



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS NÃO-RADIOATIVAS EDU E FASCIA
NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS EM PACIENTES SUSPEITOS DE
IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA**

Juliana Cantagalli Pfisterer

**Rio de Janeiro
Junho de 2017**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS NÃO-RADIOATIVAS EDU E FASCIA
NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS EM PACIENTES SUSPEITOS DE
IMUNODEFICIÊNCIA PRIMÁRIA**

Juliana Cantagalli Pfisterer

*Dissertação apresentada à
Pós-graduação em Pesquisa
Aplicada à Saúde da Criança e
da Mulher do Instituto Nacional
de Saúde da Mulher, da
Criança e do Adolescente
Fernandes Figueira, da
Fundação Oswaldo Cruz, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre
em Ciências.*

Dr. Zilton Farias M. Vasconcelos

**Rio de Janeiro
Junho de 2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Pfisterer, Juliana Cantagalli .

Avaliação das metodologias não-radioativas EdU e FASCIA na proliferação de linfócitos em pacientes suspeitos de imunodeficiência primária / Juliana Cantagalli Pfisterer. - Rio de Janeiro, 2017.

84 f.; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2017.

Orientador: Zilton Farias Meira de Vasconcelos.

Bibliografia: f. 31-37

1. Proliferação celular. 2. Imunodeficiência primária. I. Título.

Agradecimentos

Em primeiro lugar eu agradeço à Deus por permitir que eu esteja aqui hoje desenvolvendo esse lindo trabalho.

Aos meus pais, Jorge e Carmen por estarem sempre ao meu lado ao tomar decisões. Sem eles nada disso teria acontecido. Obrigada por iluminarem o meu caminho, e pela dedicação incondicional durante todos os dias da minha vida.

Ao meu marido, melhor amigo e companheiro, Alex, por acompanhar de perto essa longa e vitoriosa caminhada, me apoiando nos momentos mais difíceis.

À toda minha família e amigos, pelo incentivo diário e vibrações com minhas vitórias e derrotas.

À turma do mestrado de 2015 e ao pessoal do Laboratório de Alta Complexidade (NB2), e Laboratório de Biologia Molecular / Medicina Genômica, pela amizade e companheirismo. Integrantes essenciais dessa jornada, participando e se envolvendo em cada etapa. São os principais responsáveis por tornar a rotina mais tranquila, dando força para seguir em frente e não desistir.

Ao meu orientador, Dr. Zilton Vasconcelos, pela confiança, apoio e amizade, além de sua dedicação, competência e paciência. Não podendo deixar de exaltar sua alta capacidade de clareza nos seus ensinamentos.

À Dra. Flávia Anisio, pela enorme contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

À banca examinadora, Dra. Fernanda Mariz e Dr. Leonardo Ferreira, por todos os ensinamentos.

Ao programa da pós-graduação e professores, pela competência no suporte de nossas necessidades acadêmicas.

E a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desse trabalho, especialmente: Serviço de Imunologia e Alergia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ); Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ); Laboratório de Alta Complexidade do IFF; Laboratório de Biologia Molecular do IFF; Hospital Federal da Lagoa; Hospital Estadual da criança e Hospital dos Servidores do Estado.

Lista de abreviaturas

ASBAI - Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia

BCG - Bacilo Calmette-Guérin

BRAGID - Grupo Brasileiro de Estudos de Imunodeficiências Primárias

BrdU - Bromodesoxiuridina

BTK - Tirosina-quinase de Bruton

CPM - Cintilações por minuto

CFSE - Éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína

DGC - Doença granulomatosa crônica

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDU - 5-etinil-2-deoxyuridine

FASCIA - Ensaio de citometria de fluxo para resposta imune mediada por células específicas em sangue total ativado

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IDP - Imunodeficiência primária

IDR - Imunodeficiência relacionada

IFF - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira

IPPMG - Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira

LACIFF - Laboratório de Alta Complexidade do IFF

LASID - Sociedade Latina Americana para imunodeficiências

LBMA - Laboratório de Biologia Molecular Aplicada

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide

PCR - Reação em cadeia polimerase

PHA - Fitohemaglutinina

PWM - Pokeweed mitogen

SCID - Imunodeficiência combinada grave

SFB - Soro fetal bovino

SBP - Sociedade Brasileira de Pediatria

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH - Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

WAS - Síndrome de Wiskott-Aldrich

Resumo

As imunodeficiências primárias (IDPs) são doenças genéticas raras onde deve ser desenvolvido um fluxo de trabalho de diagnóstico clínico e laboratorial gradual e complexo. Devido à sua diversidade, a avaliação da resposta dos linfócitos do paciente frente a estimulação mitogênica é uma das ferramentas propostas durante a triagem clínica para as imunodeficiências primárias. O ensaio padrão-ouro para esta avaliação é a incorporação de [3H]-timidina após a estimulação com mitógenos ou antígeno-específico de linfócitos. Algumas tecnologias que utilizam citometria de fluxo têm sido propostas como alternativas não-radioativas para a avaliação linfoproliferativa. Até hoje, apenas a metodologia FASCIA foi avaliada no contexto de IDP e foi considerada útil para pacientes com imunodeficiência combinada grave (SCID). Neste estudo, comparamos duas metodologias diferentes baseadas em citometria de fluxo, FASCIA e EdU, com a incorporação de [3H]-timidina em pacientes suspeitos e confirmados para IDP. Nossos resultados demonstraram uma melhor correlação entre a incorporação de EdU e [3H]-timidina quando comparada à metodologia FASCIA. Além disso, a proliferação de linfócitos utilizando o estímulo com PHA apresentou alta sensibilidade e especificidade para a identificação de pacientes WAS com um potencial ponto de corte de 26% de células EdU+ para disfunções funcionais de linfócitos em pacientes IDP. Além disso, pacientes suspeitos de IDP com alto escore IDR mostraram uma diminuição significativa na porcentagem de células em proliferação EdU+, muito semelhante àquelas encontradas em pacientes de WAS. Conclui-se que a metodologia de EdU, após estimulação com PHA, é indicada para a avaliação não-radioativa da proliferação de linfócitos no contexto de IDPs graves.

Palavras-chave: Teste de proliferação de linfócitos; Citometria de fluxo; Imunodeficiência Primária; Síndrome de Wiskott-Aldrich; [3H]-timidina.

Abstract

Primary immunodeficiencies (IDPs) are rare genetic diseases where stepwise and complex clinical and laboratory diagnosis workflow should be developed. Because of their diversity, assessment of patient's lymphocyte response to mitogen stimulation is one of proposed tools in the course of clinical screening for IDPs. The gold standard assay for this evaluation is [3H]-thymidine uptake after mitogen or antigen specific lymphocyte stimulation. Some technologies that use flow cytometry have been proposed as non-radioactive alternatives for lymphoproliferative evaluation. To date, only FASCIA methodology has been evaluated in the context of the IDP and was considered useful for severe combined immunodeficiency (SCID) patients. Herein, we compared two different flow cytometry-based methodologies, FASCIA and EdU, against [3H]-thymidine uptake in suspected and WAS confirmed IDP patients. Our results demonstrated a better correlation between EdU and [3H]-thymidine uptake when compared to the FASCIA methodology. In addition, lymphocyte proliferation using the PHA stimulus presented high sensitivity and specificity for WAS patients identification with potential cut-off point of 26% EdU+ cells for IDP lymphocyte functional dysfunction. In addition, suspected IDP patients with high IDR score displayed a significant decrease in EdU+ percentage of proliferating cells, very similar to those found in WAS patients. We conclude that EdU methodology, after stimulation with PHA, is indicated for the non-radioactive evaluation of lymphocyte proliferation in the context of severe IDPs.

Keywords: Lymphocyte proliferation test; Flow cytometry; Primary Immunodeficiency; Wiskott-Aldrich Syndrome; [3H]-thymidine.

Sumário

AGRADECIMENTOS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO 1	10
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 <i>JUSTIFICATIVA</i> :.....	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 <i>GERAL</i> :.....	14
2.2 <i>ESPECÍFICOS</i> :.....	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 <i>IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS (IDPs)</i>	15
3.2 <i>DIAGNÓSTICO</i>	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 <i>ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA</i>	25
4.2 <i>DESENHO DO ESTUDO</i>	25
4.3 <i>POPULAÇÃO DE ESTUDO</i>	25
4.4 <i>OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO</i>	26
4.5 <i>ENSAIO PROLIFERATIVO CELULAR</i>	27
4.5.1 <i>ENSAIO EDU</i>	27
4.5.2 <i>[3H]-TIMIDINA</i>	27
4.5.3 <i>ENSAIO FASCIA</i>	28
4.6 <i>SEQUENCIAMENTO DO GENE WAS</i>	28
4.7 <i>MARCAÇÃO INTRACELULAR PARA WASP</i>	28
4.8 <i>ESCORE CLÍNICO</i>	29
4.9 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	30
5. REFERÊNCIAS :.....	31
CAPÍTULO 2 - ARTIGO	38
CAPÍTULO 3	65
6. CONCLUSÃO	65

7.	APÊNDICE 1	67
8.	APÊNDICE 2	70
9.	ANEXO 1	74
10.	ANEXO 2	77

Capítulo 1

1. Introdução

As imunodeficiências primárias (IDPs) compõe um grupo heterogêneo de aproximadamente 300 doenças genéticas caracterizadas por uma resposta imune funcionalmente alterada ou inexistente, que resulta no aumento da susceptibilidade a infecções recorrentes com conseqüente comprometimento do sistema imunológico. As manifestações clínicas são muito variadas, mas na maioria das vezes se apresentam com algum padrão de infecção de repetição, as quais variam na gravidade e no perfil etiológico (1).

O diagnóstico para esse grupo de doença é de grande dificuldade, pelo fato da interpretação dessas manifestações, que podem ser confundidas com infecções passageiras e/ou menos graves, e devido à ampla variedade fenotípica associada com a variação imunológica apresentada pela manifestação clínica da doença. As IDPs representam um amplo espectro de doenças, dentre as quais, as mais graves são fatais se não tratadas precoce e adequadamente, o que pode melhorar a qualidade e o tempo de vida destes pacientes. Atualmente a primeira opção terapêutica de pacientes graves é o Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH) e deve ser realizado o mais precocemente possível. Para tanto, o diagnóstico precoce e um sistema de rastreamento de doadores eficiente são peças fundamentais, comprometendo em muitas situações o desfecho destes pacientes (2).

Dentre os métodos diagnósticos para os pacientes suspeitos de imunodeficiência primária, o ensaio de proliferação linfocitária é de grande importância para a avaliação funcional dessas células através do cultivo in vitro com diferentes estímulos policlonais e antígeno-específicos (3). O ensaio de proliferação in vitro é um teste que avalia quantitativa e qualitativamente o sistema imunológico. É utilizado para determinar se os mecanismos de ativação e proliferação dos linfócitos, a partir de estímulos policlonais (mitógenos) ou antígeno-específicos, estão preservados. Caso os linfócitos estejam funcionando normalmente, na presença do estímulo proliferativo, ocorre a divisão celular que mimetiza in vitro o fenômeno da expansão clonal em respostas imunes-específicas. Em contra partida, certas doenças dentre as IDPs, apresentam defeitos específicos desses processos de ativação e proliferação celular, que comprometem a expansão clonal e levam às infecções e complicações clínicas inerentes (4). O teste padrão ouro para esse ensaio proliferativo é o teste que utiliza a incorporação de nucleotídeo radioativo [3H]-timidina. Entretanto, esta técnica não é capaz de avaliar a proliferação célula-específica e oferece riscos de saúde ao manipulador devido à exposição ao material radioativo e substâncias orgânicas tóxicas. Os riscos do manuseio da [3H]-timidina advêm da exposição interna ou externa do organismo. A exposição interna se dá pela contaminação do organismo por radioisótopos introduzidos pela via respiratória, digestiva ou cutânea. A exposição externa ocorre quando o organismo é irradiado por uma fonte externa (5,6).

Sendo assim, a proposta desse trabalho é avaliar a eficiência dos métodos alternativos e não-radioativos para os ensaios de proliferação celular. A primeira alternativa não-radioativa utiliza um kit comercial chamado Click-iT® EdU, e se baseia

na incorporação de um análogo de timina, o qual é incorporado no DNA. Esse análogo será conjugado quimicamente a uma molécula fluorescente que será quantificada pela citometria de fluxo (7). A segunda metodologia foi recentemente publicada com o nome de FASCIA. Nesse caso, a citometria de fluxo é capaz de quantificar a transformação blástica de linfócitos ativados após o estímulo proliferativo (4).

A aplicabilidade dessas novas metodologias na rotina dos centros pediátricos contribuirá para a determinação das subpopulações linfocitárias funcionais, auxiliando o processo de um diagnóstico fidedigno.

1.1 Justificativa:

Alguns ensaios de proliferação linfocitária já foram propostos como alternativas ao método padrão ouro de incorporação de [3H]-timidina. No entanto, ainda não existem estudos consistentes que avaliem essas novas metodologias em um grupo de pacientes suspeitos de imunodeficiência primária, com o objetivo de avaliar a capacidade de discriminação diagnóstica, sua sensibilidade e especificidade nessa população e viabilidade técnica.

Nossa proposta de estudo visa avaliar a eficiência dos métodos FASCIA e EdU como alternativas para o ensaio de incorporação de [3H]-timidina na avaliação funcional de linfócitos, em um grupo de pacientes encaminhado ao Serviço de Imunologia e Alergia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ); Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ); Hospital Federal da Lagoa e Hospital dos Servidores do Estado.

Dentre as vantagens metodológicas, os ensaios de FASCIA e EdU permitirão:

- 1) A diminuição no volume de amostra requerido para o ensaio;*
- 2) Diminuição do tempo de preparo de amostras;*
- 3) A quantificação absoluta de célula ativadas/em proliferação;*
- 4) Avaliações multiparamétricas com a discriminação de subpopulações de células ativadas/em proliferação.*

Todos os itens acima serão importantes para definir a aplicabilidade dessas novas metodologias na rotina dos centros pediátricos e possivelmente contribuirão para alcançarmos um diagnóstico mais rápido, informativo e fidedigno.

O artigo inserido nessa dissertação (capítulo 2) foi submetido para a revista científica “Journal of Cellular and Molecular Medicine”, de acordo com as normas da mesma (ver anexo 2).

2. Objetivos

2.1 Geral:

Avaliar a eficiência das metodologias de FASCIA e EdU como alternativas para o ensaio de avaliação funcional de linfócitos através da incorporação de [3H]-timidina, em um grupo de pacientes suspeitos de imunodeficiência primária, encaminhados para o Serviço de Imunologia e Alergia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ); Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ); Hospital dos Servidores do Estado e Hospital Federal da Lagoa.

2.2 Específicos:

- *Avaliar o desempenho diagnóstico da metodologia FASCIA;*
- *Avaliar o desempenho diagnóstico da metodologia EdU;*
- *Comparar as duas metodologias não-radioativas com a padrão ouro, frente à coorte de pacientes suspeitos de IDP;*
- *Demonstrar a avaliação de subtipos celulares proliferativos nos ensaios que envolvam a citometria de fluxo.*

3. Referencial Teórico

3.1 *Imunodeficiências primárias (IDPs)*

São doenças genéticas, agrupadas como um único grupo de doenças, sendo consideradas deficiências raras (8). Têm como principal característica alterações das funções do sistema imune, levando à maior suscetibilidade às infecções, desenvolvimento de doenças autoimunes e neoplasias. Na grande maioria das vezes, as IDPs se manifestam precocemente e são responsáveis por aumento significativo da morbi-mortalidade destes pacientes (9,10). A incidência das IDPs tem aumentado significativamente nos últimos 40 anos, provavelmente consequente de uma ampla compreensão da base genética e mecanismos imunológicos defeituosos responsáveis pela IDP. No Brasil, a prevalência exata da doença ainda não é conhecida e esforços para a criação de um banco de dados unificado estão em desenvolvimento na América Latina (LASID). Nos EUA pesquisadores estimam que 1 em 2000 crianças; 1 em 1200 para todas as pessoas; e 1 em cada 600 famílias (para uma estimativa da população total entre 150.000 e 360.000 pessoas) são diagnosticadas com IDP (11). As IDPs são doenças monogênicas, com padrão de herança variável, podendo ser herança ligada ao cromossomo X, autossômica recessiva e autossômica dominante (12).

