

CITOMETRIA DE MASSAS, CYTOF, E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DO SARS-COV-2



Marco Lapa, PhD

*Especialista de Produto e Aplicação
Pensabio Biotecnologia*

CENÁRIO GLOBAL COVID-19

6.217.949
Infectados

373.032
Mortes

2.637.496
RECUPERADOS

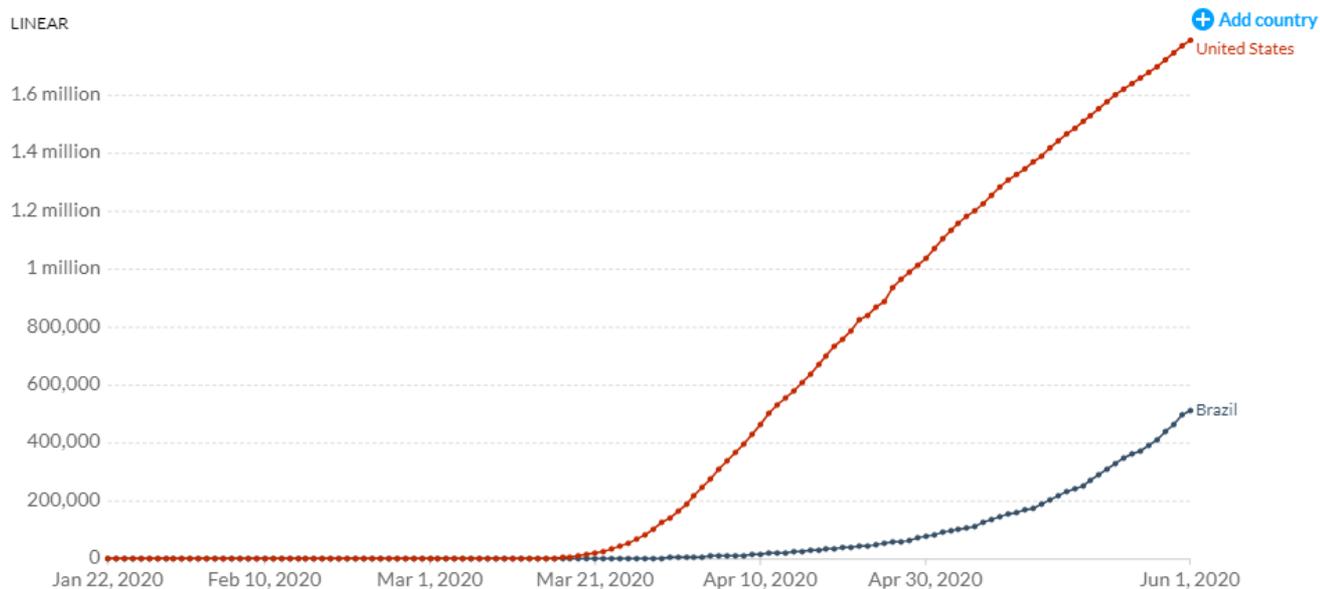


Our World
in Data

Total confirmed COVID-19 cases

The number of confirmed cases is lower than the number of total cases. The main reason for this is limited testing.

LINEAR



Source: European CDC - Situation Update Worldwide - Last updated 1st June, 10:45 (London time)

