

PO84

Adesão celular *ex vivo* em tempo real, novas respostas imunes em sangue total ao alcance biomédicoTiago Tomé^{1,2}, Tiago Granja^{1,2*}¹Universidade Lusófona, School of Sciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal.²CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences and Health Technologies, Lisboa, Portugal.*Autor correspondente: ✉ tiago.granja@ulusofona.pt**Resumo**

Introdução: Em ambiente hospitalar, a constante monitorização do processo inflamatório é fundamental no processo de avaliação do doente. O desenvolvimento de inflamação aguda e crónica depende essencialmente da transmigração e infiltração dos tecidos por células do sistema imunitário (Zindel and Kubes 2020). São as proteínas de adesão como CD11b nos neutrófilos e monócitos e de CD62E no tecido endotelial que orquestram esta resposta imune (Granja et al. 2015). Atualmente, esta função imunológica é feita em diferido por citometria de fluxo ou imunofluorescência, mas a utilização de câmaras de fluxo capilar disseminada pelo Dr. Klaus Ley (Marki et al. 2016) permitem a observação da migração e adesão celular *ex-vivo* em tempo real. Atualmente, estas metodologias são altamente dispendiosas devido à tecnologia necessária e respetivo software inerente à sua observação e análise. Neste estudo piloto concentramos-nos na disponibilização massiva de tecnologia vídeo (e.g. acessível em cada telefone móvel) para encontrar soluções de recolha de dados de câmaras de fluxo capilar em tempo real. A nossa abordagem apresenta resultados concordantes com a literatura através de uma abordagem inovadora, que no presente formato pode integrar uma unidade de cuidados intensivos ou a sala de aula com alunos em formação pré-graduada. **Objetivos:** i) Possibilitar a visualização, quantificação de adesão, e determinação da velocidade de migração de células imunes (e.g. neutrófilos) de sangue total com tecnologia atual e acessível. ii) Abrir à comunidade médica e científica uma metodologia essencial à observação da resposta imune em processos inflamatórios. iii) Possibilitar a integração de técnicas avançadas de análise de imagem em formação pré-graduada nos cursos de medicina, ciências biomédicas e biologia. **Material e Métodos:** Neste estudo piloto concentrado no comportamento microfluídico *ex vivo* dos neutrófilos presentes em sangue, recorremos a um microscópio ótico comercial ao qual adaptamos um suporte de telefone móvel a uma das oculares. Montados os capilares de fluxo de secção quadrangular de 0.02mm entre lâmina e lamelas, procedeu-se à cobertura das câmaras com selectina endotelial (CD62E - molécula de adesão de neutrófilos) e adaptou-se uma coluna gravitacional a uma das extremidades do capilar. Recolhidas as amostras de sangue total, expôs-se o sangue total aos capilares com CD62E ou solução de bloqueio (Caseína 0,02%) e registou-se em vídeo (em software gratuito) as células em adesão e a velocidade de migração celular capilar. Triplicados de amostragem foram recolhidos, analisados e processados estatisticamente recorrendo unicamente a software gratuito e pela seguinte sequência: Openshot; VLC; Image J; GoogleDocs Excel; Jamovi. **Resultados:** Com esta abordagem conseguimos captar, quantificar a adesão, e determinar a velocidade de migração de células imunes (e.g. neutrófilos) de sangue total, com tecnologia atual e acessível não especializada (câmaras com 7MP - megapixel- e com uma captação de 30fps). Os vídeos captados, uma vez editados (via Openshot) conseguem ser transformados em sequências de imagens únicas (via VLC) com suficiente velocidade de captação para formação de Stacks de imagens (via Image J). Nestas reconstruções de 8bit é possível contar o número de neutrófilos em adesão na presença de CD62E e quantificar a velocidade de migração $\mu\text{m}/\text{seg.}$. Seguindo o trajeto de dezenas de células por vídeo, em cada condição experimental, foi possível obter resultados com semelhante significância estatística com a literatura existente. A integração de equipamentos acessíveis a todos em processos experimentais em ciências da vida é fundamental para o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e para os alunos envolvidos na elaboração de projetos médico-científico. Neste trabalho permitimos que uma técnica de avaliação imunológica com impacto transversal em ciências biomédicas, se torne inclusiva e aplicável na formação pré-graduada dos respetivos *currícula* interessados na avaliação da resposta imune e no controlo da inflamação em tempo real.

Palavras-chave: Micro-fluídos, imunologia, inflamação.**Referências bibliográficas:**

- [1] Granja, T., J. Schad, P. Schussel, C. Fischer, H. Haberle, P. Rosenberger, and A. Straub. 'Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes--A new assay suitable for bench and bedside conditions', *Thromb Res*, 136: 786-96, 2015.
- [2] Marki, Alex, Edgar Gutierrez, Zbigniew Mikulski, Alex Groisman, and Klaus Ley. 'Microfluidics-based side view flow chamber reveals tether-to-sling transition in rolling neutrophils', *Scientific Reports*, 6: 28870, 2016.
- [3] Zindel, Joel, and Paul Kubes. 'DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15: 493-518, 2020.