3.2 *Diagnóstico*

O diagnóstico das IDPs é um dos principais desafios. Os médicos pediatras e clínicos gerais, bem como especialistas de áreas relacionadas com estas desordens, têm dificuldades para interpretar os sintomas, os quais na maioria das vezes são confundidos com infecções passageiras e menos graves. Este fato retarda o diagnóstico das IDPs, o qual é essencial para redução tanto das complicações

inerentes às múltiplas infecções e internações quanto da mortalidade associada a estas doenças, além de permitir, nos casos com indicação, a realização de transplante de células-progenitoras hematopoiéticas (13). O período entre o início dos sintomas e o diagnóstico de IDP é crítico: quanto mais precoce for o diagnóstico maior a chance de sobrevida destes pacientes, sobretudo naqueles pacientes portadores de SCID (14,15). Fato este, que pode ser devido à ampla variedade fenotípica associada com a variação imunológica apresentada pela manifestação clínica da doença (2,16).

No sentido de chamar a atenção para as condições clínicas que merecem investigação, a Jeffrey Modell Foundation em colaboração com a Cruz Vermelha Norte-Americana lançaram um pôster contendo os dez sinais de alerta para IDP que indicam a necessidade de investigação para a doença. A presença de mais de um desses sinais aponta para a investigação mais apurada do paciente em questão. Esses critérios foram adaptados para a população brasileira pela Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia (ASBAI), pela Sociedade Brasileira de Pediatria (SBP) e pelo Grupo Brasileiro de Estudos de Imunodeficiências Primárias (BRAGID) (<http://www.imunopediatria.org.br>). Este documento conjunto tem sido divulgado essencialmente junto à classe médica, porém existem poucas informações divulgadas a respeito do alcance desta iniciativa (17).

Os então chamados dez sinais de alerta são:

- 1. Duas ou mais pneumonias no último ano;*
- 2. Oito ou mais novas Otites no último ano;*
- 3. Estomatites de repetição ou Monilíase por mais de dois meses;*
- 4. Abscessos de repetição ou ectima;*

5. *Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia);*
6. *Infecções intestinais de repetição / diarreia crônica;*
7. *Asma grave, Doença do colágeno ou Doença auto-imune;*
8. *Efeito adverso ao BCG e/ou infecção por Micobactéria;*
9. *Fenótipo clínico sugestivo de síndrome associada a Imunodeficiência;*
10. *História familiar de imunodeficiência.*

A realização e a divulgação destes sinais clínicos têm como objetivo alertar os profissionais de saúde para a possibilidade do diagnóstico dessas patologias e, por consequência, possibilitar a identificação precoce a fim de permitir a seleção dos casos que necessitem de tecnologias mais complexas para definição de risco e conduta terapêutica. A confirmação da hipótese diagnóstica pode, em alguns casos, ser feita com exames considerados de baixa complexidade como o hemograma (ex: Neutropenia congênita – Síndrome de Kostman), dosagem sérica dos níveis de imunoglobulinas (ex: Tirosina quinase de Bruton - BTK) e o aconselhamento genético, mas em muitas outras situações necessitam de exames mais sofisticados disponíveis em poucos centros no Brasil (8).

No Brasil, mesmo tecnologias que utilizem apenas a citometria de fluxo para quantificação de perfis linfocitários (ex: Imunodeficiência combinada grave e Imunodeficiência comum variável) e função de fagócitos (Doença granulomatosa crônica - DGC) é dificultada, e o custo e a mão de obra para realização dessas análises

não permite o acesso livre a todos os pacientes suspeitos. No entanto, mesmo a quantificação de subtipos linfocitários por citometria de fluxo, em alguns casos não é suficiente para determinar a patologia específica, exigindo ainda análises funcionais das células do sangue periférico para auxiliar na caracterização dos casos. Essas tecnologias associadas podem ser consideradas metodologias de média complexidade e contribuem para o diagnóstico de pacientes suspeitos das seguintes IDPs: Ataxia-telangiectasia; síndrome de Di George; Imunodeficiência combinada grave; malformação linfática; Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS); Síndrome da hiper-IgM; Tirosina-quinase de Bruton (BTK); entre outras. Normalmente, os níveis de imunoglobulinas totais e específicos, e o hemograma completo são determinados em combinação com a análise do sistema de complemento e a enumeração de subpopulações de linfócitos. No entanto, este painel de teste em alguns casos não é suficiente uma vez que os sintomas clínicos manifestados nas IDPs podem depender de uma falta de função celular, não manifestada em um número baixo de células (18,19).

Dessa forma, a avaliação funcional de linfócitos através da cultura de leucócitos in vitro, com estímulos policlonais ou antígenos específicos, tem sido de grande importância para complementar o diagnóstico imunológico de pacientes suspeitos de IDP. A avaliação funcional de linfócitos é parte do trabalho clínico de pacientes com suspeita de imunodeficiências, sendo fundamentais para a compreensão do sistema imunológico, (3) e tratamento de pacientes com várias anormalidades imunológicas da linhagem T (4,20). A cultura in vitro de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com estimulação de mitógenos é um dos métodos mais antigos e mais

utilizados para detectar a funcionalidade de células T (21,22). Devido à sua boa sensibilidade e reprodutibilidade, o teste padrão ouro de proliferação celular utiliza como medida, a incorporação de um nucleotídeo radioativo [3H]-timidina, um análogo de timidina no DNA durante a replicação celular (5,23–27).

Esse ensaio é baseado no princípio de que após a ativação de linfócitos T ou B, ocorre à indução da proliferação celular, com incorporação do material radioativo no DNA de células durante a fase da S (síntese) do ciclo celular. No entanto, a leitura não permite a distinção entre os tipos de células que contribuem para o sinal, isto é, os defeitos das células T e B não podem ser separados (28,29). A captação reduzida de timidina pode ser devida a: a) taxa reduzida de divisão de todas as células T, b) resposta normal de apenas uma fração de células T, e c) uma representação menor de células T entre PBMC ou uma combinação destas.

Uma vez que os mitógenos são potentes estimuladores da ativação e proliferação das células T independentemente da sua especificidade antigénica, pensa-se que as células T podem responder, mesmo que não sejam capazes de responder adequadamente a estímulos fisiológicos (30–32).

Deste modo, pensa-se que a capacidade de resposta retardada do mitógeno é um teste menos sensível, mas mais específico, da função das células T prejudicada, em comparação com a estimulação com antígenos de memória. Por outro lado, uma vez que a estimulação de células T por antígenos de memória é mais fisiológica, tal ativação é frequentemente considerada como um indicador diagnóstico mais sensível, mas menos específico, de comprometimento das células T em comparação com mitogénios. Os resultados dos ensaios de proliferação são expressos em CPM da

radioatividade incorporada no DNA das células em divisão. O CPM de um doente pode ser comparado com o desempenho histórico dos controles (intervalo normal do laboratório) ou com o desempenho de um controle saudável individual para essa experiência ou teste em particular e expresso como uma relação ou percentagem desse valor (CPM relativo ou CPMREL), Ou ao CPM "de fundo" ("background") de uma cultura de células às quais não foi adicionado qualquer estímulo (33).

Entretanto, muitos laboratórios clínicos e de pesquisa evitam esta técnica por ela oferecer riscos de exposição ao material radioativo e líquidos de cintilação, necessários para a quantificação do nível de incorporação de [3H]-timidina ao DNA dessas células. Outra barreira desta técnica é a necessidade de volumes de amostras de pelo menos 4 ml de sangue total, sendo considerado um grande volume, uma vez que se trata de exames realizados em recém-nascidos (4,34). Logo, medir a sua incorporação é um ensaio tóxico e dispendioso.

É possível também o uso de abordagens não-radioativas tais como a incorporação do análogo de nucleósido 5-bromodesoxiuridina (BrdU). No entanto, este ensaio é menos sensível do que o ensaio de incorporação de [3H]-timidina e, portanto, não foi introduzido na clínica (34). A bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo nucleosídico que se incorpora ao DNA genômico, foi desenvolvido como uma alternativa não-radioativa para detectar proliferação celular. O método BrdU ganhou popularidade desde a capacidade de medir BrdU com anticorpos marcados fluorescentemente (35). Contudo, a detecção de BrdU requer submeter as amostras a condições altas de desnaturação que modificam epítomos celulares, impedindo assim a

análise dos antígenos da célula e causando variabilidade na intensidade de coloração (36).

Outra opção é usar o ensaio MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) para determinar a viabilidade celular. Ele baseia-se na enzima succinato desidrogenase mitocondrial e na sua capacidade de transformar o sal de tetrazólio de MTT em formazan de MZZ, um composto azul detectável calorimetricamente utilizando ELISA. O método é comparável em sensibilidade ao ensaio de [3H]-timidina e está disponível há muitos anos. No entanto, o ensaio de MTT é um ensaio indireto e apenas proporcional ao número de células vivas e não diretamente as células em divisão; Portanto, não foi aceito como padrão de ouro na prática clínica (37).

A proliferação também pode ser monitorizada utilizando a diluição do corante por células de carga com éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). O fluoróforo preso é diluído em cada divisão celular permitindo a enumeração das divisões. A necessidade de distribuição uniforme e a toxicidade do corante em concentrações mais elevadas limita novamente a utilidade em amostras clínicas de pacientes com baixas contagens celulares e suspeitas de imunodeficiências. Além disso, o tempo de manuseio para a preparação e análise é um pouco longo e não é adequado para o laboratório clínico (38).

Outra metodologia não-radioativa consiste no ensaio "FASCIA" (do inglês, Flow-cytometric Assay for Specific Cell-mediated Immune-response in Activated whole blood), desenvolvida nos anos 90 pelo grupo Cost e colaboradores. Esse ensaio se baseia na quantificação a transformação blástica de linfócitos ativados através da

citometria de fluxo, sem a utilização de nenhum marcador. O ensaio é simples, rápido e requer uma pequena quantidade de sangue total. O resultado será expresso a partir do número de células presentes na região de linfoblastos no citômetro de fluxo (39). O método foi introduzido na clínica e é agora rotineiramente utilizado para o diagnóstico de trabalho para vários tipos de imunodeficiências com valores de referência. Para além do seu interesse na investigação, a avaliação da resposta proliferativa dos linfócitos aos mitógenos e aos antígenos de memória (normalmente conhecido como teste de transformação de linfócitos, LTT) continua a ser importante em muitos contextos clínicos. Em particular, a avaliação da funcionalidade dos linfócitos é rotineiramente realizada no diagnóstico das imunodeficiências primárias, no seguimento da recuperação das funções imunitárias após transplante de medula óssea e no diagnóstico de certas hipersensibilidades de tipo retardado (por exemplo, hipersensibilidade ao berílio) (26,27,40).

Recentemente, o método EdU tem sido demonstrado como uma alternativa ao ensaio de [3H]-timidina na avaliação funcional de linfócitos em modelos experimentais (41). Esse ensaio é baseado na incorporação de 5-etinil-2-deoxyuridine (EdU), outro análogo de timidina, em que um grupo alcino terminal substitui o grupo metil na posição 5. O grupo alcino de EdU pode reagir com azidas fluorescentes em uma reação de cicloadição [3 + 2] catalisada por Cu (I) conhecida como "clique", permitindo a detecção da incorporação de EdU em células por microscopia fluorescente ou classificador de células ativadas por fluorescência (FACS). Esse análogo é facilmente incorporado no DNA recém-sintetizado (durante a fase S do ciclo celular) e conjugado a uma molécula fluorescente numa reação chamada de "clique rápido" (origem do nome) catalisada por

cobre (35,42). O resultado da proliferação será expresso em percentagem e/ou número de células EdU positivas (+) lidas no citômetro de fluxo.

Além de serem métodos não-radioativos, ambas as metodologias têm como vantagem adicional possibilitar avaliações multiparamétricas. Quando esses métodos são combinados a anticorpos monoclonais, conjugados com fluoróforos, dirigidos aos subtipos linfocitários T e B, a avaliação funcional é associada à enumeração de proliferação de linfócito específica (43).

É importante ressaltar que alguns casos de IDP, o diagnóstico é confirmado apenas após a detecção da mutação genética responsável pela manifestação fenotípica da doença. Essa etapa de diagnóstico molecular envolve uma variedade grande de genes e é realizada através das técnicas de PCR (do inglês, polymerase chain reaction) e sequenciamento genético. Apesar de serem importantes para o diagnóstico, aconselhamento genético, e desenvolvimento de terapias genéticas, essas tecnologias são caras, consideradas de alta complexidade e representam um desafio ainda maior para o diagnóstico das IDPs (8,44).

Atualmente no IFF (Instituto Fernandes Figueira/FIOCRUZ) contamos com a colaboração da plataforma PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) para realizar o sequenciamento genético das seguintes IDPs ligadas ao cromossoma X: Agamaglobulinemia de Bruton, Síndrome de Wiskott-Aldrich, Doença granulomatosa crônica e Imunodeficiência combinada grave.

Dentre as IDPs que causam defeitos proliferativos, a síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é um distúrbio raro de imunodeficiência ligado ao cromossomo X, caracterizado por trombocitopenia e pequenas plaquetas, eczema, infecções

recorrentes e risco aumentado de auto-imunidade e malignidade (45). Geneticamente, a WAS (OMIM 300392) é causada por mutações no gene WAS, o qual consiste em 12 exons contendo 1823 pares de bases (46). Esse gene codifica a proteína WASP de 502 aminoácidos (aa) que é expressa seletivamente em linhagens derivadas de células hematopoiéticas e está envolvida na sinalização celular e na reorganização do citoesqueleto (47–49). Os defeitos fenotípicos documentados em pacientes WAS são numerosos, assim como os defeitos imunológicos de linfócitos T (50–52). No nível celular, os defeitos dos linfócitos T incluem a citoarquitetura anormal da superfície celular, documentada por microscopia eletrônica de varredura e caracterizada pela escassez de projeções de superfície microvilosa encontradas em linfócitos normais do sangue (53). No nível molecular, os defeitos dos linfócitos T WAS incluem a redução na quantidade (54,55).

Neste estudo, comparamos uma coorte de pacientes suspeitos de IDP, com casos confirmados de WAS, e controles saudáveis, medindo a proliferação linfocitária usando os três métodos diferentes: FASCIA, EdU e [3H]-timidina. O objetivo final foi demonstrar o desempenho das metodologias baseadas na citometria de fluxo em paralelo com o padrão ouro [3H]-timidina. Além disso, avaliamos a sensibilidade e a especificidade desses métodos citoprofluorométricos para a identificação de pacientes com WAS e sua aplicabilidade na coorte de pacientes suspeitos de IDP.

4. Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

Esse projeto é uma parte de um projeto guarda-chuva, intitulado “Estratégia inovadora de terapia gênica, sítio-dirigida, baseada em CRISPR/Cas, para imunodeficiências primárias”, o qual já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em 16/06/2015 (CAAE: 42934815.4.0000.5269). Uma vez que esse projeto está financiado pela FAPERJ - APQ1 2014, temos capacidade orçamentária para a realização de todos os experimentos necessários para esse estudo.

4.2 Desenho do estudo

Estudo de teste diagnóstico.