OurWorldInData.org/coronavirus • CC BY

CENÁRIO GLOBAL COVID-19

6.217.949
Infectados

373.032
Mortes

2.637.496
RECUPERADOS

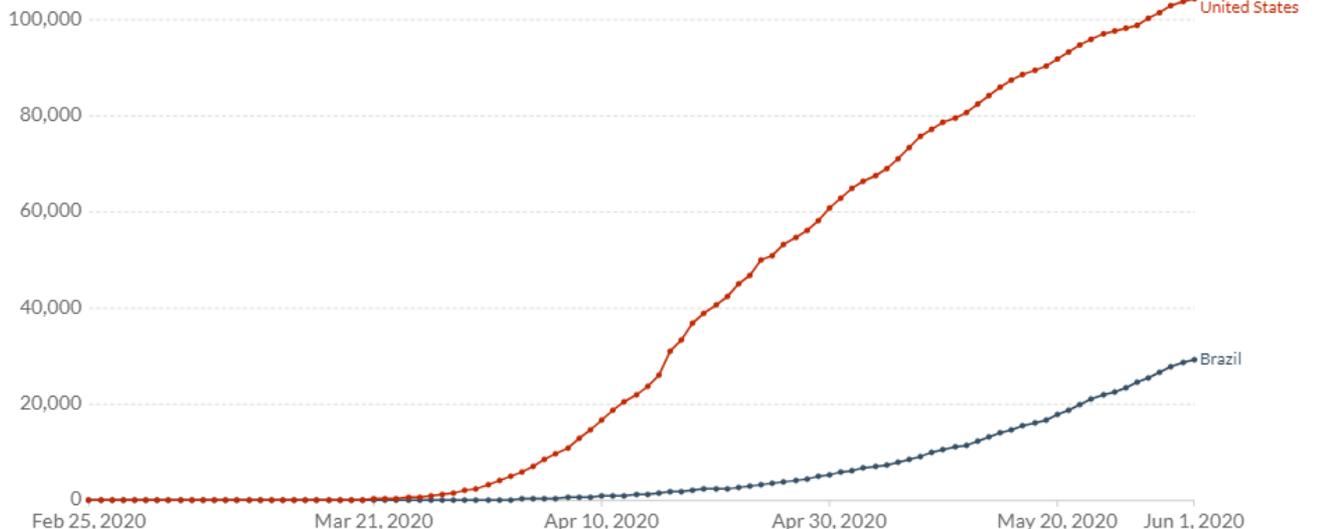


Our World
in Data

Total confirmed COVID-19 deaths

Limited testing and challenges in the attribution of the cause of death means that the number of confirmed deaths may not be an accurate count of the true number of deaths from COVID-19.

LINEAR



Source: European CDC - Situation Update Worldwide - Last updated 1st June, 10:45 (London time)

OurWorldInData.org/coronavirus • CC BY

O QUE PODE DIFERENCIAR O DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ENTRE DIFERENTES INDIVÍDUOS?

De acordo com a OMS, o maior risco é:

- Idosos (60+ anos)
- Pressão alta
- Problemas cardíacos
- Problemas pulmonares
- Diabetes
- Câncer
- Obesidade

No entanto, qualquer pessoa pode pegar a COVID-19 e ficar gravemente doente.

ESTRATÉGIA DE ANÁLISE POR PERFIL IMUNOLÓGICO

A análise de como estaria o perfil das células de defesa do organismo de um paciente pode direcionar ações e tratamentos clínicos, assim como ajudar a entender o ponto da evolução de uma doença em que o paciente se encontra.

O conceito de traçar o perfil imunofenotípico de pacientes com doenças causadas por vírus como o HTLV (vírus linfotrópico de células T humana) ou diferentes tipos de câncer não é novo.

ASSOCIAÇÃO ENTRE O PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DO CÂNCER DE MAMA E O ESTADO DO LINFONODO SENTINELA

Brunella Flores Pupo, Jéssica Giachini Goffi, Patrick Luiz Amboni Canela, Kristian Madeira, Diogo Vinicius de Melo Destro

Review > Clin Lab Med. 2017 Dec;37(4):753-769. doi: 10.1016/j.cll.2017.07.003.

Epub 2017 Aug 31.

Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometric Analysis

Xueyan Chen¹, Sindhu Cherian²

Use of flow cytometry to evaluate the immunophenotypic profile of patients with chronic lymphocytic leukemia

Maria Cleide A. Lopes

ESTRATÉGIA DE ANÁLISE POR PERFIL IMUNOLÓGICO

Este conceito já foi proposto para caracterizar o perfil imunológico humano, antes, durante e depois de diversas doenças.

Review > Nat Rev Immunol. 2012 Feb 17;12(3):191-200. doi: 10.1038/nri3158.

Standardizing Immunophenotyping for the Human Immunology Project

Holden T Maecker¹, J Philip McCoy, Robert Nussenblatt

ESTRATÉGIA DE ANÁLISE POR PERFIL IMUNOLÓGICO

> [Aging Dis.](#) 2020 Mar 9;11(2):216-228. doi: 10.14336/AD.2020.0228. eCollection 2020 Apr.

