confirmar a reprodutibilidade. A curva padrão, ajustada por regressão logística (4PL/5PL), fornece a base para o cálculo da concentração das amostras. ou seja, uma série de diluições sucessivas de uma amostra com concentração conhecida — para possibilitar a análise quantitativa dos resultados.

As amostras fora da faixa devem ser diluídas e testadas novamente. Para aceitação do ensaio, exige se curva padrão com  $R^2 \geq 0,99$ , controles dentro do intervalo de  $\pm 20\%$  e CV% 15%. (NUMMER,2018).

- Curva de Absorvância: A curva de absorvância do teste ELISA relaciona a concentração da substância de interesse com a intensidade da cor gerada na reação, medida pela absorvância. A partir da curva padrão, que é construída com soluções de concentrações conhecidas, obtém-se uma equação linear da forma  $Y = mX + b$ , onde:

Y - absorvância (valor medido);

X - concentração (valor que queremos determinar);

m - inclinação da reta (slope);

b - intercepto no eixo Y (absorvância quando a concentração é zero).

Para determinar a concentração de amostras desconhecidas, mede-se a absorvância média (Y) e utiliza-se a fórmula  $X = (Y - b) / m$ , que permite converter a absorvância em concentração.

Exemplo:

Dados do padrão: 0, 10, 20, 40, 80, 160 ng/mL com absorvâncias 0,05; 0,17; 0,31; 0,59; 1,06; 1,90 (450 nm).

Equação da reta (ajuste linear encontrada):  $Y = 0,0116 X + 0,081$

Coefficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,9968 (excelente linearidade na faixa analisada).

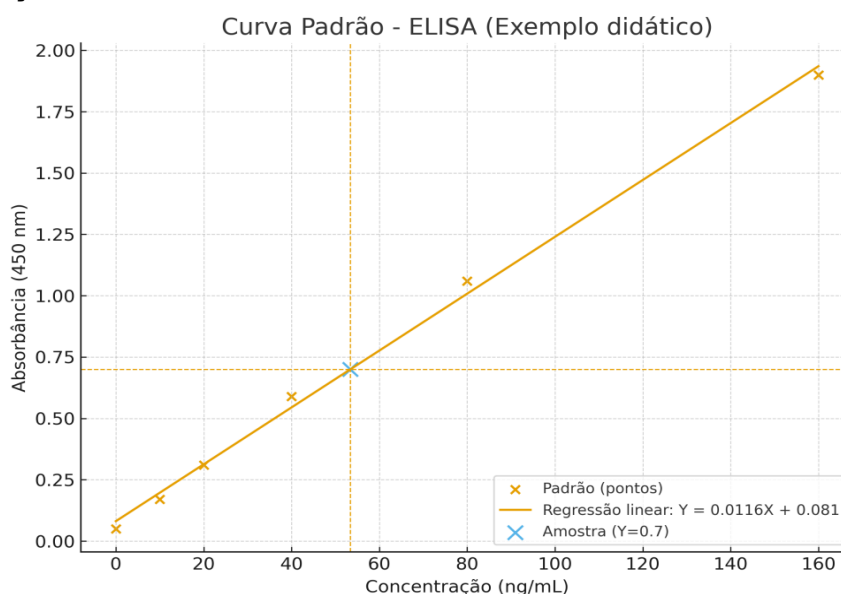
Absorvância da amostra (medida):  $Y = 0,70$  (média de triplicatas).

Cálculo da concentração (inversão da equação):

$$X = (Y - b) / m = (0,70 - 0,081) / 0,0116 = 53,39 \text{ ng/mL}$$

Portanto, a concentração estimada da amostra é  $\approx 53,4 \text{ ng/mL}$ .

**Figura 3:** Curva padrão de absorvância do ensaio ELISA (0–160 ng/mL). Pontos representam as diluições do padrão; a reta é o ajuste linear obtido por regressão ( $Y = 0,0116X + 0,081$ ;  $R^2 = 0,9968$ ). A cruz marca a amostra desconhecida (absorvância média = 0,70), cuja concentração calculada foi aproximadamente 53,4 ng/mL. Linhas tracejadas indicam projeção da absorvância até a curva e correspondência na escala de concentração.



Fonte: Autoria própria.

## REFERÊNCIAS

ALVARES-SARAIVA AM, NOVO MC, DE OLIVEIRA VC, MARICATO JT, LOPES JD, POPI AF, MARIANO M. B-1 cells produce insulin and abrogate experimental streptozotocin-induced diabetes. **Eur J Immunol**. 2015 May;45(5):1452-61. doi: 10.1002/eji.201445409. Epub 2015 Apr 17. PMID: 25688546.

HARPER JM. Primary Cell Culture as a Model System for Evolutionary Molecular Physiology. **Int J Mol Sci**. 2024 Jul 19;25(14):7905. doi: 10.3390/ijms25147905. PMID: 39063147; PMCID: PMC11277064.

HERZENBERG LA. B-1 cells: the lineage question revisited. **Immunol Rev**. 2000 Jun;175:9-22. PMID: 10933587.

RAY A, DITTEL BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. **J Vis Exp**. 2010 Jan 28;(35):1488. doi: 10.3791/1488. PMID: 20110936; PMCID: PMC3152216.

THIES FG, LAURINDO MF, PEREZ EC, NOVAES E BRITO RR, MARIANO M, POPI AF. Cross talk between peritoneal macrophages and B-1 cells in vitro. **PLoS One**. 2013 May 8;8(5):e62805. doi: 10.1371/journal.pone.0062805. PMID: 23667522; PMCID: PMC3648527.

YAO T, ASAYAMA Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reprod Med Biol**. 2017 Mar 21;16(2):99-117. doi: 10.1002/rmb2.12024. PMID: 29259457; PMCID: PMC5661806.

COSTA, RN. Introdução à Citometria de Fluxo. Um manual para iniciantes. Ministério da Saúde. Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Citometria De Fluxo: Fundamentos e Aplicações na Pesquisa Científica. Rio de Janeiro, 2024.

AYDIN S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**. 2015 Oct;72:4-15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25908411.

BORGES L, DERMARGOS A, HATANAKA E. Considerações técnicas bioanalíticas para detecção e quantificação de citocinas em ensaios ELISA. **Citocina**, v. 151, p. 155615, 2022.

PEREIRA FILHO AA. ELISA: definição, variações e protocolos práticos. **Ampla Editora**, 2023.

SINGH M, BHOGE RK, RANDHAWA G. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Endogenous Sad1 Gene in Cotton: An Internal Control for Rapid Onsite GMO Testing. **J AOAC Int.** 2018 Sep 1;101(5):1657-1660. doi: 10.5740/jaoacint.18-0016. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29678222.

**ANEXO**

**Turma Disciplina Técnicas biológica em Pesquisa**

**2025**

