

# Instituto Oswaldo Cruz

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular &  
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

## CURSOS DE INVERNO 2010



***Citometria de Fluxo no  
estudo das doenças  
infecto-parasitárias***

Amanda Torrentes de Carvalho  
Grazielle Alves Ribeiro  
Raquel Ferraz Nogueira

Coordenador: Álvaro Luiz Bertho dos Santos

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

## AUTORES

---

**AMANDA TORRENTES DE CAVALHO:** Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado 2005 e Licenciatura 2009) pela Universidade Federal Fluminense e Mestrado em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz (2008). Atualmente é Doutoranda do programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da FIOCRUZ, sendo bolsista do CNPq. Atua no projeto intitulado Infecção de Monócitos por Vírus Dengue-2: Mecanismos de Ativação Celular, Apoptose e suas Ações na Carga Viral e Gravidade da Doença, sob orientação da Dr<sup>a</sup> Claire Fernandes Kubelka e co-orientação das Dr<sup>as</sup> Elzinandes Leal de Azeredo e Luzia Maria de Oliveira Pinto, desenvolvido no laboratório de Imunologia Viral do Instituto Oswaldo Cruz/ RJ. Possui experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Imunologia Viral, atuando principalmente nos seguintes temas: autoanticorpos, células B-1, monócitos, resposta imune inata, pacientes, modelo de infecção *in vitro* e Imunopatogenia da Dengue

**GRAZIELLE ALVES RIBEIRO:** Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora (2008). Atualmente é Mestranda do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Atua na área de biologia celular, com ênfase na quimioterapia da leishmaniose e na morte celular de *Leishmania amazonensis*. Desenvolve no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos o projeto “Avaliação das alterações ultra-estruturais e bioquímicas induzidas por naftopterocarpanoquinonas em *Leishmania amazonensis*”, sob orientação do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos e da Dr. Rossana Corrêa Netto de Melo.

**RAQUEL FERRAZ:** Bacharel em Biomedicina pela Universidade Severino Sombra (2007) com Habilitação em Imunologia e com ênfase em Imunologia Celular e Aplicada. Mestranda do Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ desenvolvendo a dissertação: “Caracterização do repertório da cadeia variável  $\beta$  do TCR e da apoptose em diferentes populações de Linfócitos T de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana” no laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, sob orientação do Dr<sup>o</sup> Álvaro Luiz Bertho dos Santos. Treinée na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e *Sorting*, no Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

## COORDENADOR

---

**ÁLVARO LUIZ BERTHO DOS SANTOS:** Bacharel em Biomedicina formado pela Universidade do Rio de Janeiro UNI-RIO (1984). Doutor em Ciências, área de concentração: Imunoparasitologia. Pesquisador Titular e Chefe Substituto no Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ e Professor Adjunto de Imunologia Clínica na Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ. Coordena a Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz - Núcleo de Análise e Separação de Células (*Sorting*). Consultor Científico no Setor de Imunologia do Laboratório Dr. Sérgio Franco (1996 a 2003). Expertise na área de Imunologia e Imunogenética, com ênfase em Imunologia Celular e Clínica, atuando principalmente nos seguintes temas: citometria de fluxo, apoptose, imunoparasitologia, e nas leishmanioses. Primeiro Citometrista de Fluxo no Brasil.

## PREFÁCIO

---

O estudo das doenças infecto-parasitárias é realizado a partir da utilização de uma diversidade de técnicas que viabilizam o entendimento da biologia dos parasitas, suas interações com o hospedeiro e a resposta do hospedeiro no decorrer das infecções. Embora os cursos de graduação abordem amplamente os aspectos teóricos envolvidos no estudo de tais doenças, os aspectos práticos relacionados à forma de obtenção deste conhecimento não são devidamente explorados. Essa apostila tem como objetivo apresentar a aplicabilidade da técnica de citometria de fluxo no estudo das doenças infecto-parasitárias, buscando despertar no aluno de graduação novas idéias que possam ser abordadas em estudos posteriores para ampliar essa área do conhecimento.

Inicialmente fazemos uma pequena revisão sobre os mecanismos de resposta imune às doenças infecto-parasitárias, abordando os principais aspectos da imunidade inata e adaptativa e a aplicabilidade da citometria no âmbito dessas respostas. Posteriormente, um breve histórico, sobre a citometria de fluxo e os princípios básicos da técnica, é apresentado. Descrevemos também as principais aplicações dessa técnica nos estudos relacionados à morte celular por apoptose e nos estudos na área de protozoologia e virologia, apresentando em seguida conceitos e princípios básicos e a aplicabilidade da técnica de *Sorting*, assim como alguns protocolos para citometria de fluxo. Finalizando a apostila, propomos um ensaio prático em imunofenotipagem e apoptose, enfatizando aspectos relacionados à aquisição de amostras e à análise e interpretação dos dados obtidos nos ensaios.

Os autores

Rio de Janeiro 2010

## SUMÁRIO

---

<b>1. Mecanismos de resposta imune às doenças infectoparasitárias: imunidade inata e adaptativa.....</b>	<b>09</b>
1.1. Caracterização das diferentes subpopulações de leucócitos.....	09
1.2. Imunidade Inata.....	11
1.3. Imunidade Adaptativa, Adquirida ou Específica .....	13
1.3.1. Características da Imunidade Adaptativa.....	14
1.3.2. Imunidade Celular.....	15
1.3.3. Imunidade Humoral.....	18
1.4. Produção de Anticorpos monoclonais comercialmente.....	20
1.5. Morte celular programada: Apoptose.....	22
1.5.1. Características morfológicas e bioquímicas da apoptose.....	23
1.5.2. Vias de sinalização da apoptose.....	24
1.5.2.1. Via extrínseca.....	25
1.5.2.2. Via intrínseca.....	25
1.5.3. Papel da apoptose no sistema imune.....	27
1.5.4. Apoptose nas doenças infecto-parasitárias.....	27
1.6. Citometria na Imunologia.....	28
<b>2. Histórico da citometria de fluxo.....</b>	<b>29</b>
2.1. Introdução.....	29
2.2. Como iniciou este estudo? .....	30
<b>3. Princípios básicos da citometria de fluxo.....</b>	<b>38</b>
3.1. Conceito Básico.....	38
3.2. Preparação das amostras para aquisição por citometria de fluxo.....	38
3.3. Fluorocromos.....	39
3.4. Princípios básicos.....	41
3.4.1. Sistema ótico.....	42
3.4.2. Tipos de filtro.....	42
3.4.3. Sistema eletrônico.....	44
3.4.4. Software.....	44

<b>4. Aplicações da citometria de fluxo na apoptose.....</b>	<b>49</b>
4.1. Alterações morfológicas (Foward and Side Scatter) .....	50
4.2. Iodeto de Propídeo (PI).....	51
4.3. 7-AAD (7-amino-actinomicina D).....	53
4.4. Hoechst 33342.....	54
4.5. DAPI (Diamino-2-Fenilindol) .....	55
4.6. Annexina-V.....	55
4.7. Rodamina 123.....	57
4.8. TUNEL.....	58
4.9. DiOC6(3).....	58
4.10. Anticorpo monoclonal.....	59
<b>5. Aplicações da citometria de fluxo na protozoologia.....</b>	<b>60</b>
<b>6. Aplicações da citometria de fluxo na virologia.....</b>	<b>68</b>
6.1. Introdução.....	68
6.2. Detecção e quantificação de células infectadas .....	70
6.3. Características fenotípicas – Susceptibilidade e funcionalidade.....	72
6.3.1. Susceptibilidade.....	72
6.3.2. Funcionalidade.....	73
6.4. Apoptose.....	76
<b>7. Conceitos básicos e aplicação de <i>Sorting</i>.....</b>	<b>79</b>
7.1. Princípios.....	80
7.2. Aplicações do <i>Sorting</i> .....	82
<b>8. Protocolos para citometria de fluxo.....</b>	<b>84</b>
8.1. Protocolos de Citometria.....	84
8.2. Preparo da Amostra.....	84
8.3. Ensaio de Imunofenotipagem.....	85
8.4. Marcação direta.....	86
8.5. Marcação indireta.....	86
8.6. Marcação extracelular.....	87

8.6.1. Solução de fixação: células vivas vs. células fixadas.....	88
8.6.2. Solução de bloqueio.....	88
8.6.3. Solução de lavagem.....	89
8.7. Marcação intracelular.....	89
8.7.1. Solução de fixação.....	90
8.7.2. Solução de permeabilização – saponina.....	91
<b>9. Prática de imunofenotipagem e apoptose.....</b>	<b>92</b>
9.1. Tipos de amostras utilizadas em ensaios de citometria de fluxo.....	92
9.2. Protocolo Prático – Marcação de receptores de membrana e de apoptose em células mononucleares do sangue periférico.....	92
9.2.1. Métodos de processamento de sangue para ensaios de citometria de fluxo.....	92
9.2.2. Protocolo para marcação de receptores de superfície e de apoptose .....	97
<b>10. Aquisição de amostras.....</b>	<b>99</b>
<b>11. Análise de dados.....</b>	<b>102</b>
<b>12. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>105</b>