Transplantation of ACE2⁻ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients With COVID-19 Pneumonia

Leng *et al.*, 2020

Foco em demonstrar que o tratamento com MSC ACE2⁻ tem potencial para a COVID-19

Perfil Imunológico dos pacientes

ESTRATÉGIA DE ANÁLISE POR PERFIL IMUNOLÓGICO

> Aging Dis. 2020 Mar 9;11(2):216-228. doi: 10.14336/AD.2020.0228. eCollection 2020 Apr.

Transplantation of ACE2⁻ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients With COVID-19 Pneumonia

Leng *et al.*, 2020

Foi observado que células tronco mesenquimais ACE2⁻ possuem importante efeito imunomodulatório.

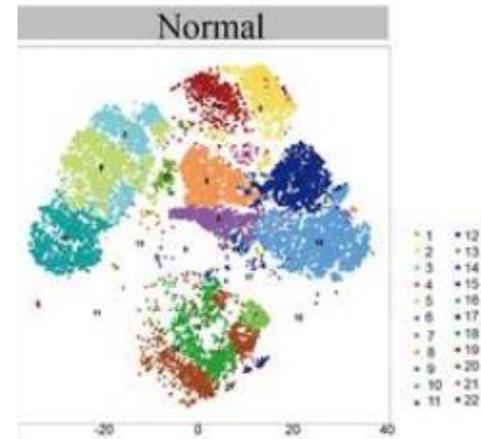
PBMCs analisadas para traçar o perfil dos pacientes saudáveis, infectados com Sars-CoV-2 e infectados com Sars-CoV-2 mas transplantados com as células tronco mesenquimais ACE2⁻.

ESTRATÉGIA DE ANÁLISE POR PERFIL IMUNOLÓGICO

› *Aging Dis.* 2020 Mar 9;11(2):216-228. doi: 10.14336/AD.2020.0228. eCollection 2020 Apr.

Transplantation of ACE2⁻ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients With COVID-19 Pneumonia

Leng et al., 2020



Populações super-ativadas de células T CXCR3⁺CD4⁺ e CXCR3⁺CD8⁺, e células NK CXCR3⁺
Aumento de uma população DCs regulatórias CD14⁺CD11c⁺CD11b^{mid}

ESTRATÉGIA DE ANÁLISE POR PERFIL IMUNOLÓGICO

> Aging Dis. 2020 Mar 9;11(2):216-228. doi: 10.14336/AD.2020.0228. eCollection 2020 Apr.

Transplantation of ACE2⁻ Mesenchymal Stem Cells Improves the Outcome of Patients With COVID-19 Pneumonia

Leng *et al.*, 2020

- Usaram o CyTOF Helios para o estudo
- Baseado neste trabalho a FLUIDIGM elaborou um painel exclusivo para a análise do perfil imunológico de largo espectro, o Maxpar Direct Immune Profiling Assay™ e o software de análise Maxpar Pathsetter™.

INOVAÇÃO NOS ESTUDOS DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE MASSAS: *HELIOS™*, UM SISTEMA CYTOF



INOVAÇÃO NOS ESTUDOS DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE MASSAS: *HELIOS™*, UM SISTEMA CYTOF



O que é a tecnologia CyTOF?

Tecnologia que combina o *workflow hands on* da Citometria de Fluxo com a capacidade de definição da Espectrometria de Massas para identificar analitos em células individuais