4.3 População de estudo

A população de estudo envolve crianças e adolescentes de 0 a 19 anos, suspeitas de imunodeficiência primária, que são rotineiramente avaliadas clinicamente através do questionário apresentado como apêndice 2 que contém informações relevantes ao imunologista clínico (ficha de coleta de dados clínicos desenvolvida pelo Serviço de Alergia e Imunologia do IPPMG/UFRJ). Os pacientes são encaminhados pelo Setor de Alergia e Imunologia do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ), atendidos pela Dra. Flávia Amendola Anisio de Carvalho; Setor de Alergia e Imunologia do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ), atendidos pela Dra. Fernanda Pinto Mariz e a Dra. Ekaterine Goudouris; Hospital dos Servidores do Estado, atendidos pela Dra. Mônica Soares de Sousa; e Hospital Federal da Lagoa, atendidos

pela Dra. Patrícia Carvalho Batista Miranda. A inclusão dos casos é realizada através da apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ver apêndice 1).

A coorte de indivíduos estudados nesse projeto seguiram os seguintes critérios de inclusão: crianças e adolescentes suspeitas de imunodeficiência primária, com comprometimento linfocitário. E como critérios de exclusão: crianças e adolescentes com imunodeficiências secundárias de acordo com ESID (Sociedade Européia de Imunodeficiência) e IUIS (Sociedades Internacionais de Imunologia); e presença de infecção no momento da coleta.

50 pacientes com suspeita diagnóstica para IDP foram incluídos submetidos às metodologias de avaliação funcional no Laboratório de Alta Complexidade do Instituto Fernandes Figueira (LACIFF), multi-usuário e com nível de biossegurança 2 (NB-2); e no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada (LBMA), onde atividades de biologia celular e molecular, como cultivo celular, isolamento de material genético e citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer - Applied Biosystems) foram plenamente realizados.

Todos os ensaios foram realizados em paralelo com células de indivíduos saudáveis como controle.

4.4 Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico

O sangue periférico total foi lisado com solução esterilizada de lise de eritrócitos (contendo 8,02g de cloreto de amônio, 0,84g de bicarbonato de sódio e 0,39g de EDTA diluído em 1L de água Milli-Q, pH: 7,2) por 10 minutos à 37°C, lavado duas vezes e

ressuspendido em meio RPMI 1640 completo (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, California, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GE Healthcare - Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) contendo 1% penicilina/streptomicina (Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA).

4.5 Ensaio proliferativo celular

O ensaio proliferativo foi realizado através do plaqueamento de 0,2 milhões de leucócitos, em uma placa de 96 poços, contendo estímulos policlonais, como a fitohemaglutinina (PHA - 10µg/mL), pokeweed mitogen (PWM - 5µg/mL) e beads magnéticas contendo anticorpos anti-CD3/CD28 (10µg/mL). Essa placa foi incubada à 37°C contendo 5% de CO₂ por 72 horas. Após esse período, 10µM de EdU e 1µCi de [3H]-timidina foi adicionado aos seus respectivos poços e a placa volta a ser incubada por mais 18 horas.

4.5.1 Ensaio EdU

Após o período de incorporação da molécula EdU, procedemos à fixação seguida da permeabilização da membrana celular, seguindo o protocolo específico do kit Click-iT® EdU (Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA). A aquisição e a análise são feitas pela citometria de fluxo (Attune® flow cytometer - Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA) através da fluorescência gerada pelo canal específico compatível com a detecção Pacific Blue (56).

4.5.2 [3H]-timidina

Durante as últimas 18 horas de cultivo celular, após a adição de 1µCi de [3H]-timidina, a cultura foi levada para um equipamento chamado microbeta filtermat-96

cell harvester (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), e a atividade radioativa é medida por níveis de contagem de cintilação utilizando um MicroBeta Microplate Counter System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

4.5.3 Ensaio FASCIA

Após as 90 horas de incubação (72 horas + 18 horas) à 37°C contendo 5% de CO₂, a aquisição e análise é feita através da quantificação de linfoblastos na citometria de fluxo (Attune® flow cytometer - Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA).

4.6 Sequenciamento do gene WAS

O DNA genômico é obtido a partir do sangue total através do Kit QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN – Hilden, Alemanha). Para a reação de PCR do DNA genômico foi utilizado primers para o gene WAS e condições de ciclagem de acordo com Jin et al (57). Os produtos de PCR foram purificados através do kit Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen by Life Technologies – California, EUA). As reações de sequenciamento foram preparadas com 3,2 pmol de primers e BigDye terminator cycle sequencing (Applied Biosystems - Foster City, CA), e o eletroferograma foi gerado no programa ABI Prism 3730 xl (Applied Biosystems - Foster City, CA). O resultado do sequenciamento foi analisado no programa BioEdit software com o objetivo de identificar possíveis mutações.

4.7 Marcação intracelular para WASP

Primeiramente as células são fixadas em 4% de paraformaldeído em PBS e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e posteriormente permeabilizadas em 0,1% de Saponina em PBS (pH 7.4) e incubadas por 5 minutos. Após isso, essas

células vão reagir com 10 µg/ml de anticorpo anti-WASP (Purified mouse Anti-Human Wiskott-Aldrich Syndrome Protein; Clone: 5A5 – BD Biosciences - San Jose, CA) por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas e incubadas com 10µg/ml de anticorpo PE Goat anti-mouse IgG (BioLegend – San Diego, CA) por 30 minutos. As células marcadas são imediatamente analisadas na citometria de fluxo (Attune® flow cytometer - Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA). Para as configurações de citometria e controle interno, um tubo foi marcado apenas com anticorpo PE-coupled goat anti-mouse IgG. Todas as análises foram feitas em paralelo com um doador saudável para determinar uma expressão normal da WASP intracelular (58).

4.8 Escore Clínico

Quando possível, foi atribuído aos pacientes uma pontuação baseada na gravidade clínica da doença, escore, utilizando um sistema de pontuação previamente descrito (59,60). Resumidamente, uma pontuação de 1 foi atribuída a pacientes com trombocitopenia isolada e pequenas plaquetas (61). A pontuação de 2 foi atribuída a pacientes com microtrombocitopenia com história de eczema localizado que respondeu prontamente à terapia padrão e/ou ocasionalmente sofria de infecções respiratórias superiores não complicadas. A pontuação de 3 foi dada quando ambos os critérios, eczema terapêutico-responsivo e infecções freqüentes que requerem antibióticos intermitentes, estavam presentes. Uma pontuação de 4 foi atribuída a pacientes com microtrombocitopenia, eczema persistente e difícil de tratar que requerem tratamento contínuo com pomada de esteróide e, ocasionalmente, antibióticos orais para superinfecção do eczema e/ou infecções graves que podem comprometer a vida, que podem incluir abscessos, pneumonia Incluindo Pneumocystis carinii pneumonia),

meningite, sepse e recorrente herpes simplex infecção. A pontuação de 5 foi atribuída a pacientes WAS que desenvolveram auto-imunidade ou malignidade.

4.9 Análise estatística

A ANOVA unidirecional com o pós-teste de Bonferroni foi utilizada para determinar as correlações bivariadas quando comparados os casos suspeitos, os pacientes WAS e os controles saudáveis. Para comparações de metodologias de proliferação foram aplicados o teste de correlação de Spearman. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism versão 6.00 para Windows, Software GraphPad - La Jolla Califórnia EUA. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

5. Referências:

1. Bonilla FA, Geha RS. 12. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2017 Jan 12];111(2 Suppl):S571–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12592303>
2. Modell V. The impact of physician education and public awareness on early diagnosis of primary immunodeficiencies: Robert A. Good Immunology Symposium. *Immunol Res* [Internet]. 2007 [cited 2017 Jan 12];38(1-3):43–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17917007>
3. Taghon T, Van de Walle I, De Smet G, De Smedt M, Leclercq G, Vandekerckhove B, et al. Notch signaling is required for proliferation but not for differentiation at a well-defined beta-selection checkpoint during human T-cell development. *Blood* [Internet]. 2009 Apr 2 [cited 2017 Jan 12];113(14):3254–63. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-07-168906>
4. Stone KD, Feldman HA, Huisman C, Howlett C, Jabara HH, Bonilla FA. Analysis of *in vitro* lymphocyte proliferation as a screening tool for cellular immunodeficiency. *Clin Immunol* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Jan 12];131(1):41–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19121607>
5. Taylor JH, Woods PS, Hughes WL. THE ORGANIZATION AND DUPLICATION OF CHROMOSOMES AS REVEALED BY AUTORADIOGRAPHIC STUDIES USING TRITIUM-LABELED THYMIDINE. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1957 Jan 15 [cited 2017 Mar 6];43(1):122–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16589984>
6. Messele T, Roos MT, Hamann D, Koot M, Fontanet AL, Miedema F, et al. Nonradioactive techniques for measurement of *in vitro* T-cell proliferation: alternatives to the [(3)H]thymidine incorporation assay. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. 2000 Jul [cited 2017 Feb 12];7(4):687–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882673>
7. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* [Internet]. 2002 May 3 [cited 2017 Mar 6];67(9):3057–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975567>
8. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2017 Mar 6];120(4):776–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17952897>
9. Buckley RH. Immunoglobulin G subclass deficiency: fact or fancy? *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2002 Sep;2(5):356–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165200>

10. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol* [Internet]. 2010 May [cited 2017 Mar 6];71(5):317–28. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3083.2010.02386.x>
11. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol* [Internet]. 2007 Sep 23 [cited 2017 Mar 6];27(5):497–502. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-007-9103-1>
12. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* [Internet]. 2015 Nov 19 [cited 2017 Mar 6];35(8):696–726. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10875-015-0201-1>
13. BUCKLEY R. Primary immunodeficiency or not? Making the correct diagnosis. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2006 Apr [cited 2017 Mar 6];117(4):756–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16630930>
14. Elder ME. T-cell immunodeficiencies. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2000 Dec [cited 2017 Mar 6];47(6):1253–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11130995>
15. Müller SM, Friedrich W. Stem cell transplantation for treatment of primary immunodeficiency disorders. *Iran J Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2017 Mar 6];4(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301416>
16. Arason GJ, Jorgensen GH, Ludviksson BR. Primary immunodeficiency and autoimmunity: lessons from human diseases. *Scand J Immunol* [Internet]. 2010 May [cited 2011 Aug 24];71(5):317–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20500682>
17. Carneiro-Sampaio M, Jacob CMA, Leone CR. A proposal of warning signs for primary immunodeficiencies in the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol* [Internet]. 2011 May [cited 2017 Mar 6];22(3):345–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3038.2010.01084.x>
18. Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 2014 Apr 26 [cited 2017 Mar 7];46(2):154–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12016-014-8412-4>
19. Chinen J, Notarangelo LD, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology in 2013. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 Apr [cited 2017 Jan 12];133(4):967–76. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674914001821>
20. Grunebaum E, Mazzolari E, Porta F, Dallera D, Atkinson A, Reid B, et al. Bone

- Marrow Transplantation for Severe Combined Immune Deficiency. *JAMA* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2017 Jan 12];295(5):508. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16449616>
21. NOWELL PC. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* [Internet]. 1960 May [cited 2017 Jan 12];20:462–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14427849>
 22. Dupont B, Good RA. Lymphocyte transformation in vitro in patients with immunodeficiency diseases: use in diagnosis, histocompatibility testing and monitoring treatment. *Birth Defects Orig Artic Ser* [Internet]. 1975 [cited 2017 Jan 12];11(1):477–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/50099>
 23. Wilson DB, Blyth JL, NOWELL PC. Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. 3. Kinetics of the response. *J Exp Med* [Internet]. 1968 Nov 1 [cited 2017 Mar 7];128(5):1157–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5682942>
 24. Rew DA, Wilson GD. Cell production rates in human tissues and tumours and their significance. Part 1: an introduction to the techniques of measurement and their limitations. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2017 Jan 12];26(3):227–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753534>
 25. Bading JR, Shields AF. Imaging of cell proliferation: status and prospects. *J Nucl Med* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2017 Jan 12];49 Suppl 2(Suppl_2):64S – 80S. Available from: <http://jnm.snmjournals.org/cgi/doi/10.2967/jnumed.107.046391>
 26. Lindegren M, Lou M, Kobrynski L, Rasmussen SA, Moore CA, Grosse SD, Vanderford ML, et al. Applying public health strategies to primary immunodeficiency diseases: a potential approach to genetic disorders. *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports* [Internet]. 2004 Jan 16 [cited 2017 Jan 12];53(RR-1):1–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14724556>
 27. de Vries E, European Society for Immunodeficiencies (ESID) members. Patient-centred screening for primary immunodeficiency, a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists: 2011 update. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 Jan 12];167(1):108–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2011.04461.x>
 28. Sawada S, Asakura S, Daimon H, Furihata C. Comparison of autoradiography, liquid scintillation counting and immunoenzymatic staining of 5-bromo-2'-deoxyuridine for measurement of unscheduled DNA synthesis and replicative DNA synthesis in rat liver. *Mutat Res* [Internet]. 1995 Oct [cited 2017 Mar 7];344(3-4):109–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491128>
 29. Macallan DC, Fullerton CA, Neese RA, Haddock K, Park SS, Hellerstein MK. Measurement of cell proliferation by labeling of DNA with stable isotope-labeled glucose: studies in vitro, in animals, and in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 Jan 20 [cited 2017 Mar 7];95(2):708–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435257>

30. Lis H, Sharon N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev [Internet]*. 1998 Apr 2 [cited 2017 Mar 7];98(2):637–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11848911>
31. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology [Internet]*. 2004 Nov 30 [cited 2017 Mar 7];14(11):53R – 62R. Available from: <https://academic.oup.com/glycob/article-lookup/doi/10.1093/glycob/cwh122>
32. Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E, et al. A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood [Internet]*. 1994 Dec 15 [cited 2017 Jan 12];84(12):4234–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7994037>
33. Dean JH, Connor R, Herberman RB, Silva J, McCoy JL, Oldham RK. The relative proliferation index as a more sensitive parameter for evaluating lymphoproliferative responses of cancer patients to mitogens and alloantigens. *Int J cancer [Internet]*. 1977 Sep 15 [cited 2017 Mar 7];20(3):359–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/143457>
34. Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods [Internet]*. 1985 Sep 3 [cited 2017 Jan 14];82(1):169–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3897381>
35. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science [Internet]*. 1982 Oct 29 [cited 2017 Jan 12];218(4571):474–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7123245>
36. Rakic P. Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat Rev Neurosci [Internet]*. 2002 Jan 1 [cited 2017 Mar 7];3(1):65–71. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn700>
37. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods [Internet]*. 1983 Dec 16 [cited 2017 Mar 7];65(1-2):55–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>
38. Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods [Internet]*. 1994 May 2 [cited 2017 Jan 14];171(1):131–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8176234>
39. Gaines H, Andersson L, Biberfeld G. A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods [Internet]*. 1996 Sep 9 [cited 2017 Mar 7];195(1-2):63–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8814321>
40. Barna BP, Culver DA, Yen-Lieberman B, Dweik RA, Thomassen MJ. Clinical application of beryllium lymphocyte proliferation testing. *Clin Diagn Lab Immunol*