## **CAPÍTULO 1. MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNE ÀS DOENÇAS INFECTOPARASITÁRIAS: IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA**

**Amanda Torrentes de Carvalho & Grazielle Alves Ribeiro**

### **1.1. Caracterização das diferentes subpopulações de leucócitos**

As células sanguíneas, os leucócitos ou glóbulos brancos, assim como os precursores das hemácias, os eritrócitos que transportam oxigênio, e os megacariócitos, que originam as plaquetas envolvidas no processo de coagulação, derivam do mesmo precursor presente na medula óssea – as células tronco-hematopoiéticas pluripotentes. Durante a hematopoiese, essas células pluripotentes respondem a estímulos provenientes do meio que promovem a sua diferenciação em dois tipos celulares mais especializados: um progenitor da linhagem linfóide, que dará origem aos linfócitos T e B, responsáveis pela imunidade adaptativa; e um progenitor mielóide, que gera outros diferentes tipos de leucócitos como os monócitos, neutrófilos, basófilos e eosinófilos; os eritrócitos e os megacariócitos. A maturação e a ativação de alguns tipos celulares podem também ser finalizadas em outros tecidos e órgãos, como por exemplo, o desenvolvimento dos linfócitos T ocorre no timo.

Ao longo da maturação e da diferenciação, as células perdem algumas moléculas de superfície e adquirem outras. Algumas moléculas podem também estar presentes em maior ou menor quantidade, dependendo da etapa de diferenciação da célula. A caracterização destas moléculas, padrões diferenciais de expressão antigênica, ou até mesmo alterações a nível morfológico, possibilitam a reconstrução de uma via de maturação das células hematopoiéticas. O cluster (agrupamento) de diferenciação (cluster de designação), abreviado como CD, é um protocolo utilizado para a identificação e investigação de moléculas de superfície celular presente nos leucócitos. O CD pode ser utilizado para identificar as subpopulações celulares e suas possíveis diferenciações. Essas moléculas podem agir de várias maneiras, muitas vezes atuando como receptores ou ligantes (moléculas que ativam um receptor), importantes para a célula (Figura 1.1). Além disso, possuem um importante papel em desencadear a diferenciação, proliferação, ativação, migração e morte celular.

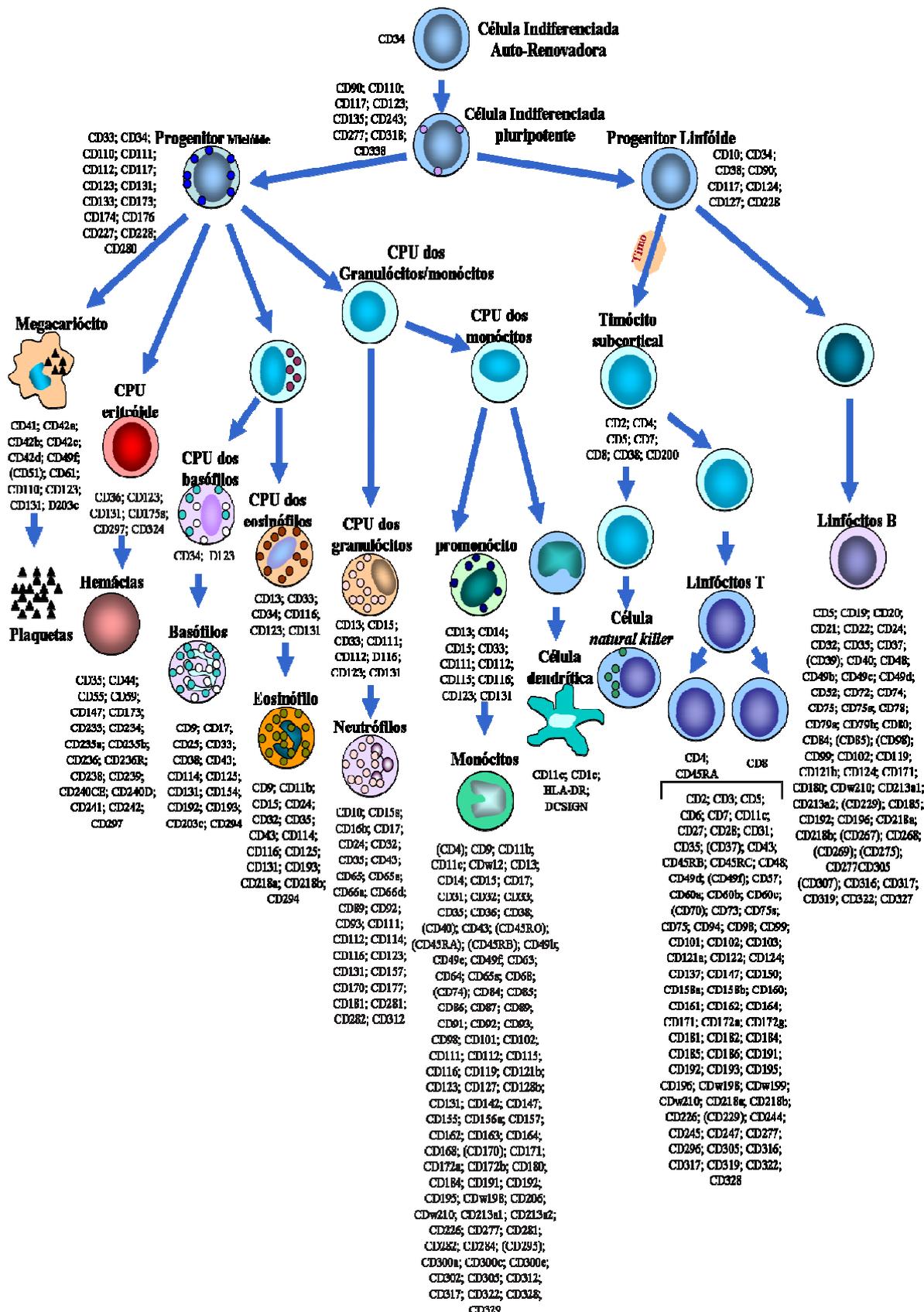


Figura 1.1. Perfil de expressão dos antígenos CD's durante a hematopoiese. Ao longo do processo de maturação e diferenciação, as células expressam diferentes moléculas de superfície.

As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o Sistema Imunológico, e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica.

A função fisiológica do sistema imune é a defesa contra microorganismos infecciosos ou substâncias estranhas. A imunidade protetora contra microorganismos é mediada pelas reações iniciais da Imunidade Inata e pelas respostas posteriores da Imunidade adquirida.

## 1.2. Imunidade Inata

As doenças infecciosas ocorrem quando um microorganismo é capaz de evadir a defesa inata do hospedeiro com sucesso para estabelecer um sítio de infecção e replicação que permita sua transmissão. A imunidade inata é muitas vezes comparada à linha de frente de defesa do hospedeiro. Ela é composta por barreiras naturais, como superfícies epiteliais, células imunes e moléculas solúveis que existem independentemente do estabelecimento de uma infecção. Quando um microorganismo atravessa a barreira epitelial, entra nos tecidos e começa a se replicar, ou cai na circulação, na maioria dos casos ele é imediatamente reconhecido por células residentes nos tecidos ou no sangue (Figura 1.2).

Proteínas do sistema complemento extravasam para os tecidos infectados, são ativadas e ligam-se a superfície dos patógenos levando-os à lise. Essas proteínas também “marcam” os patógenos para serem reconhecidos por receptores para complemento em fagócitos profissionais (opsonização). Ao reconhecer microorganismos opsonizados os fagócitos promovem a sua destruição. Algumas proteínas do complemento também conectam a imunidade inata à adaptativa.

Os macrófagos, assim como os neutrófilos, são células cuja função primária é identificar, ingerir e destruir microorganismos. Os macrófagos estão estrategicamente posicionados nos locais de entrada dos microorganismos no hospedeiro. O estímulo para a sua ativação vem do reconhecimento de antígenos através de receptores (receptores do tipo *Toll*) e de moléculas secretadas por outras células da imunidade inata, como as células Natural Killer (NK). Além de fagocitar e destruir o parasito endocitado, os macrófagos também apresentam peptídeos desse patógeno para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, expressas em sua superfície. Assim como nas células dendríticas, essa apresentação é importante para a indução de respostas efetoras mais específicas do macrófago, como produção de substâncias microbidas e

mediadores inflamatórios que estimulam a ativação de mais fagócitos, a ativação de funções citotóxicas nas células NK, a indução da migração celular para o local da infecção e a ativação e estimulação de outros tipos de leucócitos, como os linfócitos, que tem um importante papel na imunidade adaptativa.