INOVAÇÃO NOS ESTUDOS DE POPULAÇÕES CELULARES POR CITOMETRIA DE MASSAS: *HELIOS™*, UM SISTEMA CYTOF

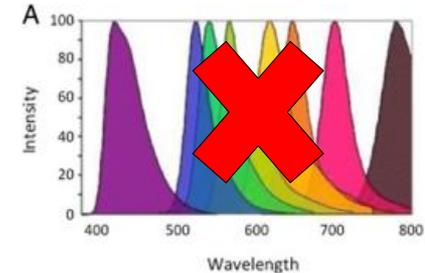
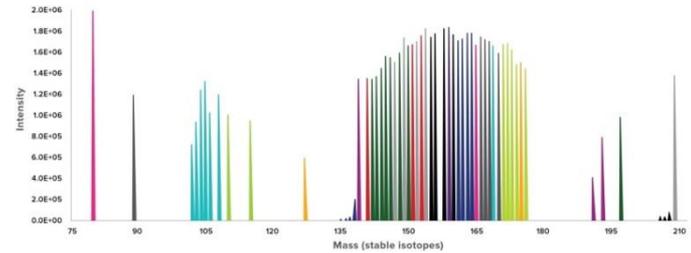


Mas porque usar a Citometria de Massas ao invés da Citometria de Fluxo?



Vantagens Imediatas da tecnologia CyTOF:

- ✓ Usa metais pesados (lantanídeos) no lugar de fluoróforos!!!
- ✓ Canais por peso molecular (135 canais de 75 - 209 Da, com 56 metais já disponíveis)
- ✓ ZERO de sobreposição espectral
- ✓ ZERO de compensação, e não precisa de FMOs
- ✓ Estabilidade da marcação, não perde sinal
- ✓ ZERO de autofluorescência



Workflow da Citometria de Massas

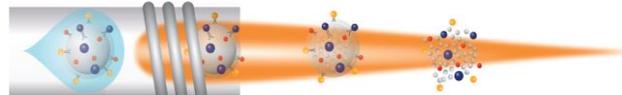
Células são
marcadas com
anticorpos
conjugados a
metais pesados



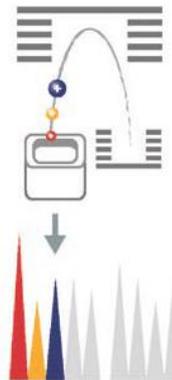
Suspensão de uma
célula é vaporizada;
atomizada e
ionizada no ICP



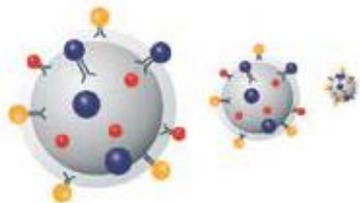
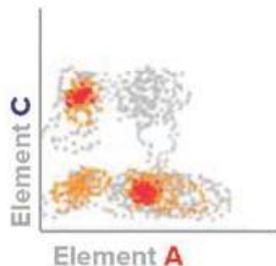
Filtragem dos íons
de massa atômica
mais baixa