- [Internet]. 2003 Nov [cited 2017 Mar 7];10(6):990–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607857>
41. Buck SB, Bradford J, Gee KR, Agnew BJ, Clarke ST, Salic A. Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* [Internet]. 2008 Jun [cited 2017 Jan 14];44(7):927–9. Available from: <http://www.biotechniques.com/article/000112812>
 42. Rostovtsev V V., Green LG, Fokin V V., Sharpless KB. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2002 Jul 15 [cited 2017 Mar 7];41(14):2596–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12203546>
 43. Peavy DL, Baughn RE, Musher DM. Mitogenic activity of bacterial lipopolysaccharides in vivo: morphological and functional characterization of responding cells. *Infect Immun* [Internet]. 1978 Jan [cited 2017 Mar 7];19(1):71–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/342416>
 44. Fleisher TA. Back to basics: primary immune deficiencies: windows into the immune system. *Pediatr Rev* [Internet]. 2006 Oct [cited 2017 Mar 7];27(10):363–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012486>
 45. Sullivan KE, Mullen CA, Blaese RM, Winkelstein JA. A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr* [Internet]. 1994 Dec [cited 2017 Jan 14];125(6 Pt 1):876–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996359>
 46. Lemahieu V, Gastier JM, Francke U. Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Hum Mutat* [Internet]. 1999 [cited 2017 Feb 6];14(1):54–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291098-1004%281999%2914%3A1%3C54%3A%3AAID-HUMU7%3E3.0.CO%3B2-E>
 47. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* [Internet]. 1994 Aug 26 [cited 2017 Feb 6];78(4):635–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069912>
 48. Nonoyama S, Ochs HD. Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep* [Internet]. 2001 Sep [cited 2017 Jan 14];1(5):430–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11892069>
 49. Thrasher AJ. Wasp in immune-system organization and function. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2002 Sep [cited 2017 Mar 7];2(9):635–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209132>
 50. Cooper MD, Chae HP, Lowman JT, Krivit W, Good RA. Wiskott-Aldrich syndrome. An immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. *Am J Med* [Internet]. 1968 Apr [cited 2017 Mar 7];44(4):499–513. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4171085>
 51. Oppenheim JJ, Blaese RM, Waldmann TA. Defective lymphocyte transformation

- and delayed hypersensitivity in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol [Internet]*. 1970 Apr [cited 2017 Mar 7];104(4):835–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4986478>
52. Rosen FS, Cooper MD, Wedgwood RJP. The Primary Immunodeficiencies. *N Engl J Med [Internet]*. 1984 Aug 2 [cited 2017 Mar 7];311(5):300–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6429535>
 53. Kenney D, Cairns L, Remold-O'Donnell E, Peterson J, Rosen FS, Parkman R. Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood [Internet]*. 1986 Dec [cited 2017 Mar 7];68(6):1329–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3779101>
 54. Parkman R, Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Perrine S, Rosen FS. Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet (London, England) [Internet]*. [cited 2017 Mar 7];2(8260-61):1387–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6118760>
 55. Reisinger D, Parkman R. Molecular heterogeneity of a lymphocyte glycoprotein in immunodeficient patients. *J Clin Invest [Internet]*. 1987 Feb 1 [cited 2017 Mar 7];79(2):595–9. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/112852>
 56. Poujol F, Monneret G, Friggeri A, Rimmelé T, Malcus C, Poitevin-Later F, et al. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J Immunol Methods [Internet]*. 2014 Dec 15 [cited 2017 Feb 6];415:71–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175914002920>
 57. Jin Y, Mazza C, Christie JR, Giliani S, Fiorini M, Mella P, et al. Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood [Internet]*. 2004 Dec 15 [cited 2017 Feb 6];104(13):4010–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-05-1592>
 58. Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, Hashimoto S, Kunikata T, Arai S, et al. Deficient expression of Bruton's tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood [Internet]*. 1998 Jan 15 [cited 2017 Feb 6];91(2):595–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427714>
 59. Zhu Q, Zhang M, Blaese RM, Derry JM, Junker A, Francke U, et al. The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood [Internet]*. 1995 Nov 15 [cited 2017 Feb 6];86(10):3797–804. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579347>
 60. Ochs HD. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Isr Med Assoc J [Internet]*. 2002 May [cited 2017 Feb 6];4(5):379–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040832>
 61. Schwartz M, Békássy A, Donnér M, Hertel T, Hreidarson S, Kerndrup G, et al. Mutation spectrum in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked

- thrombocytopenia: identification of twelve different mutations in the WASP gene. Thromb Haemost [Internet]. 1996 Apr [cited 2017 Mar 7];75(4):546–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743175>*
62. Marits P, Wikström A-C, Popadic D, Winqvist O, Thunberg S. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clin Immunol [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 Jan 14];153(2):332–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661614001478>*
63. Gowans JL, McGregor DD. *The Immunological Activities of Lymphocytes*. Karger Publishers; 1964 [cited 2017 Mar 15]. p. 1–78. Available from: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000385896>
64. Teague TK, Munn L, Zygourakis K, McIntyre BW. Analysis of lymphocyte activation and proliferation by video microscopy and digital imaging. *Cytometry [Internet]. 1993 Oct [cited 2017 Mar 15];14(7):772–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243206>*
65. Hicks MJ, Jones JF, Thies AC, Weigle KA, Minnich LL. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte function from birth to old age. *Am J Clin Pathol [Internet]. 1983 Aug [cited 2017 Mar 9];80(2):159–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6881090>*

Capítulo 2 - Artigo

Cytometry-based proliferation assay using EdU incorporation inversely correlates with clinically severe PID

Juliana Cantagalli Pfisterer, MSc¹, Flávia Amendola Anísio de Carvalho, MD¹, Fernanda Pinto Mariz, MD, PhD², Ekaterine Goudouris, MD, PhD², Mônica Soares de Sousa, MD³, Patrícia Carvalho Batista Miranda, MD⁴, Natalia Rocha do Amaral, MD⁵, Ana Carolina Carioca da Costa, MSc, PhD¹, Zilton Farias Meira de Vasconcelos, MSc, PhD^{*1}.

¹ Fernandes Figueira Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

² Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

³ Federal Hospital for State Employees, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴ Federal Hospital of Lagoa, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵ Children's State Hospital, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author:

Zilton Farias Meira de Vasconcelos, MSc PhD

Public Health Researcher

Fernandes Figueira Institute, Fiocruz

Avenida Rui Barbosa 716, Flamengo, Rio de Janeiro/RJ, Brazil

CEP: 22250-020.

Telephone: +55 21 25541919

Fax: +55 21 25541911

E-mail: zvasconcelos@iff.fiocruz.br

Abstract

Primary immunodeficiencies (PID) are rare genetic diseases for which stepwise and complex clinical and laboratory diagnosis workflows need to be implemented. The assessment of lymphocyte response to mitogen stimulation is usually tested during clinical screening for PID since it can reveal lymphocyte defects common to many PID entities. The gold standard assay for lymphocyte proliferation is based on [3H]-thymidine incorporation. Different flow cytometry based approaches have been proposed as non-radioactive alternatives to quantify lymphocyte proliferation. To date, only the FASCIA methodology has been evaluated in the context of the PID, yielding consistent data for the diagnosis of severe combined immunodeficiency (SCID) cases. To further test the sensitivity of flow cytometry based approaches, we here focused on PID patients with an expected moderate lymphocyte proliferation defect. We selected patients with a suspected or confirmed Wiskott-Aldrich syndrome diagnosis and compared FASCIA and EdU (5-ethynyl-2 'deoxyuridine-EdU) to [3H]-thymidine incorporation to assess their lymphocyte proliferation. Our results demonstrate a better correlation between EdU and [3H]-thymidine incorporation when compared to the FASCIA methodology. In addition, lymphocyte proliferation upon PHA (phytohemagglutinin) stimulation presented strong sensitivity and specificity for WAS (Wiskott-Aldrich Syndrome) patients evaluation when EdU 26% cut-off value was applied. Cluster analysis of suspected PID patients, coupling a score system (IDR), previously used for PID subject identification, together with proliferative status, allowed to inversely correlate clinical status and EDU% PHA proliferation. We conclude that the EdU methodology, applied to PHA-stimulated PBMC, is indicated for the non-radioactive evaluation of lymphocyte proliferation in the context of primary immunodeficiencies.

Keywords: Lymphoproliferative assay; Flow cytometry; Primary Immunodeficiency; Wiskott-Aldrich Syndrome; IDR; Cluster Analysis; [3H]-thymidine.

Introduction

Primary immunodeficiencies (PID) represent a heterogeneous group of approximately 300 rare genetic diseases characterized by a functionally altered or absent immune response, which results in increased susceptibility to recurrent infections with consequent impairment of the immune system[1] . The diagnosis is difficult because of the interpretation of these manifestations, which may be confused with transient and/or less severe infections, and due to the wide phenotypic variation associated with diverse clinical manifestation of the disease[2] . Laboratory investigation usually begins with complete blood count and immunoglobulin levels that are done in combination with analysis of the complement system and enumeration of lymphocyte subsets. However, this test panel in most cases is not enough to associate clinical symptoms with a specific type of PID[3] . Altogether, a stepwise and complex clinical and laboratory diagnosis workflow should be establish to determine lack of specific cellular function or cell subtype, or even a more specific molecular lesion[2, 4] .

Among the PIDs that causes proliferative defects, Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS) is known to present T cell signaling and cytoskeleton reorganization impairments that results in substantial lymphocytes proliferative defects[5, 6] . Clinically, WAS is a rare X-linked immunodeficiency disorder characterized by thrombocytopenia and small platelets, eczema, recurrent infections, and increased risk for autoimmunity and malignancy[6] . Genetically, WAS is caused by mutations in the WAS gene (OMIM 300392) encoding the WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) protein[7, 8] which is expressed selectively in hematopoietic stem cell-derived lineages[9] .

One step further on immunological laboratory evaluations are *in vitro* lymphocyte proliferation tests. Those tests are useful to understand specific and polyclonal dysfunctional responses displayed by some PID patients and further immune monitoring after treatment[4, 10] . Due to its good sensitivity and reproducibility, the [3H]-thymidine incorporation assay is considered to be

the gold standard for cell proliferation measurement in clinical settings and is recommended by experts for the diagnosis of lymphocyte proliferative defects[10] . Reduced [3H]-thymidine uptake may be due to: a) reduced rate of division of all T cells, b) normal responsiveness of only a fraction of T cells, and c) a smaller representation of T cells among peripheral blood leucocytes, or a combination of these[11, 12] . Flow cytometry-based proliferative assays appear to be a safe alternative for diagnostic tests, desirable for clinical laboratory settings. The use of Ki-67 molecule was initially proposed, once it selectively react with the nucleic of proliferating cells in all human tissues tested[13] and was demonstrated during *in vitro* lymphocyte proliferation[14] . Proliferation was also monitored using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dye dilution occurring proportionally at every cell division[14, 15] . Strategies with incorporation of the nucleoside analog 5-bromodeoxyuridine (BrdU) was tested, however, BrdU detection requires strong denaturing conditions that hinders analysis of the other cell antigens and causes variability in the staining intensity[16–18] . Recently, a new DNA base analog (5-ethynyl-2'deoxyuridine-EdU) has been described overcoming those issues[19–21] . Lastly, Marits et al. reported a non-radioactive flow cytometry-based proliferative assay called "Flow-cytometric Assay for Specific Cell-mediated Immune-response in Activated Whole Blood" or "FASCIA" in clinical practice, where total amount of lymphoblasts could be used to evaluate lymphocytes stimulated with mitogens[14, 22] .

In this study, we compared a cohort of patients suspected of PID, with confirmed cases of WAS, and healthy controls, measuring lymphocyte proliferation using three different methods: FASCIA, EdU and [3H]-thymidine uptake. The final aim was to compare flow cytometry-based methodologies in comparison to the gold standard [3H]-thymidine uptake. Additionally, we evaluated sensitivity and specificity of these cytofluorometric methods for WAS patients identification and their applicability in a cohort of suspected PID patients.

Methods

Patients and health controls:

Heparinized peripheral blood samples were taken from 50 children's, between 0 and 19 years old, enrolled by Allergy and Immunology Departments from Rio de Janeiro PID network under PID clinical investigation. All patient samples were assayed together with healthy control samples (n=36). All patients and healthy controls were enrolled after specific informed consent signature and all clinical data and procedures were performed in accordance with our Institutional Review Board (IRB number 42934815.4.0000.5269).

Leucocyte enrichment:

Total peripheral blood were incubated with sterile erythrocyte lysing solution (Containing 8.02g of ammonium chloride, 0.84g of sodium bicarbonate and 0.39g of EDTA-tetrasodium diluted in 1L of Milli-Q water, pH: 7.2) during 10 minutes at 37°C, washed twice and resuspended with RPMI 1640 complete medium (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GE Healthcare - Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) and 2mM of L-glutamine (Thermo Fisher Scientific Carlsbad, California, USA) containing 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific - arlsbad, California, USA).

Lymphocyte proliferation assays:

Proliferative assays were performed by plating 0.2 million leucocytes cells in a 96 well plate containing polyclonal stimuli such as phytohemagglutinin (PHA - 10µg/mL from Sigma Aldrich, Missouri, USA), pokeweed (PWM - 5µg/mL from Sigma Aldrich, Missouri, USA) and magnetic beads containing anti-CD3/CD28 (1:1 beads to cells ratio from Thermo Fisher Scientific Carlsbad, California, USA). This plate was incubated at 37°C with 5% CO₂ for 72 hours. After this period, EdU (10µM) or [3H]-thymidine (1µCi) was added to their respective wells and the incubation continued for another 18 hours.

EdU staining and analysis:

After EdU incorporation period, we proceeded to fixation followed by cell membrane permeabilization, following Click-iT® EdU kit specific staining protocol (Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA). The acquisition were done by Attune® flow cytometer (Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA), analyzing fluorescence generated by specific channel compatible with Pacific Blue detection [23] .

[3H]-thymidine detection:

For the last 18 hours of cell cultivation after 1µCi of [3H]-thymidine addition, cells were harvested by microbeta filtermat-96 cell harvester (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and 3H activity was measured by means of scintillation counting using MicroBeta Microplate Counter System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

FASCIA analysis:

After 90 hours of incubation (72 hours + 18 hours) at 37°C with 5% CO₂ atmosphere, acquisition was made through the quantification of lymphoblasts by Attune® flow cytometer (Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA), analyzing lymphocyte gated cell number based on FSC parameter.

WAS gene sequencing:

Genomic DNA is prepared from whole blood with the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN - Hilden, Germany). PCR of genomic DNA is performed using primers for WASP gene and cycling conditions according to Jin et al [24] . Amplicons are purified with Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit (Invitrogen by Life Technologies - California, USA). The sequencing reactions are performed with 3.2 pmol primers and BigDye terminator cycle

sequencing (Applied Biosystems - Foster City, CA), and chromatograms were generated on ABI Prism 3730 xl (Applied Biosystems - Foster City, CA). Sequencing data were analyzed on BioEdit software to identify WAS gene mutations.

WASP intracellular labeling:

Peripheral blood cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 30 minutes at room temperature, followed by permeabilization with 0.1% Saponin in PBS for 5 minutes. Subsequently, these fixed and permeabilized cells were incubated with 0.1 μ g of anti-WASP (Purified mouse Anti-Human Wiskott-Aldrich Syndrome Protein; Clone: 5A5-BD Biosciences - San Jose, CA) for 30 minutes at room temperature, washed twice with 0.1% saponin in PBS. Cells were then incubated with 0.1 μ g of PE-coupled goat anti-mouse IgG antibody (BioLegend - San Diego, CA) for 30 minutes followed by 2 washes with 0.1% saponin in PBS. The stained cells were immediately acquired by Attune® flow cytometer (Thermo Fisher Scientific - Carlsbad, California, USA), analyzing fluorescence generated by specific channel compatible with PE detection. For cytometric settings and internal specific controls, one tube were stained only with PE-coupled goat anti-mouse IgG antibody. All analyzes were done in parallel with a healthy donor for normal WASP intracellular expression determination [25].

WAS clinical scores:

According to the clinical severity of the disease, a WAS score was assigned to confirmed WAS patients using a previously described scoring system [26, 27]. Briefly, a score of 1 was assigned to patients with isolated thrombocytopenia and small platelets [28]. A score of 2 was assigned to patients with microthrombocytopenia who had a history of localized eczema that promptly responded to standard therapy and/or occasionally suffered from uncomplicated upper respiratory infections. A score of 3 was given when both criteria, therapy-responsive eczema and frequent

infections requiring intermittent antibiotics, were present. A score of 4 was assigned to patients with microthrombocytopenia, persistent and difficult-to-treat eczema requiring continuous treatment with steroid ointment and occasionally oral antibiotics for superinfection of the eczema, and/or severe life-threatening infections that may include abscesses, pneumonia including *Pneumocystis carinii* pneumonia, meningitis, sepsis, and recurrent herpes simplex infection. A score of 5 was assigned to patients with WAS who developed autoimmunity or malignancy.