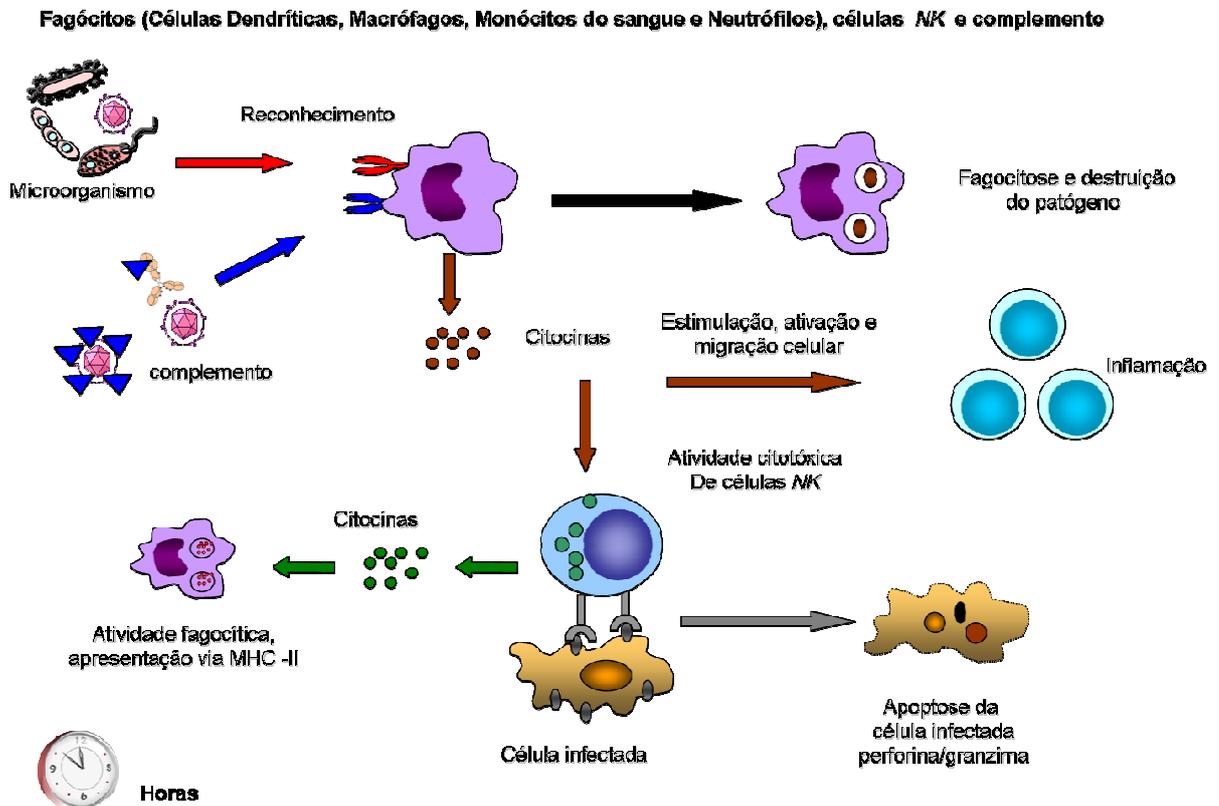


Figura 1.2. Resposta imune inata. Componentes e vias efetoras da resposta imune natural na defesa do hospedeiro contra microorganismos infecciosos.

As células dendríticas e os macrófagos, responsáveis pela apresentação dos antígenos dos microorganismos para os linfócitos T  $CD4^+$ , são denominadas Células Apresentadoras de Antígenos (APCs). Essas APCs, com o parasito fagocitado, migram para os órgãos linfóides secundários e apresentam os antígenos do parasito aos linfócitos T  $CD4^+$ , no contexto do MHC classe II. Clones de linfócitos específicos ao antígeno apresentado se expandem e preparam o sistema imune adaptativo para responder de forma mais apropriada, de acordo com a característica de infecção: parasitismo intracelular (respostas do tipo Th1) ou extracelular (respostas do tipo Th2).

Assim como nos macrófagos, o reconhecimento do patógeno pelas células dendríticas ativa vias de produção de citocinas que inibem a replicação do parasito e atuam na inflamação.

As células *NK*, que reconhecem células infectadas que perderam a expressão de moléculas do MHC de classe I, produzem citocinas que também ativam fagócitos. Suas funções efetoras promovem a destruição de células infectadas através de substâncias que induzem a morte celular.

### **1.3. Imunidade Adaptativa, Adquirida ou Específica**

Quando os microorganismos desenvolvem maneiras de burlar os mecanismos protetores da imunidade inata, tornam-se necessários mecanismos de defesa mais específicos para conter a infecção. Além da imunidade inata ou natural, que atua de forma inespecífica sobre diferentes microorganismos, o sistema imunológico possui também a imunidade adaptativa, adquirida ou específica, que se baseia no reconhecimento específico de substâncias estranhas associadas ou não a superfícies celulares.

Ao contrário da imunidade natural, cuja resposta se desenvolve de maneira imediata, a imunidade adquirida é responsável por mecanismos específicos que demoram alguns dias para se estabelecer. A resposta imune adquirida é formada por linfócitos e anticorpos, que são altamente específicos. As substâncias estranhas que induzem e são o alvo das respostas específicas são chamadas antígenos.

O termo imunidade adaptativa deve-se ao fato de que os mecanismos de defesa, desenvolvidos em resposta a um agente infeccioso, aumentam em magnitude e capacidade defensiva em cada exposição sucessiva, adaptando-se a essa infecção. A imunidade adaptativa apresenta também grande especificidade, podendo distinguir entre os diferentes microorganismos e moléculas, sendo também chamada de imunidade específica.

A imunidade específica pode ser desencadeada através da imunidade ativa ou através da imunidade passiva. Quando a resposta a um determinado microorganismo ocorre como reação a um antígeno, sendo produzida pelo próprio indivíduo, ela é chamada de imunidade ativa. Quando a imunidade a um antígeno é conferida pela transferência de anticorpos ou células de um indivíduo imunizado para um receptor que se tornará resistente a determinado antígeno mesmo sem ter sido exposto a ele, ela é chamada de imunidade passiva.

Os linfócitos são as principais células da resposta imune adquirida, sendo os responsáveis por sua especificidade, uma vez que reconhecem até sutis diferenças entre os variados tipos antígenos. Quando os receptores de superfície para antígenos são expressos, durante a maturação, eles se tornam responsivos à estimulação antigênica e se desenvolvem

em diferentes classes funcionais. Existem dois tipos de respostas imunes adquiridas, a imunidade celular e a imunidade humoral, que possuem componentes imunológicos distintos.

### 1.3.1. Características da Imunidade Adaptativa

A imunidade adquirida apresenta características fundamentais que a difere da imunidade natural. A resposta imune adquirida apresenta alta especificidade a um determinado antígeno ou até mesmo a determinadas porções deste antígeno. As porções reconhecidas especificamente pelos linfócitos são chamadas de determinantes ou epítomos. Essa especificidade deve-se aos receptores presentes na membrana dos linfócitos, que são capazes de reconhecer diferenças mínimas na estrutura dos antígenos. O sistema imunológico é capaz de reconhecer milhares de antígenos diferentes devido a enorme diversidade do seu repertório linfocitário. A resposta imune adquirida apresenta também a capacidade de memória. Quando o sistema é submetido a um determinado patógeno, as células utilizadas em sua eliminação permanecem viáveis por longos períodos, podendo reagir novamente, de forma mais rápida e eficiente, no caso de uma segunda infecção com o mesmo patógeno. A imunidade adquirida é autolimitante. Uma vez eliminado o antígeno que disparou o processo imune, as respostas imunológicas tendem a cessar, de forma que o organismo retorne ao seu estado basal, num processo chamado de homeostasia (Figura 1.3). O sistema imunológico é também caracterizado por sua tolerância a antígenos próprios. Embora seja capaz de reconhecer e eliminar antígenos estranhos, o sistema imunológico apresenta mecanismos de controle que inibem respostas contra antígenos do próprio hospedeiro, prevenindo assim a ocorrência de doenças auto-imunes.