Metais pesados
separados de
acordo com sua
massa na câmara
TOF

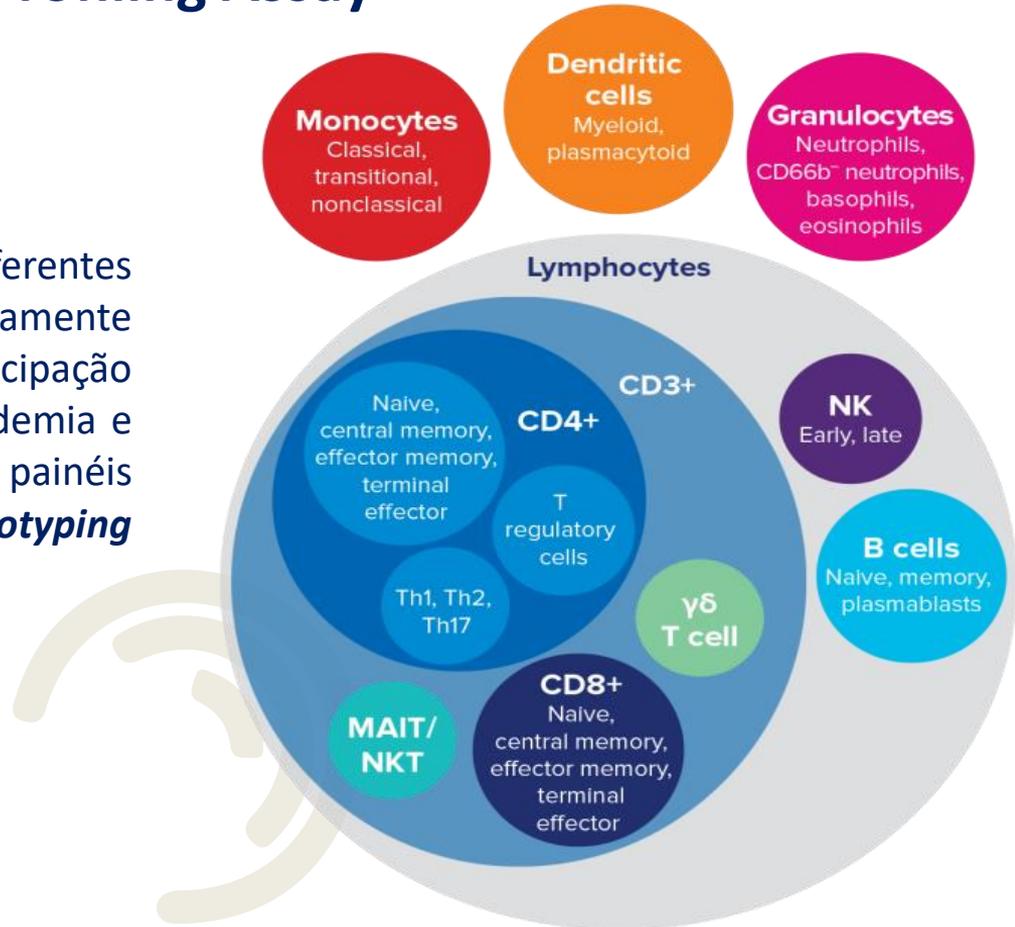


Dados coletados por
célula e analisados



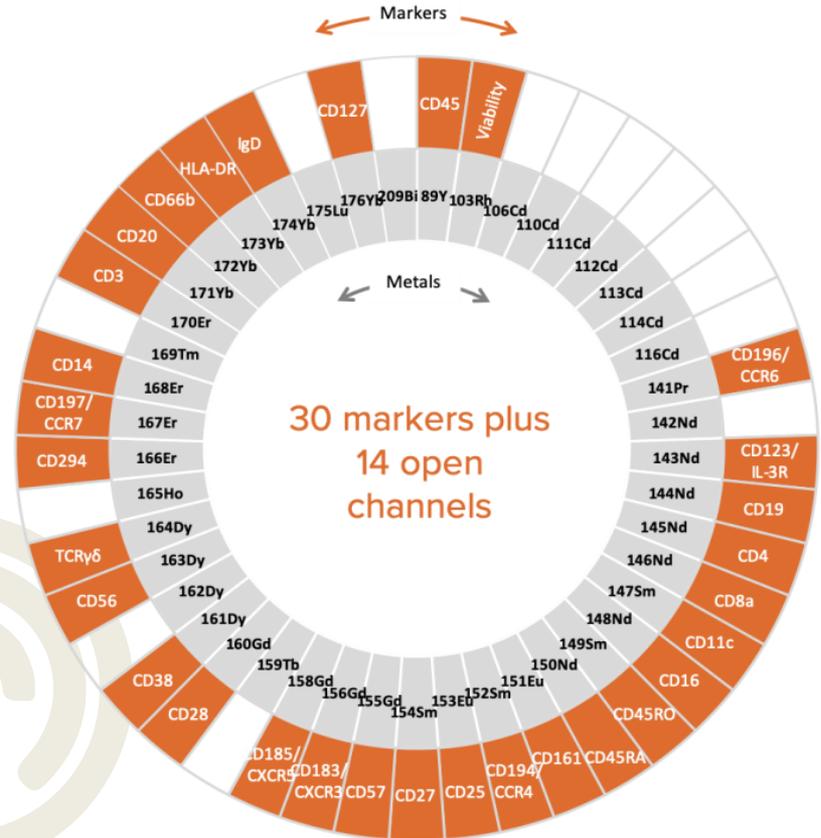
Maxpar Direct Immune Profiling Assay™

Painel de anticorpos para 30 diferentes marcadores multiplexados e altamente otimizado foi desenvolvido com a participação de imunologistas especialistas na academia e na biofarma e baseia-se nos painéis projetados pelo *Human ImmunoPhenotyping Consortium*.