Statistical analysis:

One-way ANOVA with Bonferroni's post-test was used to determine bivariate correlations when suspected cases, WAS patients and controls were compared. For proliferation methodologies comparisons were applied Spearman correlation test. ROC curves were constructed to evaluate sensitivity and specificity of all methods and stimuli. TwoStep Cluster Analysis tool from SPSS IBM Statistics version 22 was used to identify groups. One-way ANOVA with Dunnett's post-test was used to determine bivariate correlations when cluster groups were compared with WAS patients. All statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

Results

To establish flow cytometry-based cell proliferation assays (EdU and FASCIA) healthy control cells were stimulated or not with beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 72 hours. Some wells were pulsed with 10uM of EdU solution (Figure 1A) and others did not received any reagent for additional 18 hours of incubation. Figure 1A demonstrates increased fluorescence of the cells, stimulated in the presence of EdU after 18 hours of incorporation period

(right histogram) when compared to unstimulated cells (left histogram). In the FASCIA methodology (Figure 1B), the increase in the FSC parameter in cells present in the lymphocyte region indicates increased cell size in cells stimulated with anti-CD3/CD28 beads (right DotPlot) for 90 hours when compared to unstimulated cells (left DotPlot).

All patients and controls were then included to assess the correlation between flow cytometry-based proliferation methods with [3H]-thymidine. For this, we used Spearman's correlation analysis using data from all assays performed with anti-CD3/CD28 beads. According with Figure 2, the EdU methodology presents a “r” value of

0.8232 (A), which is higher than the FASCIA methodology, which presents an “r” equal to 0.7198 (B), both results presented statistical significance ($P < 0.0001$).

We next presented all lymphocyte proliferation tests data resulted from a series of adult healthy donors examined during this study. Table 1 results are separated by mitogen stimulus with mean and 5th-95th percentile range for all three methodologies.

During this study, 6 enrolled patients were molecularly characterized as carriers of WAS gene mutation (Table 2). To further investigate those cases, we performed intracellular staining for WASP using 5A5 antibody. Results were considered negative when WASP protein was completely absent and reduced when the protein was hypo-expressed in relation with a healthy control stained in parallel. From these 6 patients, 4 cases presented a complete negative intracellular WASP expression while 2 cases presented significant reduction in WASP expression. Also in table 2, the clinical status analysis from all WAS patients were done with 3 cases scoring 5, 2 cases scoring 4 and 1 case scoring 3. To complete our study, WAS patient lymphocyte proliferation was displayed as the percentage of EdU+ lymphocytes upon PHA, PWM (pokeweed) or anti-CD3/CD28 beads stimulation.

In order to demonstrate the efficiency of flow cytometry-based proliferation methods in differentiating patients with proliferative defects, we compared healthy controls and WAS patients by both EdU and FASCIA methodologies. Additionally, we stimulated and analyzed proliferative status of suspected PID cohort patients (Figure 3). In figure 3A, upper plots, when comparing PID suspects group with the control group using EdU methodology, we did not find any significant results for any of stimuli used. However, when WAS patients were compared with control group, a significant difference was found in assays using PHA and CD3/CD28 stimuli. Results obtained from WAS confirmed patients (true positives) and healthy controls (true negatives) were used to construct ROC curves where we could evaluate sensitivity and specificity of all methods and stimuli. In the same plot we calculated area under ROC curve (AUC) to understand overall performance in each comparison. When WAS patients are stimulated with PHA, we found an extremely high sensibility with reasonable sensitivity among these groups comparison, represented globally by AUC equal to 0. 857. Using a cut-off point of 26% EdU+ cells in this particular ROC curve, EdU proliferative test using PHA stimuli presented a sensitivity of 100% and specificity of 62.9%.

When the same analyzes were performed in the FASCIA methodology, figure 3B, it was not possible to observe any significant difference between the studied groups. Additionally, ROC curves from FASCIA methodologies also demonstrate worse performance when compared with EdU.

To further analyze our PID suspected group, we classify our cohort using IDR (Immunodeficiency-related) scoring system to investigate its relationship with proliferative status[29, 30] . To perform unbiased group identification we applied the TwoStep Cluster Analysis tool with our four continuous variables: IDR score, EDU% PHA, EDU% PWM and EDU% Anti-CD3/CD28. This algorithm found two different clusters of patients presenting

different IDR scoring. Surprisingly, the first cluster having significantly different IDR score from WASP confirmed patients (Figure 4 left plot) presented also better proliferative performance (Figure 4 right plot). On the other hand, second cluster of PID suspected patients were not different either using IDR score system or during PHA proliferative evaluation. More even, if we apply same 26% cut-off point determined previously by WASP patient group ROC analysis, a small amount of suspected patients could be misclassified (Figure 4 – Red spots and percentages). Likewise, most PID severe group proliferative responses presented EdU percentage values below proposed 26% EdU+ cells cut off point, very similar to WAS confirmed patients.

Discussion

The [3H]-thymidine uptake assay is still the gold standard for lymphocyte proliferative functional assessment in the context of immunocompromised patients. The most robust study for proliferative assays using PID patient samples was performed by Stone et al, where only [3H]-thymidine uptake were evaluated. They compared lymphocyte proliferative responses among 43 PID patients with T cell dysfunction; 426 suspected PID patients and 120 adult healthy controls. However, once PID represent a broad spectrum of pathologies with different defects known to affect immune system cells at different levels, to date no general correlation between *in vitro* T cell proliferation and clinical severity were possible[10] .

Nevertheless, clinical laboratories are pursuing alternatives to radioactive lymphocyte proliferative tests, objecting safety and lower toxic residual accumulation during laboratory manipulation[2, 4] . In addition, only non-radioactive methods using multiparametric platforms will allow evaluation of lymphocyte subtypes and barcoding techniques for parallel patient analyses. Those simultaneous evaluations can only be performed on devices such as flow cytometers[31] .

Our work started with a comparison between two nonradioactive proliferative assays, recently published by different research groups, with [3H]-thymidine uptake assay[10, 22, 23] . We performed lymphocyte proliferative tests among 3 different groups of individuals, suspected PID, confirmed WAS and healthy adult controls. Both flow cytometry-based assays, using EdU incorporation and FASCIA were simple and easily translated to clinical laboratory settings. Edu methodology resembles [3H]-thymidine uptake, once the fluorescence observed is related to a thymine analogue incorporation, during DNA synthesis, called 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU). These similarities might explain the better correlation performance between EdU and the radioactive methodology. In the same way, Poujol et al[23] when compared both methodologies found an even better correlation of 0.9084 but they were mainly enrolling septic and healthy donors with few PID suspects. On the other hand, FASCIA methodology is based on indirect measurement of proliferation, once it is related to lymphocyte blastic transformation process[32] . This phenomena occurs in activated lymphocytes that could be correlated but precedes, and do not necessarily define, cell cycling[33] . In our data, FASCIA assays presented lower correlation with the radioactive methodology, even though we corroborate Marits et al[22] findings where they reach a spearman r of 0.78 with 95% confidence interval.

In addition to correlation between flow cytometry-based methodologies, each patient sample was assayed in parallel with healthy individual control. When analyzed together those data allowed to demonstrate an extreme dispersion of lymphocyte proliferative response that are observed with different proliferative stimuli within this group of individuals. Beyond this variance, it is important to emphasize that our control group is composed by adult individuals, which mitogenic responses can be considered even more discrepant when compared with age-related PID group[10, 34] .

Knowing all limitations, we challenged both flow cytometry proliferative methodologies capacity to differentiate our 3 groups of individuals. After assessing lymphocyte proliferation values with all mitogen stimuli, we plotted results from true negative individuals (considering only healthy individuals) against true positive ones (considering only WAS confirmed patients). According to the literature, WAS patients have proliferative defects in lymphocytes, even with normal peripheral blood lymphocyte counts[24] . It was clear from data presented in figure 3, that the EdU methodology was extremely sensible to identify individuals with this pathology when their lymphocytes were stimulated with PHA. Furthermore, table 2 data on WAS patients characteristics suggests that WASP expression better correlates with proliferative defects than clinical score. It is important to emphasize here that the lymphoproliferative defect was detected in PID patients where T lymphocytes were present but dysfunctional, differently from Marits et al[22] report where they evaluated proliferation using SCID (severe combined immunodeficiency) patient samples who are extremely lymphopenic.

Finally, the use of lymphoproliferative assays as clinical laboratory diagnostic or screening tool for PID patients is a subject of extensive discussion at scientific community. In this sense, our goal was to evaluate a cohort of PID suspected patients enrolled by Rio de Janeiro PID network, doing flow cytometry lymphocyte subsets and specific intracellular stainings for initial clinical investigation and further gene sequencing mainly for X-linked diseases. This collaborative workgroup constituted by public hospitals permitted to start this specific project to investigate non-radioactive proliferative assays. Our initial data showed a large dispersion between proliferative *in vitro* responses with different mitogens. To overcome these obstacle we decided to perform a cluster analysis taking together all proliferative data obtained with EDU assay in association with a previously proposed scoring system for PID patients, called IDR score[35] . This cluster algorithm was able to segregate our suspected group in two clusters that were

compared with WASP patients. Surprisingly, patients that presented lower IDR scores and better proliferative marks after PHA stimulation were significantly different from WASP patients. Moreover, when the proposed cut-off point was evaluated in both clusters, most of patients were correctly segregated. Indeed, those results suggest a link between clinical condition and proliferative status and gives strength to PHA EDU% cut-off proposed.

Altogether, we could strongly suggest that PHA stimulation together with EdU incorporation methodology by flow cytometry performed better in our study design. This conclusion are based both on better correlation found with the gold standard [3H]-thymidine uptake assay and high sensitivity and specificity for WAS patients discrimination. Furthermore, this approach seems to properly identify, within a heterogeneous group of PID suspected patients, the ones with dysfunctional proliferative responses, especially on cases with clinical severe phenotypes. These findings open the possibility of using routinely flow cytometry EdU methodology as a non-radioactive option for clinical laboratories tracking lymphoproliferative defects in the context of primary immunodeficiency investigation.

Acknowledgements

We acknowledge the support of the FIOCRUZ Technological Platform Network for flow cytometry and molecular sequencing. We thank Letícia Guida and Leonardo Gomes for helpful discussions during this work. This work was supported by FAPERJ APQ-1 2014, PMA FIOCRUZ 2015. The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

J.C.P. performed all experimental assays, their analyses and wrote paper; F.A.A.C. performed the suspected PID patients follow up; F.P.M./E.G./M.S.S./P.C.B.M. performed WAS patients follow up; A.C.C.C. performed all statistical analysis; Z.V. designed the research, supervised the experiments, their analysis and wrote the paper.

References

- [1] **Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, et al.** Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front. Immunol.* 2014; 5; 162.
- [2] **Locke BA, Dasu T, Verbsky JW.** Laboratory Diagnosis of Primary Immunodeficiencies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2014; 46; 154–68.
- [3] **Chinen J, Notarangelo LD, Shearer WT.** Advances in basic and clinical immunology in 2014. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 135; 1132–41.
- [4] **Rosenzweig SD, Fleisher TA.** Laboratory evaluation for T-cell dysfunction. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131; 622–3.e4.
- [5] **Molina IJ, Sancho J, Terhorst C, et al.** T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J. Immunol.* 1993; 151; 4383–90.
- [6] **Cotta-de-Almeida V, Duprè L, Guipouy D, et al.** Signal Integration during T

Lymphocyte Activation and Function: Lessons from the Wiskott-Aldrich Syndrome.

Front. Immunol. 2015; 6; 47.

- [7] **Lemahieu V, Gastier JM, Francke U.** Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Hum. Mutat.* 1999; 14; 54–66.
- [8] **Derry JM, Ochs HD, Francke U.** Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 1994; 79; following 922.
- [9] **Nonoyama S, Ochs HD.** Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2001; 1; 430–7.
- [10] **Stone KD, Feldman HA, Huisman C, et al.** Analysis of in vitro lymphocyte proliferation as a screening tool for cellular immunodeficiency. *Clin. Immunol.* 2009; 131; 41–9.
- [11] **Fischer MB, Hauber I, Eggenbauer H, et al.** A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood* 1994; 84; 4234–41.
- [12] **Johnson JP, Hebel R, Shinaberry R.** Lymphoproliferative responses to mitogen and antigen in HIV-infected children. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1991; 7; 781–6.
- [13] **Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al.** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 1983; 31; 13–20.
- [14] **Lašťovička J, Rataj M, Bartůňková J.** Assessment of lymphocyte proliferation for diagnostic purpose: Comparison of CFSE staining, Ki-67 expression and (3)H-thymidine incorporation. *Hum. Immunol.* 2016; 77; 1215–22.

- [15] **Lyons AB, Parish CR.** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 1994; 171; 131–7.
- [16] **Rakic P.** PROGRESS Neurogenesis in adult primate neocortex: an evaluation of the evidence. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3; 65–71.
- [17] **Gratzner HG.** Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218; 474–5.
- [18] **Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S.** Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J. Immunol. Methods* 1985; 82; 169–79.
- [19] **Buck SB, Bradford J, Gee KR, et al.** Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 2008; 44; 927–9.
- [20] **Salic A, Mitchison TJ.** A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105; 2415–20.
- [21] **Chehrehasa F, Meedeniya ACB, Dwyer P, et al.** EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J. Neurosci. Methods* 2009; 177; 122–30.
- [22] **Marits P, Wikström A-C, Popadic D, et al.** Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clin. Immunol.* 2014; 153; 332–42.
- [23] **Poujol F, Monneret G, Friggeri A, et al.** Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation as a clinical

- alternative to tritiated thymidine uptake measurement. *J. Immunol. Methods* 2014; 415; 71–9.
- [24] **Jin Y, Mazza C, Christie JR, et al.** Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood* 2004; 104; 4010–9.
- [25] **Futatani T, Miyawaki T, Tsukada S, et al.** Deficient expression of Bruton’s tyrosine kinase in monocytes from X-linked agammaglobulinemia as evaluated by a flow cytometric analysis and its clinical application to carrier detection. *Blood* 1998; 91; 595–602.
- [26] **Zhu Q, Zhang M, Blaese RM, et al.** The Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked congenital thrombocytopenia are caused by mutations of the same gene. *Blood* 1995; 86; 3797–804.
- [27] **Ochs HD.** The Wiskott-Aldrich syndrome. *Isr. Med. Assoc. J.* 2002; 4; 379–84.
- [28] **Notarangelo LD, Mazza C, Giliani S, et al.** Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99; 2268–9.
- [29] **Cunningham-Rundles C, Sidi P, Estrella L, et al.** Identifying undiagnosed primary immunodeficiency diseases in minority subjects by using computer sorting of diagnosis codes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004; 113; 747–55.
- [30] **Yarmohammadi H, Estrella L, Doucette J, et al.** Recognizing Primary Immune Deficiency in Clinical Practice. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13; 329–32.
- [31] **Messele T, Roos MT, Hamann D, et al.** Nonradioactive techniques for measurement of in vitro T-cell proliferation: alternatives to the [(3)H]thymidine incorporation assay. *Clin.*

Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7; 687–92.

- [32] **Gowans JL, McGregor DD.** The Immunological Activities of Lymphocytes. vol. 9, Karger Publishers; 1964 p.1–78, p. 1–78.
- [33] **Teague TK, Munn L, Zygourakis K, et al.** Analysis of lymphocyte activation and proliferation by video microscopy and digital imaging. *Cytometry* 1993; 14; 772–82.
- [34] **Hicks MJ, Jones JF, Thies AC, et al.** Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte function from birth to old age. *Am. J. Clin. Pathol.* 1983; 80; 159–63.
- [35] **Reda SM, El-Ghoneimy DH, Afifi HM.** Clinical predictors of primary immunodeficiency diseases in children. *Allergy, Asthma {&} Immunol. Res.* 2013; 5; 88–95.