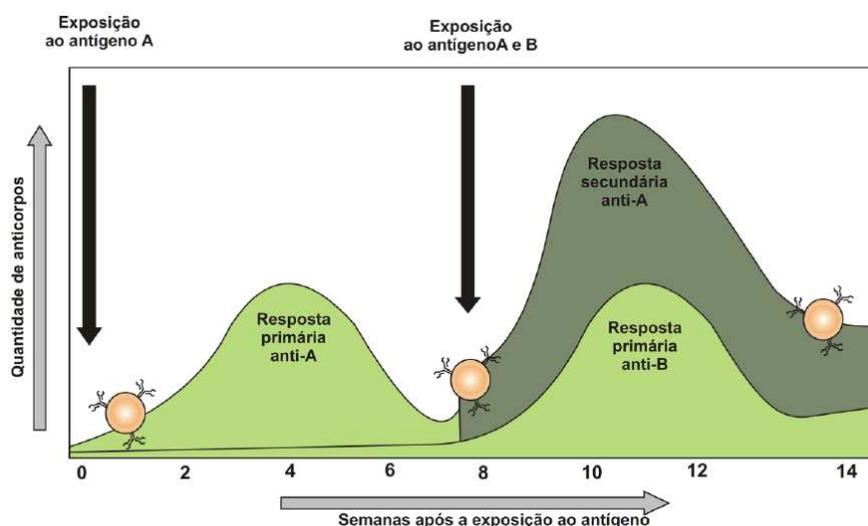
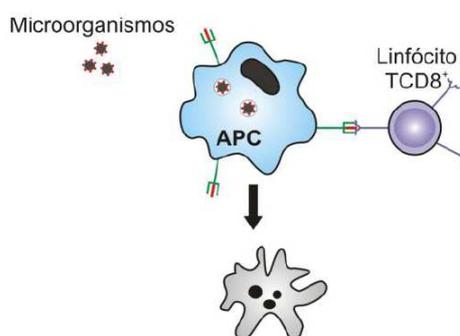


Figura 1.3. A resposta imune adquirida apresenta alta especificidade (antígenos A e B induzem a produção de diferentes anticorpos), memória (a resposta secundária ao antígeno A é mais rápida e maior que a resposta primária) e autolimitação (os níveis de anticorpos declinam ao longo do tempo).

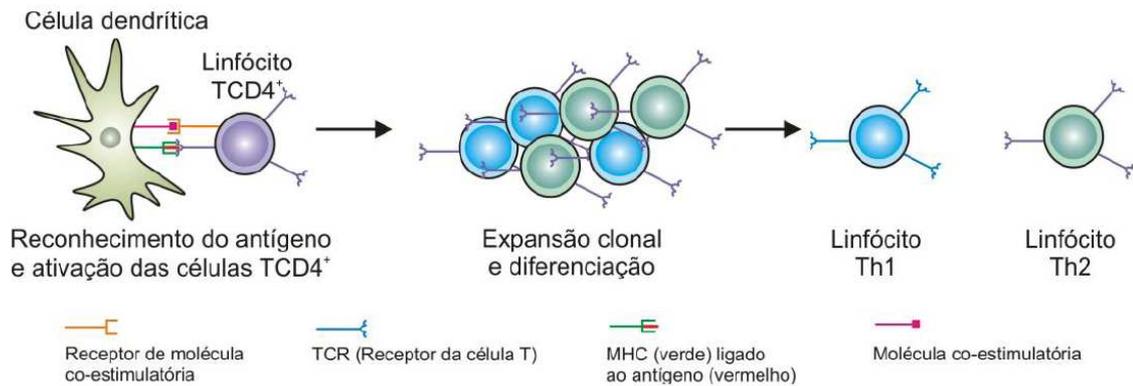
### 1.3.2. Imunidade Celular

A imunidade celular atua no combate a microorganismos intracelulares, que no interior das células do hospedeiro ficam inacessíveis a ação dos anticorpos circulantes provenientes da resposta humoral. A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T, que possuem receptores para antígenos em suas membranas, chamados de TCR (receptor da célula T). O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T depende da presença desses antígenos na membrana de células em associação a proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e de moléculas co-estimulatórias. Dessa forma, os linfócitos T respondem somente a antígenos associados à superfície celular, não podendo responder à antígenos solúveis. Os linfócitos T se subdividem em duas subclasses: os linfócitos T auxiliares ou T *helper* (Th) e os linfócitos T citotóxicos (CTL). Os linfócitos T auxiliares apresentam em suas superfícies o marcador CD4 enquanto os linfócitos T citotóxicos apresentam o marcador CD8. A forma de resposta dessas células frente a antígenos de superfície é bastante diferente. Os linfócitos T citotóxicos ( $CD8^+$ ) realizam a lise das células que possuem antígenos estranhos, como células infectadas por patógenos intracelulares (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** As células  $TCD8^+$  reconhecem peptídeos antigênicos de microorganismos fagocitados associados a MHC de classe I e destroem as células.

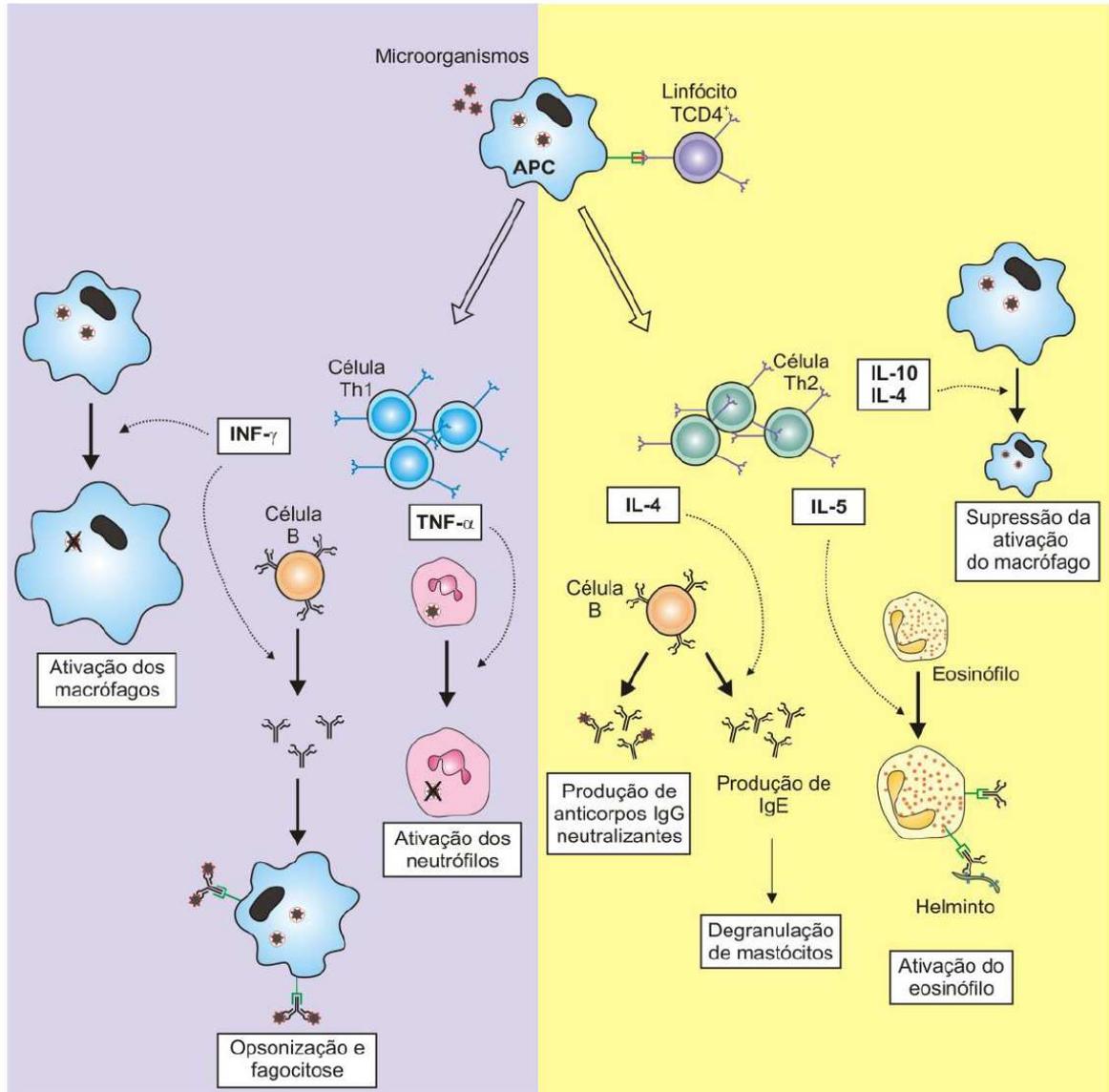
Os linfócitos T auxiliares ( $CD4^+$ ), por sua vez respondem aos antígenos secretando citocinas que disparam o processo inflamatório e ativam diferentes tipos celulares. Após o reconhecimento de algum antígeno estranho associado ao MHC de alguma APC pelas células T  $CD4^+$ , elas tornam-se ativadas, expandem-se em vários clones e diferenciam-se, para que o combate ao antígeno estranho seja efetivado. A população de células T  $CD4^+$  é heterogênea, podendo se diferenciar em dois subconjuntos principais: as células Th1 e Th2, que produzem um perfil de citocinas distinto um do outro (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> frente à exposição ao antígeno. As células TCD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em subpopulações distintas, principalmente Th1 e Th2 em resposta ao antígeno, aos co-estimuladores e às citocinas.