Maxpar Direct Immune Profiling Assay™

Marcadores fixos no painel [Maxpar Direct Immune Profiling Assay™](#), e os canais livres que ainda podem ser preenchidos com outros marcadores de escolha do pesquisador.



Maxpar Direct Immune Profiling Assay™

The new standard in immune profiling

A. Dry single-tube panel design



| | | | | |
|-------|------|--------|-------|--------|
| CD3 | CD19 | CD45 | CD123 | CCR7 |
| CD4 | CD20 | CD45RA | CD127 | CXCR3 |
| CD8 | CD25 | CD45RO | CD161 | CXCR5 |
| CD11c | CD27 | CD56 | CD294 | HLA-DR |
| CD14 | CD28 | CD57 | CCR4 | IgD |
| CD16 | CD38 | CD66b | CCR6 | TCRγδ |

B. Just add sample and GO!

1



Stain

and process PBMC or whole blood samples in **ready-to-use assay tube**.

2



Acquire

data with **customized acquisition template** on the Helios™ mass cytometer.

3



Report

population frequencies, QC metrics and data plot displays with **Maxpar Pathsetter software**.

Maxpar Antibody Labeling Kit

Polímero + metal pesado



Polímero-metal pesado
+
anticorpo

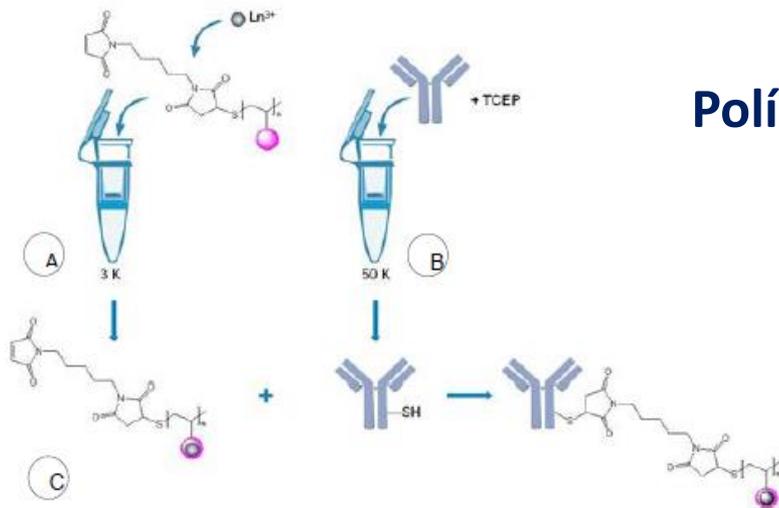


Figure 1. This procedure involves first loading the polymer with lanthanide (A) and partially reducing the antibody (B), then conjugating the antibody with the lanthanide-loaded polymer (C).

Maxpar Pathsetter™

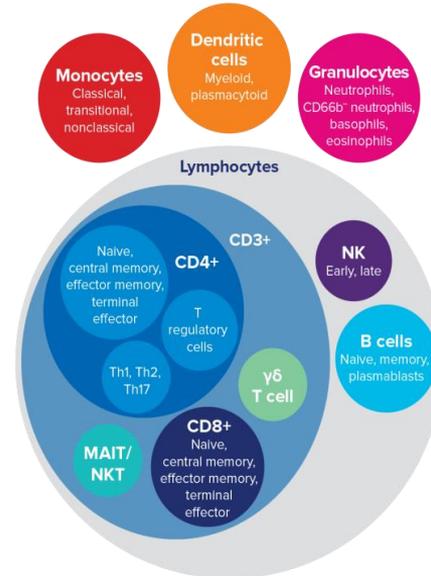
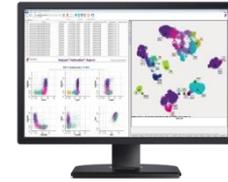
O Maxpar Pathsetter é uma solução totalmente automatizada de análise de dados e relatórios que identifica automaticamente 37 tipos de células imunocompetentes em arquivos FCS a partir de amostras processadas com o ensaio de perfil de imunidade direta Maxpar.