Table 1. Healthy donors' lymphocyte proliferation values from PHA, PWM and anti-CD3/CD28 beads stimulated leucocytes from peripheral blood.

Mitogen stimulus	Methodology (measurement)	N	Mean	Percentile (5% - 95%)
Anti-CD3/CD28	EdU (%)	35	49.5	0.5-88.4
	FASCIA (cells/uL)	36	100,246	9,029-230,514
	[3H]-thymidine (x10 ³)	14	2,311	64-4,552
PHA	EdU (%)	35	35.14	2.3-80.2
	FASCIA (cells/uL)	34	45,153	4,489-148,714
	[3H]-thymidine (x10 ³)	14	2,565	134-5,637
PWM	EdU (%)	36	11.9	1.9-42.6
	FASCIA (cells/uL)	36	66,623	13,203-192,114
	[3H]-thymidine (x10 ³)	14	1,009	50-2,879
All stimulus	EdU (%)	106	32.0	0.5-88.4
	FASCIA (cells/uL)	106	71,155	4,489-230,514
	[3H]-thymidine (x10 ³)	42	1,962	50-5,637

N: Number of patient; Edu: 5-ethynyl-2 'deoxyuridine-EdU; PHA: phytohemagglutinin; PWM: pokeweed; FASCIA: Flow cytometric Assay for Specific Cell-mediated Immune-response in Activated Whole Blood

Table 2. WAS patient characteristics

Pt	Exon or Intron	Mutation	Protein	Score	IC WASP	PHA	EDU% PWM	CD3/CD28
1	E2	g.8422_8429delCCTTCAGG	p.Gly125Ter	5	Negative	2.34	0.98	63.09
2	E10	c.1369G>T	p.Gly432X	5	Negative	0.60	0.25	0.11
3	E7	c.[763delA] + [764A>G]	p.Lys230>Gly.	4	Negative	2.37	1.33	2.63
4	E7	c.706 C>T	p.Arg211X	5	Reduced	24.32	18.48	18.16
5	E2	c.313delC	p.Gln80Lys	4	Reduced	21.06	4.96	7.33
6	I8-9	g.4301 G>A	p.Val260Met	3	Negative	3.05	1.00	4.89

Pt: patient; IC: intracellular; WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein; PHA: phytohemagglutinin; PWM: pokeweed; Edu: 5-ethynyl-2 'deoxyuridine-Edu.

Figure 1. Flow cytometry gating strategy. Results from one representative experiment are shown. The figure shows unstimulated or anti-CD3/28 stimulated proliferation. A: In EdU assay the peripheral blood leucocytes were either unstimulated (left histogram) or stimulated (right histogram) with anti-CD3/CD28 magnetic beads for 72 hours followed by incubation with 10 μ M of EdU during 18 hours. The positive fluorescence for EdU represented in the right chart indicates the amount of cells that incorporated the EdU molecule, indicating cell proliferation. B: In FASCIA assay the proliferating lymphoblasts are defined by size in forward scatter (FSC) after 90 hours of incubation with or without anti-CD3/CD28 magnetic beads stimulation, leucocyte region is marked in brown and lymphoblast region is surrounded in red.

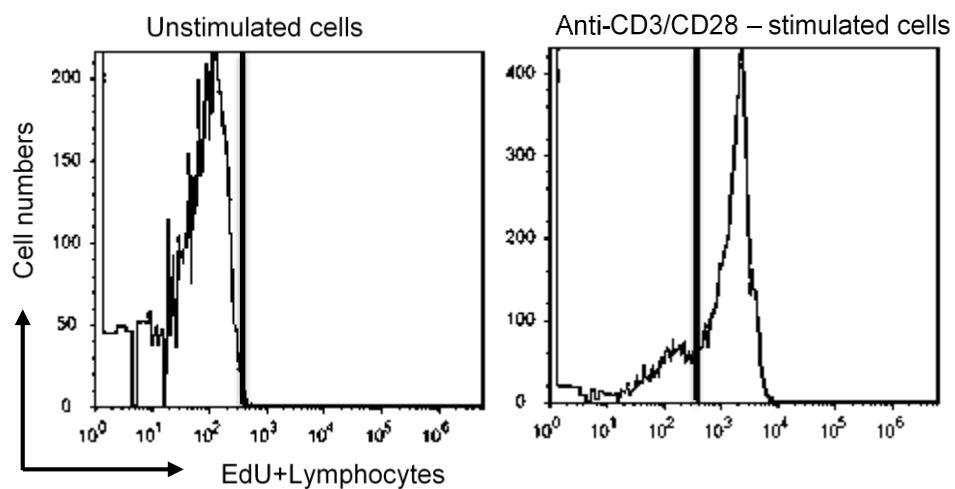
Figure 2. Spearman correlation between flow cytometry-based and [3H]-thymidine methods. Each point of graphics is one individual assayed for lymphocyte proliferation. A: Statistical correlation between the value of [3H]-thymidine assay and % of EdU positive cells (Spearman $r = 0.8232$) $n = 33$. B: Statistical correlation between the value of [3H]-thymidine assay and the proliferating lymphoblasts by FASCIA (Spearman $r = 0.7198$) $n = 34$.

Figure 3. Comparison of PID suspect patients, confirmed WAS patients, and healthy controls after anti-CD3/CD28 beads, PHA and PWM stimulus (upper plots) and ROC curves (lower plots) for each stimulus, for both methodologies Edu (A) and FASCIA (B). Analysis performed in 5 WAS patients, 43 suspected PID patients and 35 healthy controls. One-way ANOVA with Bonferroni's post-test statistical analyses were considered significant with $p < 0.05$.

Figure 4. TwoStep Cluster Analysis in suspected PID patients. Cluster 1 and cluster 2 patients were segregated based on IDR score, EDU% PHA, EDU% PWM and EDU% Anti-CD3/CD28. The left plot are comparing two clusters with WASP patients IDR score. The right plot are comparing both clusters with WASP patients proliferation after PHA stimulation. Red dots symbolizes patients beyond 26% EDU% PHA cut-off (percentages are based on total patients within the cluster patient group). A confidence interval of 95%. Significant difference when $p = <0.01$.

Figure 1.

A



B

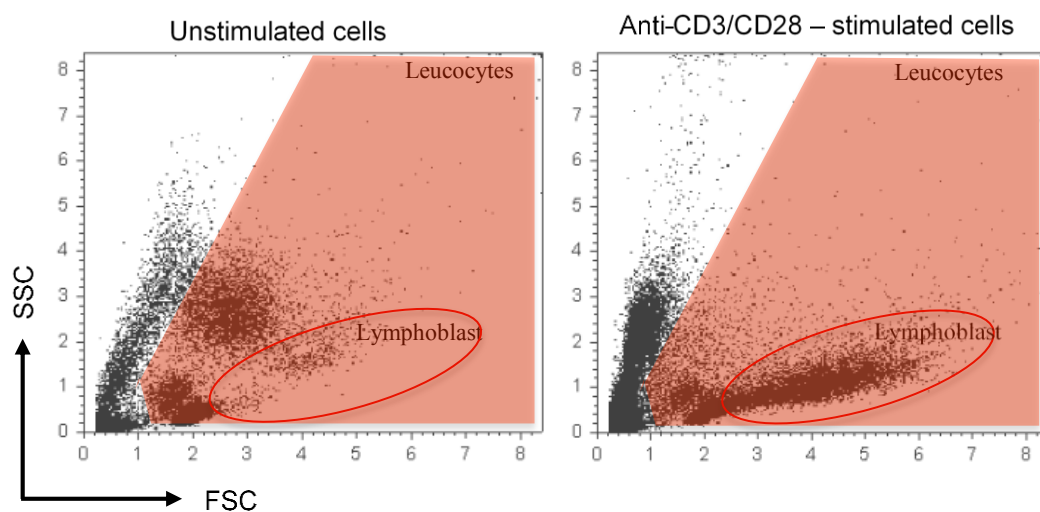
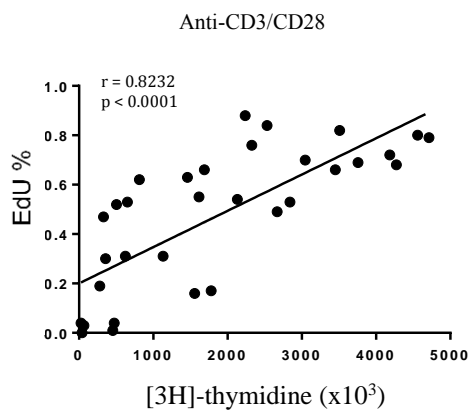


Figure 2.

A



B

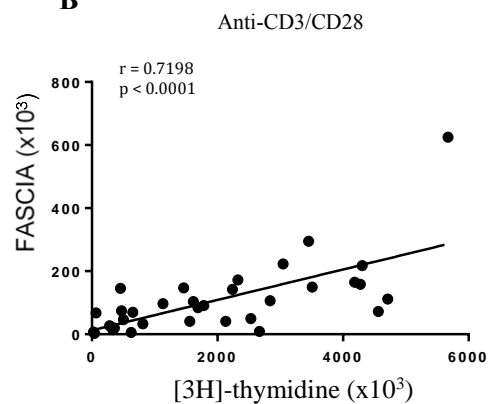
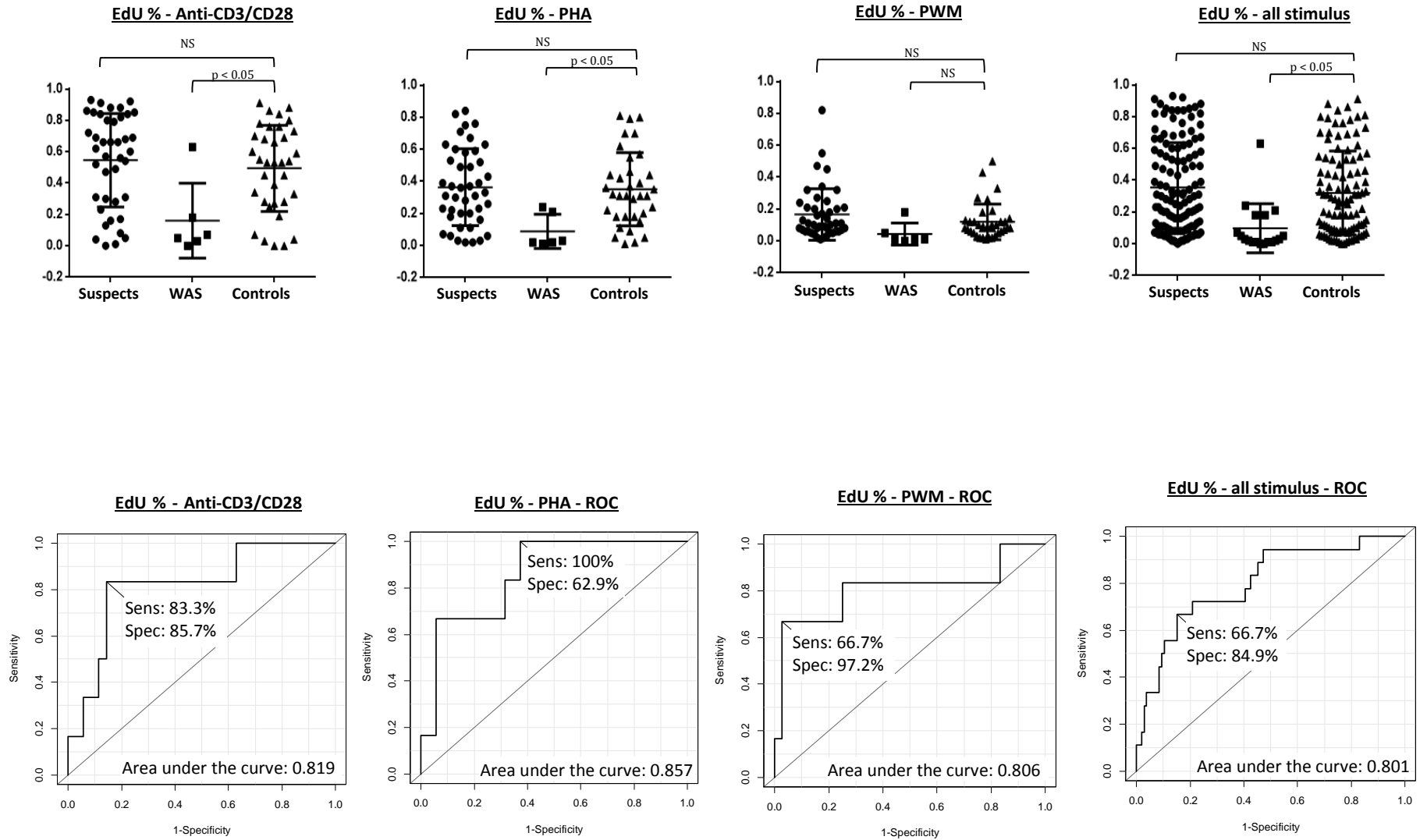


Figure 3.

A



B

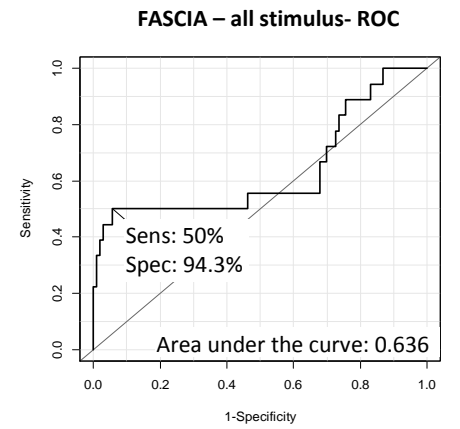
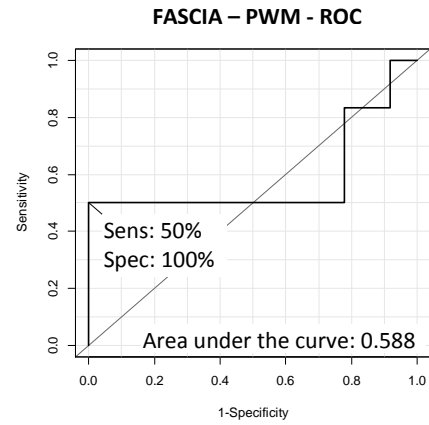
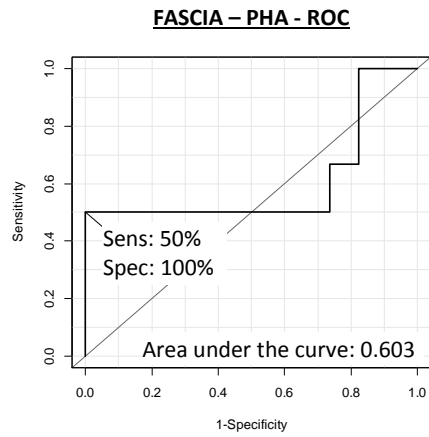
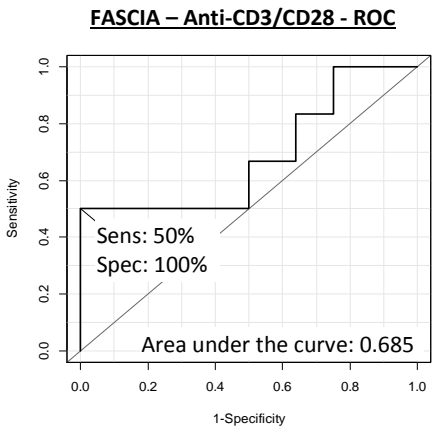
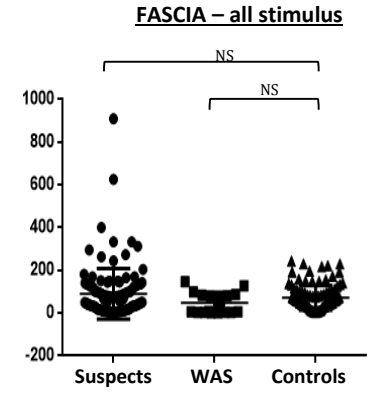
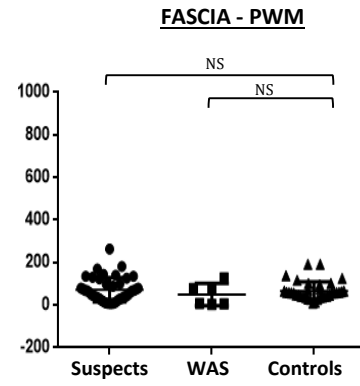
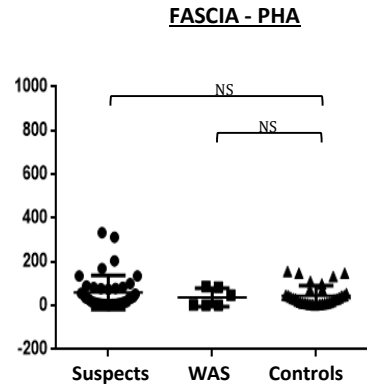
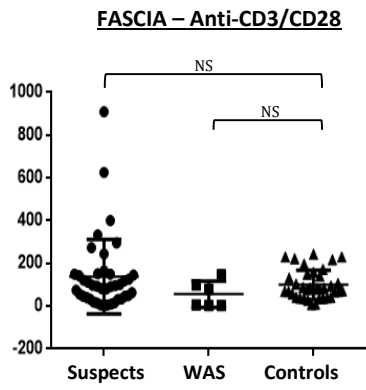
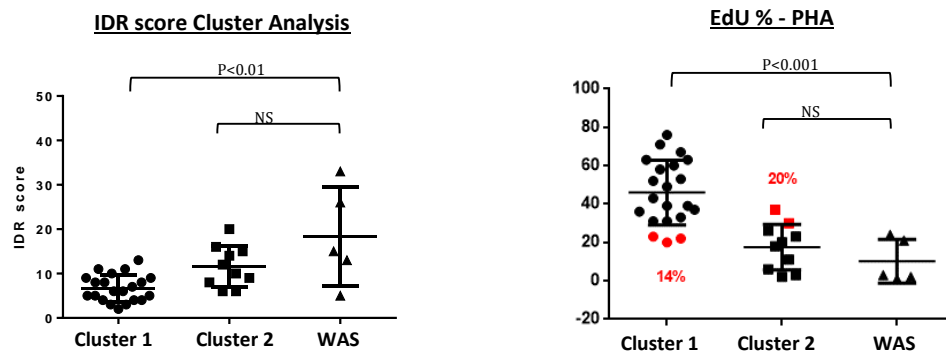