Ambas as respostas, Th1 e Th2, são importantes na defesa do hospedeiro contra infecções. A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra helmintos e bactérias extracelulares. Os linfócitos Th1 secretam principalmente Fator de necrose Tumoral (TNF), Interleucina-2 (IL-2) e Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). O IFN- $\gamma$  age nos macrófagos para aumentar a fagocitose e a destruição de microorganismos fagocitados. Nos linfócitos B, o IFN- $\gamma$  estimula a produção de Imunoglobulinas G (IgG) que opsonizam microorganismos para a fagocitose, importante ativador de macrófagos. O TNF é importante para a ativação dos neutrófilos e conseqüentemente para a estimulação do processo inflamatório. Os linfócitos Th2, por sua vez, produzem principalmente IL-4, IL5, IL10 e IL-13, perfil de citocinas que estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, direcionando para a imunidade humoral (dependente de anticorpos). A IL-4 estimula a produção de IgE, que se liga a mastócitos. A IL-5 ativa os eosinófilos, resposta importante na defesa contra infecções helmínticas. Essas respostas são antagônicas, uma vez que o IFN- $\gamma$  modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, possibilitando uma resposta imune balanceada (Figura 1.6).

**IMPORTANTE:** A identificação das diferentes subpopulações de linfócitos T foi possível somente após a descoberta de que essas células apresentam proteínas de membrana distintas em suas superfícies. Essas proteínas constituem os marcadores fenotípicos das diferentes subpopulações linfocitárias, sendo chamadas de CDs. Os CDs são moléculas que podem ser reconhecidas por anticorpos monoclonais. A identificação dos diferentes tipos de linfócitos pode ser feita por citometria de fluxo de acordo com os seus marcadores de superfície.



**Figura 1.6.** Funções efetoras das células Th1 e Th2. As células Th1 e Th2 produzem diferentes tipos de citocinas, que ativam diferentes vias de resposta imune. A resposta produzida por Th1 é mais efetiva no combate à microorganismos intracelulares, enquanto a resposta produzida por Th2 é eficaz no combate de patógenos extracelulares.

### 1.3.3. Imunidade Humoral

A imunidade humoral é mediada por moléculas (imunoglobulinas) presentes no sangue, chamadas de anticorpos, que são produzidas e secretadas pelos linfócitos B em resposta a um estímulo antigênico. As imunoglobulinas ligam-se especificamente aos determinantes epítopos antigênicos presentes em um antígeno, desencadeando suas funções efetoras. Elas constituem o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas. Os anticorpos reconhecem antígenos microbianos, interrompem a ação dos microorganismos infecciosos e sinalizam para o organismo a necessidade de remoção deste patógeno. Diferentes tipos de anticorpos podem ativar mecanismos efetores diferentes. Os anticorpos podem atuar como opsoninas, ativando o sistema do complemento, que por sua vez induz a lise do microorganismo, ou desencadeando o processo de fagocitose (Figura 1.7).

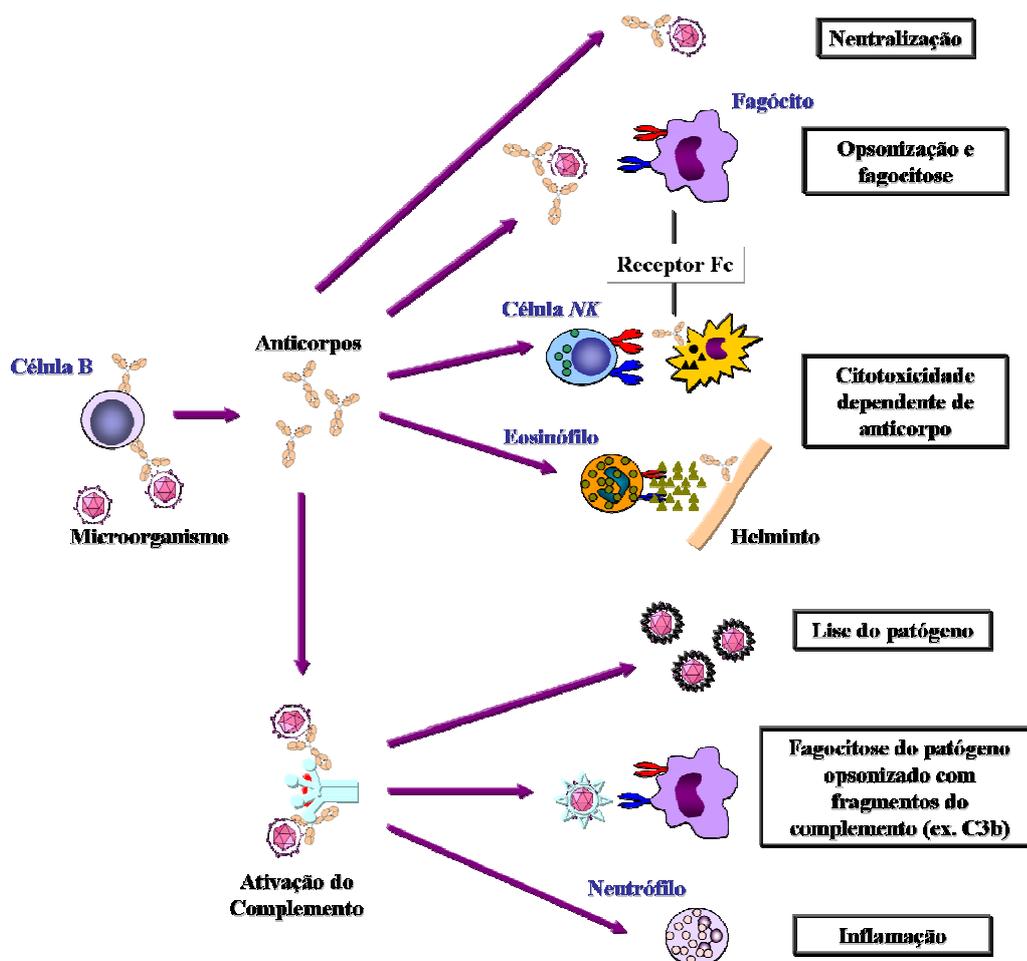
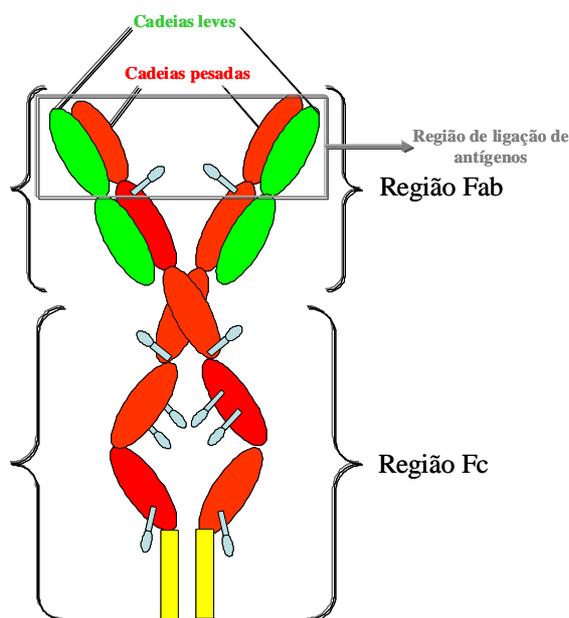


Figura 1.7: Funções efetoras dos anticorpos. Os anticorpos contra microorganismos infecciosos neutralizam esses agentes, opsonizando-os para a fagocitose ou para a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e ativam o complemento.

Estruturalmente as moléculas de anticorpo possuem um formato em Y e são compostas por duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas por pontes dissulfeto. Cada cadeia de imunoglobulina, tanto a leve quanto a pesada, é formada a partir de segmentos gênicos que se rearranjam em uma seqüência específica para constituir a cadeia completa, formando as regiões variável e constante das mesmas.

Os braços da imunoglobulina são compostos pelas cadeias leves e pela região variável das cadeias pesadas (porção Fab). A região variável tanto da cadeia leve quanto da pesada participa no reconhecimento dos antígenos – especificidade.