- Elimina a variância da realização de “gates” por diferentes operadores.
- Permite uma análise automatizada e precisa de cada amostra



Considerações Finais

- ✓ Os estudos realizados até o momento em conjunto com os dados clínicos mostram que a COVID-19 é uma doença complexa e multi-fatorial
- ✓ Boa parte das comorbidades ou condições relevantes apresentam alteração nas condições imunológicas do paciente
- ✓ O entendimento do perfil imunológico pode direcionar não apenas o tratamento clínico, mas também as estratégias de combate ao Sars-CoV-2



CONHEÇA O QUE PODEMOS FAZER POR VOCÊ

A Pensabio tem como objetivo servir com inovação e conduzir soluções personalizadas que atendam as suas necessidades.



Suporte técnico
e científico

16 Pessoas
dedicadas



Manutenção
e Serviço



CENTRO DE
excelência

pensabio
A SERVIÇO DA VIDA



Treinamentos
teórico e
prático



Cursos e
Capacitação



5 PhD
2 MsC



CONHEÇA O QUE PODEMOS FAZER POR VOCÊ

Pensabio

A SERVIÇO
DA VIDA



12/05
A 10/06

| Especialista | Data / Horário | Título |
|--|----------------|---|
| Geisi R. Barreto, MSc | 12/mai - 13h | Luz, câmera, ação! Assista de camarote a nova tecnologia para medir tamanho e concentração do novo coronavírus (SARS-CoV-2) em 60s. |
| Gustavo Parra, PhD | 13/mai - 13h | Calibração Convencional e Calibração Universal em Cromatografia por Exclusão de tamanho |
| Danuza Rossi, PhD | 14/mai - 13h | Bate papo para preparar seu laboratório e sua empresa contra a COVID-19 |
| Marco Lapa, PhD / Cristiane Oliveira, PhD | 18/mai - 13h | Entendendo os métodos e tecnologias usados no diagnóstico da COVID-19 |
| Cristiane Oliveira, PhD | 19/mai - 14h | Saiba tudo sobre Sequenciamento de <i>Single-Cell</i> aplicado a COVID-19 |
| Danuza Rossi, PhD | 20/mai - 11h | Explorando a ferramenta NCSengine (tipagem de HLA por NGS) |
| Gustavo Parra, PhD | 27/mai - 13h | O método de tripla detecção do OMNISEC™: apresentação e fatores que geram erros de tamanho |
| Marco Lapa, PhD | 02/jun - 13h | Citometria de Massas, CyTOF e sua aplicação no estudo do SARS-CoV-2 |
| Gustavo Parra, PhD | 03/jun - 13h | Boas práticas e Troubleshooting em Cromatografia por Exclusão de Tamanho |
| Marco Lapa, PhD | 05/jun - 13h | Acelere os estudos e diagnóstico de COVID-19 com a plataforma de ELISA automatizada, ELLA |
| Cristiane Oliveira, PhD | 09/jun - 14h | Como funciona e como analisar o transcriptoma de <i>Single Cell</i> mantendo as informações da morfologia do seu tecido. |
| Marco Lapa, PhD | 10/jun - 13h | Atualizações de Protocolo: ELISA, ações práticas para reduzir erros e maximizar a eficiência |



ACOMPANHE A *Série de* *webinários* PENSABIO

Inscrição gratuita

[Clique aqui](#) 