Figure 4.



Capítulo 3

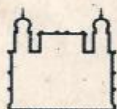
6. Conclusão

- *Os resultados do presente estudo mostram que a metodologia EdU associada ao estímulo PHA, é uma boa metodologia para discriminar pacientes WAS.*
- *Os ensaios de FASCIA apresentaram menos correlação com o ensaio de [3H]-timidina, mesmo corroborando com Marits e colaboradores.*
- *A partir dos dados apresentados na figura 3, ficou claro que a metodologia EdU foi extremamente sensível para identificar indivíduos com esta patologia quando seus linfócitos foram estimulados com PHA.*
- *Os dados da tabela 2, sobre as características dos pacientes WAS, sugerem que a expressão WASP se correlaciona melhor com defeitos proliferativos do que o escore clínico.*

Todos esses resultados juntos sugerem fortemente que a estimulação de PHA em conjunto com a metodologia de incorporação de EdU por citometria de fluxo apresentou melhor desempenho em nosso grupo de estudo. Esta conclusão baseou-se tanto numa melhor correlação encontrada com o ensaio padrão-ouro [3H]-timidina como na elevada sensibilidade e especificidade para a discriminação de pacientes WAS. Além disso, esta abordagem parece identificar adequadamente, dentro de um grupo heterogêneo de pacientes suspeitos de PID, aqueles com respostas proliferativas disfuncionais, especialmente em casos com fenótipos clínicos graves. Esses achados abrem a possibilidade de usar a metodologia EdU por citometria de fluxo rotineiramente como uma opção não-radioativa para laboratórios clínicos,

estabelecendo o rastreamento de defeitos proliferativos em linfócitos no contexto da investigação de imunodeficiências primárias.

7. Apêndice 1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL | FERNANDES FIGUEIRA
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador Responsável

Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos
Pesquisador em Saúde Pública
Doutor em ciências com ênfase em imunologia
Unidade de Pesquisa Clínica
Laboratório de Alta Complexidade
Contatos: (21) 2554-1918
Email: zvasconcelos@iff.fiocruz.br

Médico Responsável

Dra. Sandra Bastos
Ambulatório de Alergia e Imunologia
Telefone: 21 2554-1772
Email: sandramebp@yahoo.com.br

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-IFF

Telefone: 21 2552-1730
Email: cepiff@iff.fiocruz.br

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa intitulado: "Estratégia inovadora de terapia gênica, sítio-dirigida, baseada em CRISPR/Cas, para imunodeficiências primárias"

Esta pesquisa pretende implementar exames diagnósticos para doenças genéticas que afetam o sistema imunológico da criança e usar essa informação para testes laboratoriais de correção do defeito genético em células humanas. Os exames são baseados em testes de função das células no laboratório, análise da seqüência do DNA, identificação do erro no código genético e correção desse erro através de uma terapia genética experimental em laboratório. Essa terapia genética será realizada no excedente de células do sangue ou urina colhidos para realização dos exames diagnósticos. Com essa pesquisa poderemos não somente auxiliar no diagnóstico de pacientes portadores dessas patologias, mas também avaliar a segurança e estabilidade da manipulação do código genético em células humanas visando corrigir erros inatos que comprometam a função das células imunológicas. Futuramente, essas informações serão base para a aplicação dessa metodologia para alcançar a cura dos pacientes portadoras de diversas patologias genéticas.

Para a sua participação nesta pesquisa você precisa somente permitir o uso do sangue ou urina coletados para exames diagnósticos. No excedente das células que já estão sendo coletadas para os exames, realizaremos modificações genéticas para corrigir o defeito genético. Desta forma, participar deste estudo não causará nenhum prejuízo ou risco adicional para a sua saúde. É importante também dizer que a amostra enviada para este estudo não será utilizada para nenhuma outra finalidade. Em caráter informativo, as análises serão realizadas no Laboratório de Alta Complexidade do Instituto Nacional da Criança, da Mulher e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ (LACIFF).

APROVADO

VALIDADE:

INÍCIO 10/04/2015 FIM 02/03/2017

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA-IFF/FIOCRUZ

Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491

Email: cepiff@iff.fiocruz.br

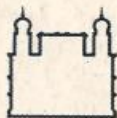
TCLE versão 3

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

Mauro Assis Magalhães

Rubrica paciente_____
Rubrica pesquisador

1



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



IFF

INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE FERNANDES FIGUEIRA

Todas as informações referentes a esta pesquisa são confidenciais, estarão guardadas em segurança e só serão utilizados pela equipe de pesquisa. Estas informações estão submetidas às normas de privacidade e confidencialidade do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ que é o setor responsável por assegurar as normas de pesquisa em seres humanos neste hospital. As informações só serão divulgadas em eventos e publicações científicas, assim como, para compor relatórios técnicos, sem revelar a sua identidade e/ou da sua família, sendo assegurado, portanto, o sigilo sobre sua participação.

Os resultados dos exames realizados com a sua amostra poderão ser requisitados, por escrito, por você (ou por algum responsável legal) a qualquer momento, e uma via fará parte do seu prontuário no IFF. Esclarecimentos serão fornecidos sempre que solicitados bastando para isso entrar em contato, com o pesquisador responsável ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/IFF-FIOCRUZ). O conteúdo dessas informações não poderá ser usado em nenhum outro estudo ou para qualquer outro propósito sem a autorização por escrito das partes interessadas. Se alguma alteração for detectada você será imediatamente avisado para que a intervenção possa ser instituído.

Sua participação nessa pesquisa é voluntária, caso você decida, a qualquer momento, desligar-se deste estudo não haverá nenhum prejuízo a assistência médica dispensada ao seu bebê. Não há nenhum custo, a você, relacionado aos procedimentos previstos neste estudo assim como não há pagamento por sua participação. É garantido o direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Se você (ou seu parente) tiver alguma dúvida com relação ao estudo, direitos do paciente, ou no caso de danos relacionados ao estudo, você deve contatar o Pesquisador Responsável pelo Projeto ou sua equipe. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira/FIOCRUZ.

Sendo assim, após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com profissional capacitado, para esclarecer detalhadamente todas as minhas dúvidas, estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades, expresso minha concordância de espontânea vontade em participar do projeto de pesquisa intitulado: "ESTRATÉGIA INOVADORA DE TERAPIA GÊNICA, SÍTIO-DIRIGIDA, BASEADA EM CRISPR/CAS, PARA IMUNODEFICIÊNCIAS PRIMÁRIAS". Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

TCLE versão 3

Rubrica paciente_____
Rubrica pesquisador

2

APROVADO

VALIDADE:

INÍCIO 10/01/2015 FIM 02/03/2017

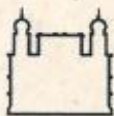
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA- IFF/FIOCRUZ

Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491

Email: cepiff@iff.fiocruz.br

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

IFF

INSTITUTO NACIONAL
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA

Declaro que recebi uma copia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. E permito, os pesquisadores deste projeto, me contatarem por telefone ou através de mensagem de correio se informações adicionais forem necessárias, conforme informações que constam em meu prontuário no IFF-FIOCRUZ.

Nome do Paciente: _____

Prontuário: _____ Código: _____

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____

Assinatura do Voluntário (ou responsável legal): _____

Nome Completo (em letra legível): _____

Documento de Identidade: _____ Telefone para contato: _____

Assinatura de uma testemunha: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Instituições envolvidas:

Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Unidade de Pesquisa Clínica

Laboratório de Alta Complexidade

Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo - Rio de Janeiro – Brasil

Telefone/FAX: (21) 2554-1918

Comitê de Ética em Pesquisa CEP-IFF

Instituto Nacional da Criança, da mulher e do Adolescente Fernandes Figueira

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Telefone: 21 2552-1730

Fax: 2552-8491

Email: cepiff@iff.fiocruz.br

TCLE versão 3

Rubrica paciente_____
Rubrica pesquisador

3

APROVADO

VALIDADE:

INÍCIO

10 de 10/17

FIM

02/03/2017

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA-IFF/FIOCRUZ

Telefones 2554-1730 / Tel./Fax 2552-8491

Email: cepiff@iff.fiocruz.br

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

INSTITUTO FERNANDES FIGUEIRA - IFF/FIOCRUZ

me

Artrite													
GEA													
Diarreia crônica													
ITU													
Angioedema sem urticária													

OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS:

Endocrinológicas:

Hematológicas:

Outras:

HISTÓRIA:

Gestação: G: _____ Para : _____ Aborto espontâneo (. .) IG _____ Aborto provocado (. .)

P: _____ C: _____ PC: _____ APGAR: _____

Intercorrências:

Uso de medicação na gestação: () Não () Sim Qual?

Queda do coto umbilical (dias): _____

H. Vac. completa: () Não () Sim

Hep. A () Varicela () Influenzae () Pnemo 7 ou 10 ou 13 () Pnemo 23 () HPV ()

Cicatriz da BCG? () Não () Sim

Reação vacinal? () Não () Sim Qual?

Desenvolvimento Normal? () Não () Sim Descrição:

HISTÓRIA FAMILIAR

Consanguinidade:	Mãe	Irmãos	Primos
() SIM () NÃO	Pai	Tios	Outros
Nacionalidade da Família			
Pai:	Avô paterno:	Avô materno:	
Mãe:	Avô paterna:	Avô materna:	

EXAME FÍSICO:

IDADE: _____ anos _____ meses	PESO _____ Kg	ESTATURA: _____ cm Baixa estatura () Sim () Não	Magreza () Eutrófico ()	Sobrepeso () Obeso ()
Facies atípica: () SIM () NÃO				
Descrição:				
Pele e mucosas				
Palidez Cutâneo/Mucosa () Não () Sim		Eczema () Não () Sim	Petéquias () Não () Sim	
Telangiectasia () Não () Sim		Hematoma () Não () Sim		
Amígdalas () Não () Sim				
Alteração dentária () Não () Sim Descrição:				
Alteração em aparelho respiratório: () Não () Sim Descrição:				

		Em menores de 1 ano também considerar os seguintes:
Duas ou mais pneumonias no último ano		Infecções fúngicas, virais e/ou bacterianas persistentes ou graves
Quatro ou mais novas otites no último ano		Diabetes mellitus persistente ou outra doença autoimune e/ou inflamatória
Estomatites de repetição ou monilíase por mais de dois meses		Quadro de sepse, sem identificação de agente infeccioso
Abscessos de repetição ou ectima		Lesões cutâneas extensas
Um episódio de infecção sistêmica grave (meningite, osteoartrite, septicemia)		Linfopenia ou outra citopenia, ou leucocitose persistentes sem infecção
Infecções intestinais de repetição/diarréia crônica		Atraso na queda do coto umbilical (>30 dias)
Asma grave, doença do colágeno ou doença autoimune		Hipocalcemia com ou sem convulsão
Efeito adverso ao BCG e/ou infecções por micobactéria		Diarréia persistente
Fenótipo clínico sugestivo de IDP		Ausência de imagem tímica ao exame radiológico do tórax
História familiar de imunodeficiência		

9. Anexo 1

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estratégia inovadora de terapia gênica, sítio-dirigida, baseada em CRISPR/Cas, para imunodeficiências primárias

Pesquisador: Zilton Farias Meira de Vasconcelos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 42934815.4.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.522.404

Apresentação do Projeto:

As imunodeficiências primárias (PID) são patologias genéticas que têm como principal característica alterações das funções do sistema imune, levando a maior suscetibilidade às infecções de repetição, doenças auto-imunes e neoplasias. A Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) é uma imunodeficiência primária ligada ao X caracterizada por infecções recorrentes, hemorragias graves, autoimunidade e linfomas. WAS é causada por mutações no gene que codifica a proteína WAS (WASP). Nessa proposta, pretendemos desenvolver uma estratégia inovadora de terapia gênica, baseada no sistema CRISPR/Cas, para inserção e correção genética guiada por RNA. Com esse projeto pretendemos demonstrar a eficiência, segurança e estabilidade da estratégia CRISPR/CAS como estratégia de edição gênica dirigida para o gene WAS. Concomitantemente, estabelecer uma plataforma diagnóstica de imunodeficiência primária para caracterização funcional e molecular para posteriores edições genéticas sítio dirigidas.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de emenda para apresentação de carta de coparticipação do IPPMG

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 1.522.404

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante e de interesse institucional

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas as cartas solicitadas

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há lista de pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_678138 E1.pdf	15/04/2016 13:00:36		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_Parecer_CEP.pdf	15/04/2016 12:59:56	Zilton Farias Meira de Vasconcelos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_direcao_ippmg.pdf	15/04/2016 12:56:47	Zilton Farias Meira de Vasconcelos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_IPPMG.pdf	10/03/2016 19:17:25	Zilton Farias Meira de Vasconcelos	Aceito
Outros	Resposta Parecer CEP APQ1 2014-signed.pdf	29/04/2015 20:26:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Pesquisa IFF 2014 v2.pdf	29/04/2015 20:11:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE CRISPR project 2014 v3.pdf	29/04/2015 20:10:10		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CPQ.pdf	29/04/2015 20:09:47		Aceito
Outros	Tradução INSERM-signed.pdf	04/03/2015 08:43:35		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE CRISPR project 2014 v2.pdf	04/03/2015 08:30:03		Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



Continuação do Parecer: 1.522.404

Justificativa de Ausência	TCLE CRISPR project 2014 v2.pdf	04/03/2015 08:30:03		Aceito
Outros	Aceite Sydronio WASP.pdf	04/03/2015 08:27:41		Aceito
Outros	IOC.pdf	11/02/2015 08:14:33		Aceito
Outros	CPQ.pdf	11/02/2015 08:14:14		Aceito
Outros	CEMO.pdf	11/02/2015 08:14:02		Aceito
Outros	LBMA.pdf	11/02/2015 08:13:53		Aceito
Outros	LACIFF.pdf	11/02/2015 08:13:44		Aceito
Outros	SAI.pdf	11/02/2015 08:13:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Pesquisa IFF 2014.pdf	11/02/2015 08:12:42		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	11/02/2015 08:10:40		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 29 de Abril de 2016

Assinado por:
maria elisabeth lopes moreira
(Coordenador)

Endereço: RUI BARBOSA, 716

Bairro: FLAMENGO

CEP: 22.250-020

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2554-1730

Fax: (21)2552-8491

E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

10. Anexo 2

Normas para submissão do artigo na revista científica “Journal of Cellular and Molecular Medicine”:

Author Guidelines

Manuscript Submissions

Authors should submit complete manuscripts (with separate figure files) to the JCMM ScholarOne Manuscripts website, at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jcmm>.