Nas cadeias pesadas, as porções constantes interagem com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, participando assim como mediadora da maioria das funções biológicas dos anticorpos (região Fc). Existem cinco tipos diferentes de cadeias pesadas que formam região Fc da imunoglobulina e que definem as classes ou isotipos IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. As funções efetoras das imunoglobulinas são mediadas por esta região da molécula. Cada classe de anticorpo desempenha uma função efetora distinta na imunidade à diferentes patógenos (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Estrutura de uma molécula de anticorpo. A imunoglobulina apresenta uma região variável de cadeia leve e pesada (Região Fab) que atua no reconhecimento dos antígenos. As porções constantes da cadeia pesada (Região Fc) interagem com células efetoras do sistema imune, mediando diferentes funções biológicas dos anticorpos.

**IMPORTANTE:** As IgGs são imunoglobulinas capazes de desempenhar todas as funções conferidas aos anticorpos. É a mais abundante no soro e está igualmente distribuída nos compartimentos extracelulares, além de ser a única que normalmente atravessa a placenta. A IgG é a principal imunoglobulina produzida nas respostas humorais secundárias à patógenos. Além disso, as moléculas de IgG, tem uma alta afinidade para neutralizar partículas virais . Todas as características citadas acima tornam a IgG o anticorpo mais explorado em estudos de imunofenotipagem aplicados a citometria de fluxo .

#### **1.4. Produção de Anticorpos Monoclonais**

A produção e caracterização de anticorpos foram radicalmente alteradas em 1975 quando Köhler & Milstein descreveram a técnica de produção de anticorpos monoclonais utilizando a fusão de linhagens de células de carcinoma e de linfócitos B revolucionando a utilização de anticorpos em metodologias como imunofluorescência, hibridização *in situ* e citometria de fluxo. Essa técnica foi denominada hibridoma.

Os anticorpos que reconhecem apenas um único antígeno são denominados de monoclonais. Eles são produzidos e secretados por um único clone de linfócitos B antígeno-reativos. Alguns anticorpos podem reconhecer diferentes antígenos e, portanto ser produzidos a partir de clones distintos. Esses anticorpos são chamados policlonais. Ambos os anticorpos, monoclonais e policlonais, presentes no soro podem ser utilizados em ensaios de imunofenotipagem. Os anticorpos monoclonais são quimicamente idênticos. Eles têm a vantagem de possuir uma alta especificidade e afinidade ao antígeno. Os anticorpos monoclonais são os mais usados em pesquisa, em diagnóstico clínico e terapia.

Para a produção de anticorpos monoclonais comercialmente, utilizam-se ensaios de cultura de hibridomas formados por linfócitos B antígeno-específicos e células obtidas de tumores. Nesse estudo camundongos são desafiados com um antígeno X. As células esplênicas secretoras de anticorpos (células B antígeno específicas) são adquiridas do baço desses animais e cultivadas em meio HAT com um inibidor que bloqueia vias normais de biossíntese de nucleotídeos. Dessa forma, as células normais utilizam uma via alternativa para sintetizar seus ácidos nucléicos. Essa via é defectiva em linhagens de células tumorais que, portanto morrem em cultura com meio HAT. Para se produzir uma fonte contínua de anticorpos as células normais esplênicas são fundidas com células de mieloma, gerando híbridos, e cultivadas *in vitro* em microplacas. As células híbridas passam a expressar o gene envolvido com essa via alternativa de produção de aminoácidos e, portanto, apenas as células

tumorais fundidas com as células B antígeno-reativas esplênicas conseguem sobreviver e crescer continuamente nesse tipo de meio de cultura. Os sobrenadantes de poçinhos de cultura contendo hibridomas individuais são colhidos e submetidos a ensaios de imunodeteção de anticorpos. As células reativas ao antígeno X são clonadas. Esses clones de híbridos são então expandidos em escala industrial produzindo-se uma grande quantidade de um determinado anticorpo monoclonal. Como eles descendem de um único tipo de célula específica, todas as células da linhagem desse hibridoma geram anticorpos monoclonais específicos (Figura 1.9).

**IMPORTANTE:** As comunicações entre diferentes células da imunidade inata são importantes para o reconhecimento do tipo de patógeno invasor, assim como para o desencadeamento das funções efetoras para a eliminação do agente infeccioso. Essas “sinapses imunes” ocorrem através do reconhecimento de moléculas solúveis que modulam a inflamação, as citocinas, por diferentes receptores expressos nessas células. Através da citometria de fluxo é possível identificar essas citocinas intracelulares, utilizando-se marcadores específicos. Além disso é possível avaliar qual a célula produtora de determinada citocina através da marcação de superfície, que caracteriza fenotipicamente as populações celulares.

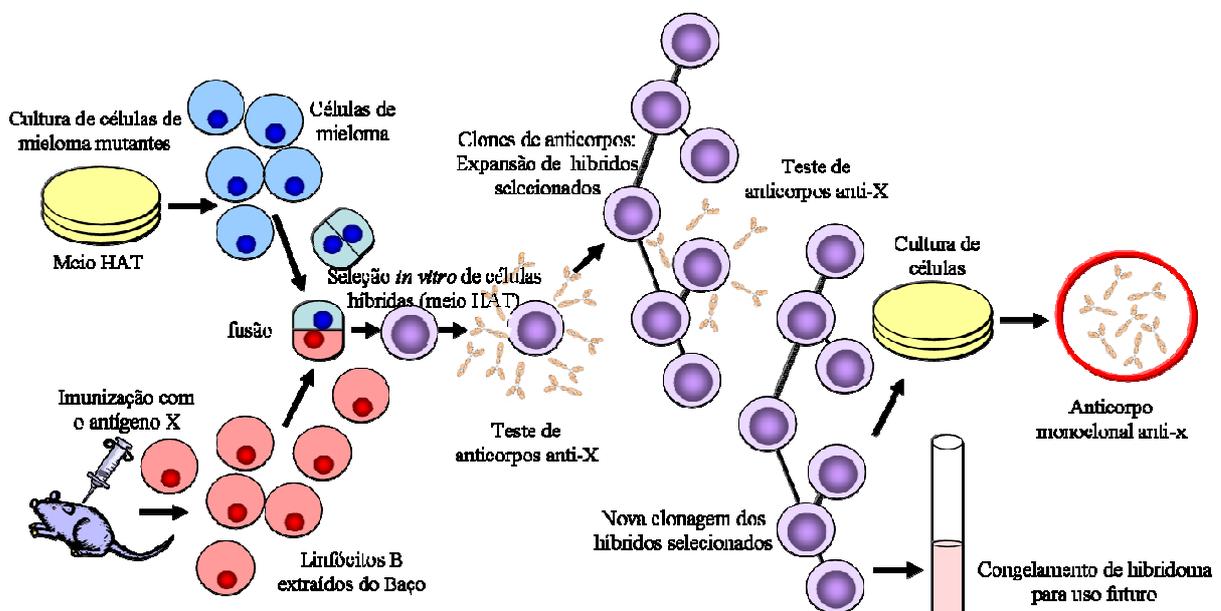


Figura 1.9. Produção de anticorpos monoclonais. Anticorpos monoclonais são produzidos a partir de ensaios de cultura de hibridomas, formados por linfócitos B antígeno-específicas e células obtidas de tumores.