12/05
A 10/06

| Especialista | Data / Horário | Título |
|--|----------------|---|
| Geisi R. Barreto, MSc | 12/mai - 13h | Luz, câmera, ação! Assista de camarote a nova tecnologia para medir tamanho e concentração do novo coronavírus (SARS-CoV-2) em 60s. |
| Gustavo Parra, PhD | 13/mai - 13h | Calibração Convencional e Calibração Universal em Cromatografia por Exclusão de tamanho |
| Danuza Rossi, PhD | 14/mai - 13h | Bate papo para preparar seu laboratório e sua empresa contra a COVID-19 |
| Marco Lapa, PhD / Cristiane Oliveira, PhD | 18/mai - 13h | Entendendo os métodos e tecnologias usados no diagnóstico da COVID-19 |
| Cristiane Oliveira, PhD | 19/mai - 14h | Saiba tudo sobre Sequenciamento de <i>Single-Cell</i> aplicado a COVID-19 |
| Danuza Rossi, PhD | 20/mai - 11h | Explorando a ferramenta NCSengine (tipagem de HLA por NGS) |
| Gustavo Parra, PhD | 27/mai - 13h | O método de tripla detecção do OMNISEC™: apresentação e fatores que geram erros de tamanho |
| Marco Lapa, PhD | 02/jun - 13h | Citometria de Massas, CyTOF e sua aplicação no estudo do SARS-CoV-2 |
| Gustavo Parra, PhD | 03/jun - 13h | Boas práticas e Troubleshooting em Cromatografia por Exclusão de Tamanho |
| Marco Lapa, PhD | 05/jun - 13h | Acelere os estudos e diagnóstico de COVID-19 com a plataforma de ELISA automatizada, ELLA |
| Cristiane Oliveira, PhD | 09/jun - 14h | Como funciona e como analisar o transcriptoma de <i>Single Cell</i> mantendo as informações da morfologia do seu tecido. |
| Marco Lapa, PhD | 10/jun - 13h | Atualizações de Protocolo: ELISA, ações práticas para reduzir erros e maximizar a eficiência |



ACOMPANHE A

Série de webinários PENSABIO

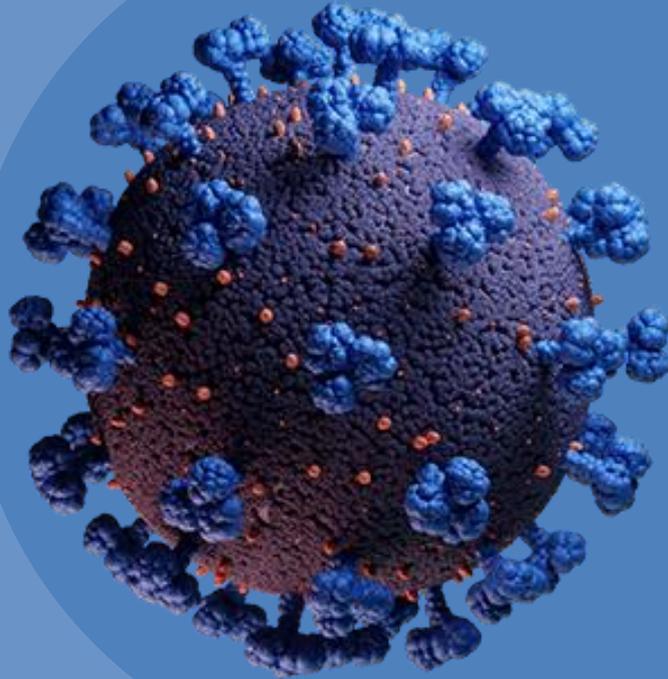
Acelere os estudos e diagnósticos de COVID-19 com a plataforma de ELISA automatizado, ELLA

Sexta!!! 05/06, 13hr

REFERÊNCIAS USADAS NESTE WEBINÁRIO

- Site dos fornecedores
- Manuais e bulas dos fornecedores
- <https://operamundi.uol.com.br/coronavirus>
- Aging Dis . 2020 Mar 9;11(2):216-228. doi: 10.14336/AD.2020.0228. eCollection 2020 Apr.
- Acute Myeloid Leukemia Immunophenotyping by Flow Cytometry Analysis. Chen X, Cherian S. Clin Lab Med. 2017 Dec;37(4):753-769. doi: 10.1016/j.cl.2017.07.003. Epub 2017 Aug 31.
- Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project [published correction appears in Nat Rev Immunol. 2012 Jun;12(6):471]. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(3):191-200. Published 2012 Feb 17. doi:10.1038/nri3158





CITOMETRIA DE MASSAS, CYTOF, E SUA APLICAÇÃO NO ESTUDO DO SARS-COV-2



Marco Lapa, PhD

Especialista de Produto e Aplicação

Pensabio Biotecnologia

marco.lapa@pensabio.com.br