Please follow the instructions given at this site, noting that all information entered during the submission process related to the manuscript should also be included in, and be identical to, the final submitted version of the manuscript. The corresponding author must complete all the mandatory fields in the submission process, but preliminary data can be stored if additional information needs to be obtained - for example, the e-mail addresses of all the named authors (who will all be informed of the submission process). Should authors encounter difficulties they may contact the Wiley-Blackwell support desk in the USA (Tel.: +1 434 817 2040 ext. 167, E-mail: support@scholarone.com).

Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with [Ethical Policies of the journal](#), and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review. It is highly recommended you read this policy and complete any necessary documentation prior to your submission

Authors are encouraged to supply the names of potential referees, and/or of referees that they do not wish to review their paper.

Authors of Invited Reviews should supply the name of the Guest Editor who invited them to write.

COPYRIGHT INFORMATION

You will be prompted to sign the Open Access Agreement electronically after manuscript review and acceptance. We have introduced a convenient new process for signing your Open Access Agreement electronically (eOAA) that will save you considerable time and effort. The author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. You may preview the copyright terms and conditions [here](#).

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Categories of manuscripts

Original Articles (research papers) - up to 15 printed pages.

Reviews - up to 10 printed pages.

Review Series - up to 10 printed pages and no more than 120 references.

Short Communications, Images in Cellular/Molecular Medicine, Editorial Forewords, Commentaries, Points

of View, Letters to the Editor - up to 2 printed pages.

Medical Hypotheses, Retro-views of significant ideas and discoveries.

Research Ethics

If the research described involves human subjects or experimental animals, the authors must give details in the manuscript of the approval obtained for the protocol from the Ethics Committee of the institution in which the research was undertaken. Experiments on live vertebrates or higher invertebrates must be demonstrated to be ethically acceptable and in accordance with institutional and national guidelines or regulations for the use and welfare of laboratory animals.

If the manuscript reports medical research involving human subjects, authors must include a statement confirming that informed consent was obtained from all subjects, and that the research was carried out according to the World Medical Association Declaration of Helsinki. Any form of registration that may identify a patient must be excluded from the content of the paper. When clinical images of patients are submitted it is the responsibility of the authors to obtain, prior to submission, full informed consent by the patient for the use of the photographs, and to ensure that full anonymity is preserved.

Publication Ethics

*Journal of Cellular and Molecular Medicine is a member of the Committee on Publication Ethics and subscribes to its recommendations (Committee on Publication Ethics [COPE]: guidelines on good publication practice, www.publicationethics.org). The policy of Wiley-Blackwell and of JCMMon the major ethical principles of academic publishing are described in our Best Practice Guidelines on Publication Ethics: <http://www.blackwellpublishing.com/publicationethics/> (Graf C, Wager E, Bowman A, et al., *Int J Clin Pract* 2007; **61** [suppl 152]: 126). The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds. All authors are responsible for adhering to guidelines on good publication practice.*

Authorship

All authors must fulfill the following criteria: 1. Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data; 2. Drafting the paper or revising it critically; and 3. Approval of the submitted and final versions.

Conflicts of interest

The authors are responsible for recognizing and disclosing financial and other conflicts of interest related to their study or to the subject of their paper. The authors must acknowledge in the manuscript all financial support for the research work and other financial or personal connections to the work. A conflict of interest statement must be included in every manuscript, as a separate section after the Acknowledgements (if any) and before the References. In the absence of conflicts of interest, the authors must include the statement: "The authors confirm that there are no conflicts of interest."

Manuscript format

Manuscripts should be typewritten in A4 page format (210x297 mm), with double spacing, margins of 25 mm, and page numbering. Times New Roman font, 12-point size, is required. As a guide, a research article of about 3500 words, plus figures and tables, will take up approximately 10 pages. The text of research manuscripts should be arranged in the following sections: Title page, Abstract and Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest Statement, References, Tables, Figure Legends and Figures. Headings for subdivisions of the text should

be clearly identified using a different font type (e.g. bold, underlined). All materials should comply with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>). Within the main document, figure and table legends, and references, all words of Latin origin (e.g. versus, vs., in vitro, in vivo, ex vivo, in situ, de novo, et al., etc.) must be italicised.

Title page

This should carry the following information: the title of the article (concise and informative, not longer than 80-100 characters, including spaces and punctuation), authors' names and their respective institutional affiliations, department(s) and institution(s) to which the work should be attributed to. To facilitate accurate exports to indexing sites (e.g. PubMed), authors with multi-part surnames (e.g. van der Waals, da Vinci, Ramón y Cajal) are advised to underline all parts of their surname in the author listing at the beginning of their manuscript. Each affiliation should be numbered accordingly. The author responsible for correspondence should be marked by an asterisk, and their full address, telephone/fax numbers, and e-mail address must be indicated. All Reviews must include a bulleted list of all headings and sub-headings present in the review. This should be placed before the abstract.

Abstract and keywords

An abstract must accompany each paper and should not exceed 250 words. The abstract should follow the title page, and the authors need to be careful that it reflects the content of the article accurately. The abstract must clearly provide the background for the study and should state the study's objectives, methods used, main results, and principal conclusions. It should be easily understood without reference to the text. No other references are allowed. If necessary, include only few important values. Avoid reporting detailed statistics and using abbreviations. Following the abstract, a list of 3-10 keywords is essential for indexing purposes. In addition, please add for Reviews, a list of the main topics.

Units of measurement, nomenclature and abbreviations

Quantities of, and symbols for, physical units should be expressed in accordance with the recommendations of the International System of Units (Système International d'Unités), i.e.: SI units. Alternative or non-SI units may be used, but these must be defined at their first occurrence in the text. Chemical and biochemical nomenclature should follow the Recommendations of the IUPAC-IUB Commission on Nomenclature. Enzymes, when first mentioned, should be written in full, followed by the IUB Enzyme Commission number. Approved names may be used and details may be obtained from the latest edition of Enzyme Nomenclature. For the expression of catalytic activity, use the International Federation of Clinical Chemistry methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. The producer should be specified for chemicals. Chemical structure must be specified, if laboratory code numbers are used. For drugs, use international non-proprietary (generic) names.

Use standard abbreviations. Any non-standard abbreviations (to be avoided if possible) should be explained in the text the first time they are used. Avoid the use of abbreviations in the title.

Clinical trials (if applicable)

Clinical trials should be registered and the authors must state the registration number and name of the trial registry. If this is not available, please provide an explanation.

Acknowledgements

This section, placed after the Discussion, should specify any contributions that need acknowledgment but do not justify authorship, such as acknowledging technical help. It must also list all governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript. Attribution of these funding sources is preferred, as in these examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from "...." Inc. (to AB) and equipment was donated by "...." Inc.
- EF received a graduate studentship award from the University of ".....".

The authors must also indicate their specific contributions to the work described in the manuscript. Some examples include: Performed the research; Designed the research study; Contributed essential reagents or tools; Analyzed the data; Wrote the paper.

An author may list more than one contribution, and more than one author may have contributed to the same element of the work. E.g. AB performed the research, AB and CD analyzed the data and wrote the paper, EF contributed the knockout mice for the study and GH designed the research study and wrote the paper.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in square brackets (e.g. [1], [2-6], etc.). The reference list is a separate section at the end of the manuscript. All references must be up-to-date. Type each reference single-spaced, with one line space between references. For papers published online ahead of print (Epub), the digital object identifier (DOI) must be provided.

Use exactly the reference style and format as shown below. Each reference should contain names and initials of the allowed number of authors. In the case of more than 3 authors, "et al." should end the authors list after the first 3 names. In the case of 4 authors, all the names must appear in the list. In the case of 3 or fewer authors, all the names must appear in the authors list.

The titles of journals (font style italic) should be abbreviated according to Index Medicus. Inaccurate referencing may delay publication.

N.B. Reference citations must be according to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, as stated by the International Committee of Medical Journal Editors.

(a) Standard journal article

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med.* 2002; 347: 284-7.

(b) Epub article

Yang X, Cai WB, Xu Z, et al. High efficacy and minimal peptide required for the anti-angiogenic and anti-hepatocarcinoma activities of plasminogen K5. *J Cell Mol Med.* 2009. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.01004.x

(c) Books and Monographs

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, et al. *Medical microbiology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.

(d) Chapter in a book

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. *Chromosome alterations in human solid tumors.* In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. *The genetic basis of human cancer.* New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

References in Articles

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

Reference Manager reference styles can be searched for

here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Footnotes

Avoid footnotes. When essential, they are indicated in the text by symbols, typed at the foot of the appropriate page, e.g. the address of the author for correspondence (*), on the title page, or explanatory notes for tables.

Tables

Include tables in the main manuscript file, starting on a separate page. Use the table function of a word processor rather than tab and space, and do not submit tables as figure files/images. Number tables consecutively with Arabic numerals and give each a short, descriptive heading. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory matter in footnotes to the table, not in the heading. Explain in the footnotes all non-standard abbreviations used in the table. Omit internal horizontal and vertical lines. If data from another published or unpublished source are used, obtain permission and acknowledge fully. Tables should be self-explanatory and understandable without reference to the text of the article.

Figure Legends

Each figure should have a legend containing sufficient information to make the figure intelligible without reference to the text. When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustrations, explain each one in the legend. Figure legends should be included in the main manuscript file for upload, in double-spaced text on a separate page, with Arabic numbers corresponding to the illustrations.

Figures

Please submit vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Postscript Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Detailed guidance on preparing digital illustrations is available via Wiley-Blackwell Author Services at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>. Letters, numbers and symbols should be clear and even throughout, and of sufficient size so that when reduced for publication the item will still be legible; titles and detailed explanations should be included in the legends, not in the illustrations themselves. Cite each figure in the text in consecutive order.

If you wish to use a figure that has been previously published, you must acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material. . Please go to <http://www.copyright.com> to get permission.

Supporting Information

Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text, and a descriptive legend should be included. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format.

For further information on the recommended files types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/supinfo.asp>

REVISED MANUSCRIPT SUBMISSION

An electronic version of the revised manuscript must be provided. Accepted manuscripts will be published from the Word file (not PDF) wherever practicable and therefore revised versions must be provided in this form. This reduces typesetting errors and speeds up publication. Authors must ensure that all sections of their paper, excluding figures, are presented in a single file, and that all files and figure and table ordering are updated to incorporate all revisions. Two versions of the main manuscript file should be supplied, one with the revisions marked using "Track Changes", and one with all changes accepted.

Text

Files should be formatted double-spaced with no hyphenation and automatic word-wrap (no hard returns within paragraphs). Please type your text consistently, e.g. take care to distinguish between '1' (one) and 'l' (lower-case L) and '0' (zero) and 'O' (capital O), etc.

Tables

Tables should be created using the table editor function of word processing software. Do not use graphics software to create tables.

Mathematics

In-line equations should be typed as text where possible. Graphics programs and 'equation editors' can also be used, and the output will be used where possible but displayed equations may occasionally be re-keyed by our typesetters.

Figures

Please submit digital versions of your figures, as EPS and TIFF format files only. Please note that your paper will go through production more quickly if the figures do not have to be relabelled or redrawn. Please ensure that your electronic artwork is prepared such that, after reduction to fit across one or two columns or two-thirds width (80mm, 169mm or 110mm respectively) as required, all lettering will be clear and easy to read, i.e. no labels should be too large or too small. Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse. No artwork for publication should be incorporated into the final accepted text files.

Full guidance on submission of artwork is available at http://authorservices.wiley.com/submit_illust.asp?sit

WHAT TO EXPECT WHEN YOU SUBMIT YOUR PAPER

Once your manuscript has been submitted, the Editor-in-Chief (EiC) evaluates it to check whether it fits with the aims and scope of the Journal. If it does, then your paper enters the peer review process. Journal of Cellular and Molecular Medicine uses the traditional, single-blind, peer review process (the identity of the reviewers is blinded). The manuscript submission and peer review process is managed on Thomson Reuters ScholarOne Manuscripts online system (<http://mc.manuscriptcentral.com/jcmm>).

The EiC assigns your paper to an Assistant Editor (AE), who will select several reviewers. The reviewers evaluate the manuscript and then return their comments and a recommendation to the Assistant Editor. The reviewers can recommend 'Accept', 'Minor revision', 'Major revision' or 'Reject', based on the assessment of the validity of the scientific design and methodology, importance and originality of the findings. The reviewers are also given the option to leave confidential comments for the Editor-in-Chief. At least two reviewers' recommendations are needed for reaching a decision regarding the suitability for

publication of your manuscript. The AE then integrates the reviewers opinions with his/her own evaluation and makes a recommendation to the EiC. If the AE recommendation is not 'Reject', your manuscript will also undergo a technical check. The EiC will then send to the authors the decision letter containing the reviewers and AE comments. The average time to first decision is currently 25 days.

If revision is required, the authors decide whether it is possible to fulfil the requested changes and re-submit the manuscript. The timeframe for re-submission of a manuscript with 'Minor revision' or 'Major revision' decision is 30 days and 60 days, respectively. After the deadline, the paper can only be submitted as a new manuscript.

After re-submission, the manuscript will be sent back for evaluation to the same reviewers. If the reviewers who evaluated the original submission do not respond in a timely manner, or are not available, a new reviewer can be invited to review the paper, or the AE can assess whether the revision meets the reviewers comments. The AE will then make a recommendation to the EiC regarding the revised manuscript. Please be aware that:

- All decisions types ('Accept', 'Minor revision', 'Major revision' or 'Reject') are possible for the revised paper, depending on whether the reviewers are satisfied with the authors' reply and the revised form of the paper.
- A few manuscripts can be rejected with invitation to resubmit as a new manuscript, for another peer review process with new reviewers.
- A new technical check will follow and, even if the reviewers are satisfied with the changes, a Minor revision decision will be made for the purpose of preparing the manuscript files in accordance with production's technical requirements.

When a manuscript is finally accepted, it will be sent to the Production Department for preparing the proofs and online publication. An author tracking system is available and authors need to register for providing Licence agreement and research financing information.

POST-ACCEPTANCE

You or your funder will be required to pay an [Article Publication Charge](#) on acceptance.

Open Access Agreement

The Corresponding Author will be prompted to sign the [Open Access Agreement](#) electronically after acceptance.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Offprints

Free access to the final PDF offprint of an article will be available via Author Services only. Authors are therefore recommended to sign up for Author Services to access their article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Author Services

Wiley-Blackwell's Author Services enables authors to track accepted articles through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The corresponding author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript.

Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested otherwise, Wiley-Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted, two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.