### **1.5. Morte celular programada: Apoptose**

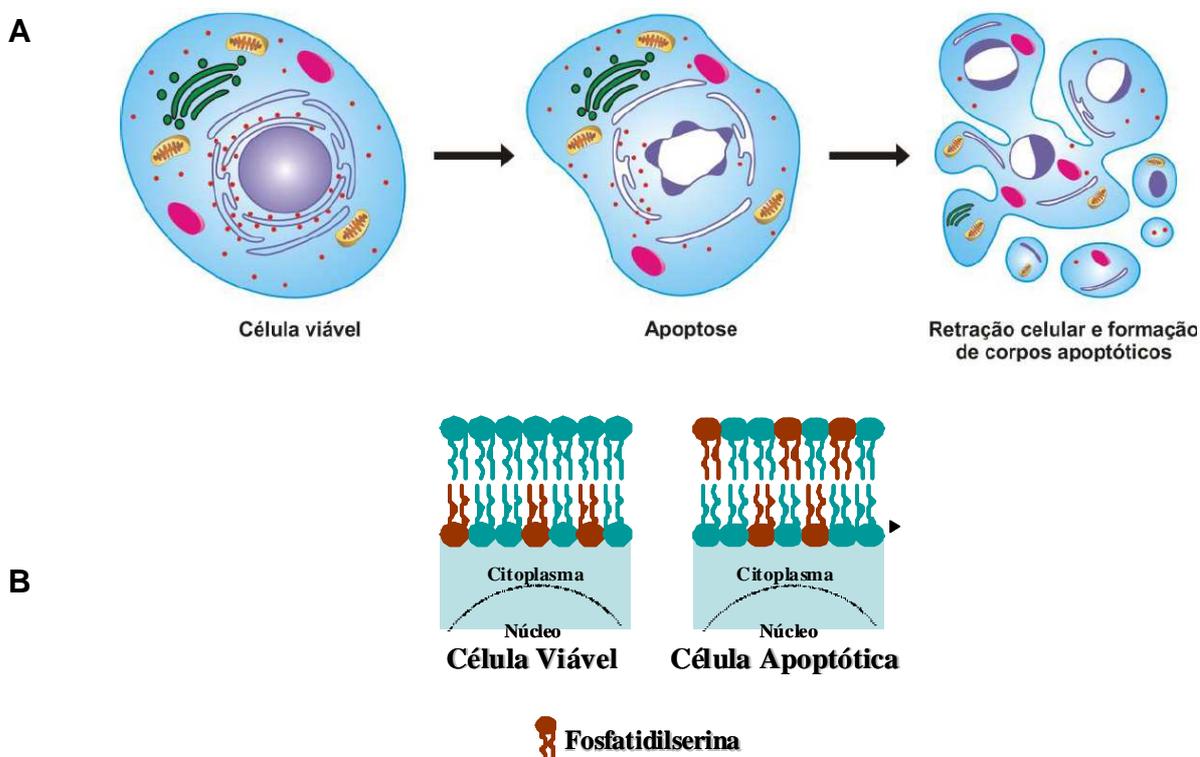
A morte celular é um evento essencial na vida normal dos organismos, nas respostas imunes frente a infecções causadas por uma variedade de microorganismos infecciosos ou nos eventos patofisiológicos que desencadeiam a doença. A nomenclatura clássica distingue duas principais formas de morte celular: apoptose e a necrose.

A necrose é a morte celular acidental em tecidos ou órgãos. Ela compreende um evento patofisiológico que evolui por uma conseqüente interrupção dos processos celulares. Agentes físicos, químicos ou infecções podem originá-la. Esses agentes comprometem o metabolismo celular, a integridade da membrana celular e a manutenção da capacidade de multiplicação celular. Todos esses eventos culminam na perda da homeostase celular, de forma que a célula perde a sua vitalidade. Dessa forma, a necrose abrange alterações regressivas que provocam lesões irreversíveis na célula. O tecido morto ou necrosado é ingerido e degradado pelos fagócitos, que atuam na limpeza do tecido danificado e na cura da lesão.

A apoptose, diferente da necrose, é uma morte celular genética, biologicamente programada sem a perda da integridade de membrana celular e é aparentemente compartilhada por todos os organismos multicelulares, tendo sido descrita também em alguns organismos unicelulares. Ela consiste em um mecanismo pelo qual as células com DNA danificado podem ser eliminadas sem gerar prejuízo, através da fagocitose dos corpos apoptóticos. Tal processo culmina na ativação de uma cadeia enzimática complexa de sistemas de sinalização intracelular, que levam à destruição de componentes essenciais à sobrevivência das células. Ela ocorre em resposta a uma variedade de sinais e estímulos, tanto intra como extracelulares, incluindo deficiência de fatores de crescimento, hormônios, citocinas, ativação de receptores de morte e proteases endógenas, pela interação via granzima B/perforinas utilizadas por células do sistema imune ou ainda por agentes virais, químicos ou físicos.

### 1.5.1. Características morfológicas e bioquímicas da apoptose

Ao nível celular, a apoptose é caracterizada pela compactação e marginalização da cromatina nuclear e, posteriormente, citoplasmática, com formação dos corpos apoptóticos contendo organelas íntegras. Esses corpos são fagocitados pelas células ao redor e degradados. Sabe-se que as células hematopoiéticas normais possuem uma disposição assimétrica dos fosfolipídios de membrana. A fosfatidilcolina e esfingomiéline, localizam-se preferencialmente parte externa da membrana, enquanto a fosfatidiletanolamida e a fosfatidilserina compõem sua porção interna. No decorrer do processo apoptótico ocorre a perda dessa assimetria e a exposição da fosfatidilserina na superfície externa da célula. Em relação à bioquímica, o que ocorre, inicialmente, independente do estímulo desencadeador, é a clivagem do DNA de dupla hélice nas regiões de ligação dos nucleossomos. Com isso, há uma produção de múltiplas cadeias de pares de bases. Este processo de clivagem é feito por endonucleases endógenas e estritamente controlado por vários genes, como a família dos genes Bcl-2 e a família dos genes ativadores de endonucleases (Figura 1.10).



**Figura 1.10:** Alterações morfológicas e nucleares em células apoptóticas. As células em apoptose sofrem uma retração, com projeções digitiformes da membrana celular e formação de corpos apoptóticos. A nível nuclear ocorre fragmentação da membrana nuclear, condensação da cromatina e fragmentação do DNA pela ação de endonucleases (A). A nível de membrana plasmática ocorre a externalização da fosfatidilserina, porém sem perda de integridade de membrana (B).

### 1.5.2. Vias de sinalização da apoptose

O processo de apoptose pode ser engatilhado por duas vias. A forma pela qual a célula responde à morte pode ser através do ambiente (via extrínseca/receptores de morte) ou por sinais internos, que induzem a ativação do processo apoptótico (via intrínseca/via mitocondrial). Independente de como ela é iniciada, a apoptose resulta na ativação de uma classe específica de cisteína-proteases, as caspases (que se encontram na sua forma inativa – pró-caspases), de extrema importância, pois clivam proteínas celulares que culminam na desestruturação celular. As caspases são divididas em dois grupos, aquelas denominadas iniciadoras, envolvidas nos eventos iniciais reguladores da apoptose, e as efetoras, que são proteoliticamente ativadas em uma cascata conduzindo à desintegração celular (Figura 1.11).

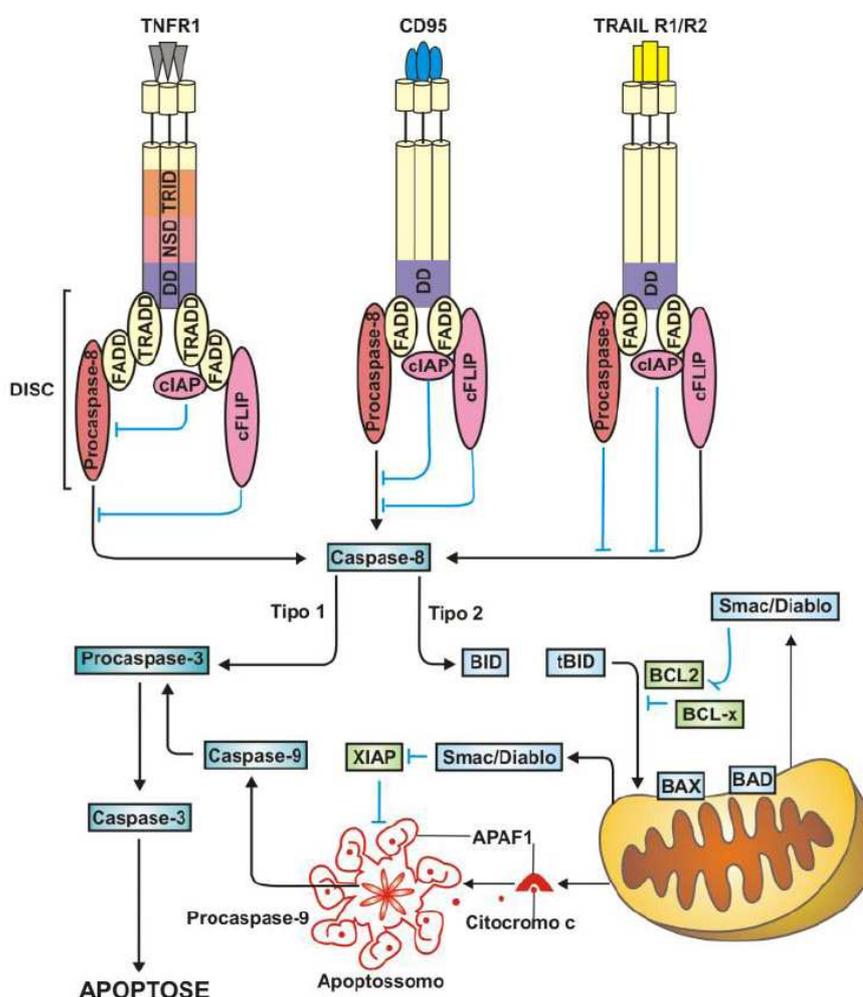


Figura 1.11. Vias de sinalização da Apoptose. Tipo 1: Seguindo a trimerização dos receptores de morte e o recrutamento das proteínas adaptadoras, pró-caspases, são também recrutadas e ativadas. A caspase 8 ativa a caspase 3 conduzindo a desintegração celular. Tipo 2: A caspase 8 também cliva Bid em tBid, que é translocado para a mitocôndria modulando a permeabilidade mitocondrial e promovendo a liberação do citocromo c, que induz a Apaf-1 e a pro-caspase 9 para ativar a caspase 9 e 3. Seguindo o sinal de morte, ptn da família do gene Bcl-2 associadas a mitocôndria são reguladas levando a liberação de mediadores que promovem a amplificação da cascata apoptótica. Além das vias de sinalização que culminam na apoptose vários outros mecanismos regulatórios existem para inibir a morte celular. Dentre esses podemos citar o papel das IAPS e proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2.

### 1.5.2.1. Via extrínseca

O principal evento pelo qual se origina a apoptose consiste na transdução de um sinal através de receptores de morte. A via extrínseca é ativada quando TNF- $\alpha$ , Fas ligante ou TRAIL, ligam-se a seus respectivos receptores, que fazem parte da família dos receptores TNF (TNFR)/TNF: TNFR1, TRAIL-R1/2 e Fas (CD95/APO-1). Quando estimulados, eles são recrutados para a superfície e trimerizam-se juntamente com proteínas adaptadoras citoplasmáticas associadas a eles. A formação desse complexo promove a ativação das caspases efetoras que, no citosol, induzem uma série de clivagens proteolíticas, culminando na ativação da caspase-3 efetora. Quando ativada, essa caspase promove a ativação de proteínas importantes que induzem danos ao DNA.

**IMPORTANTE:** Os receptores de morte também estimulam, através de proteínas adaptadoras, sinais antiapoptóticos. Quando ativados por essa via antiapoptótica, fatores de transcrição são translocados para o núcleo e ativam a expressão de genes, incluindo as IAPs, proteínas que inibem a atividade da caspase 8.

### 1.5.2.2. Via intrínseca

Os mecanismos moleculares envolvidos na ativação da via intrínseca apoptótica ainda não estão totalmente esclarecidos. Eles são induzidos por toxinas ou estresse causado por carência de fatores de crescimento, instabilidade genômica, privação de energia, patógenos, dano ao DNA causado por drogas ou UV.

A família dos genes Bcl-2 representa um fator chave na via de apoptose intrínseca. Ela codifica duas classes de proteínas: aquelas com atividade anti-apoptótica (por exemplo, Bcl-2 e Bcl-x1) e as com atividade pró-apoptótica (por exemplo, Bid e Bax). Essas proteínas podem estar associadas a membranas de organelas ou no citosol. Quando ativadas, as proteínas da família Bcl-2 têm a capacidade de induzir ou inibir a permeabilidade de membrana. A membrana mitocondrial é local de muitos dos membros da família Bcl-2 e seu papel ativo no programa mitocondrial de apoptose implica que eles sejam parte do mecanismo efetor de morte baseado nesta organela. O aumento da permeabilidade mitocondrial e conseqüentes alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) vêm sendo relacionados com os eventos iniciais que envolvem todo o sistema apoptótico intrínseco. Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, ocorre o colapso do  $\Delta\psi_m$ , bem como a uma

transição da permeabilidade mitocondrial, em parte pela interação das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 que formam canais ou poros na membrana mitocondrial. Esses mecanismos culminam na liberação de proteínas do espaço intermembranar, como citocromo C, para o citoplasma. A função do citocromo C consiste em modular a ativação da caspase 9, localizada em um complexo formado no citoplasma conhecido como apoptossomo. A caspase 9 ativada induz a ativação da caspase 3 efetora, culminando na desintegração celular.

**IMPORTANTE:** Proteínas com funções pró-apoptóticas também são liberadas pelos poros formados na membrana da mitocôndria, como a Smac/DIABLO, que bloqueia as XIAPs, proteínas inibidoras de apoptose.

As células desenvolveram vários mecanismos regulatórios para inibir a apoptose. Proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 compreendem um desses. O proto-oncogene Bcl-2 foi o primeiro membro da família Bcl-2 a ser descoberto. O gene codifica a proteína Bcl-2, expressa constitutivamente em todas as células hematopoiéticas e linfóides, além de muitas células epiteliais. Ela, assim como as outras proteínas dessa família com função anti-apoptótica, inibe direta ou indiretamente a formação de poros na membrana mitocondrial e, portanto, protege a célula da apoptose. Sua expressão inapropriada está correlacionada com o crescimento neoplásico (aumento de expressão) ou apoptose desregulada (diminuição de expressão).

**IMPORTANTE:** A caspase 8 também cliva uma proteína citosólica, a p22 Bid, em uma forma truncada (Bidt). A Bidt tem um importante papel, pois interconecta tanto a via extrínseca quanto a intrínseca apoptótica. Na via extrínseca, a permeabilização da membrana mitocondrial serve como uma alça amplificadora da ativação de caspases efetoras.

### **1.5.3. Papel da apoptose no sistema imune**

Fisiologicamente a apoptose está envolvida em diversos processos, como na renovação e remodelamento tecidual, durante o desenvolvimento e metamorfose em animais multicelulares, e na seleção intratímica dos linfócitos T.

Durante o desencadeamento das respostas efetoras a apoptose tem um papel essencial tanto na imunidade inata quanto adaptativa. As células apoptóticas sofrem algumas mudanças a nível de membrana celular e são rapidamente reconhecidas e ingeridas pelos fagócitos. A célula ingerida é completamente degradada e digerida pelos fagócitos sem a indução de inflamação em decorrência da morte celular. Durante as respostas citotóxicas os linfócitos T CD8, através da ação dos grânulos, induzem a ativação de enzimas (nucleases) que promovem a destruição do DNA celular. Os mecanismos apoptóticos também podem agir diretamente sobre agentes patogênicos, culminando por exemplo, na destruição do DNA viral e evitando, assim, a montagem dos vírions e sua liberação.

### **1.5.4. Apoptose nas doenças infecto-parasitárias**

A morte celular programada é um mecanismo freqüentemente dominante durante os processos patológicos. A apoptose é um fator regulatório do sistema imune, fundamental na resposta imune em infecções causadas por uma variedade de agentes infecciosos. Interferir no mecanismo de apoptose, inibindo-a ou estimulando-a, pode representar uma estratégia eficaz do microorganismo para escapar do sistema imunológico e garantir sua sobrevivência e replicação. Um exemplo são as alterações fenotípicas induzidas por diferentes microorganismos patogênicos em células infectadas, “escondendo” essas células da morte por citotoxicidade de linfócitos T e tornando-as importantes reservatórios de replicação do patógeno. A apoptose induzida pelo parasito pode também facilitar sua disseminação no organismo através da fagocitose de células infectadas – “Cavalo de Tróia”.

Por outro lado, a apoptose pode representar um mecanismo de resposta apropriado para limitar o alastramento da infecção no hospedeiro. Os produtos da replicação de um parasito intracelular, por exemplo, são freqüentemente associados a alterações nas vias de biossíntese de proteínas em células do hospedeiro infectadas. Algumas vezes essas mudanças tornam-se importantes para ativar a apoptose de células infectadas, na tentativa de conter a infecção. Além disso, moduladores inflamatórios induzidos podem também interferir nos mecanismos de morte celular levando a destruição de células infectadas.

## 1.6. Citometria na Imunologia

O sistema imunológico tem como função básica promover a defesa contra microorganismos infecciosos e substâncias estranhas. Para desencadear suas funções diversas células leucocitárias são estimuladas, ativadas, se proliferam e produzem uma gama de mediadores moleculares, desencadeando respostas efetoras importantes para combater a infecção. Como apresentado, o sistema imune age através de dois mecanismos: a imunidade inata e a adaptativa (Tabela 1.1).

As aplicações da citometria na Imunologia são diversas, incluindo:

- Separação de células sanguíneas;
- Diferenciação de subpopulações de leucócitos;
- Quantificação antigénica;
- Variações linfoproliferativas;
- Fagocitose;
- Apoptose.

**Tabela 1.1: Características gerais do sistema imune**

	Inata	Adaptativa
Reconhecimento	PAMP (Patterns of Pathogen-associated Moléculas como DNA microbial, lipídeos, polissacarídeos e proteínas do flagelo de bactérias)	Determinantes (epitopos) antigénicos específicos
Desenvolvimento	Rápido, imediato	Demorado (1-2 semanas)
Mensageiros	Citocinas	Citocinas
Memória	Não ?	Sim, duradoura
Apresentação antigénica	Reconhecimento direto pelos receptores do tipo Toll ou outros	Processamento, sinapse: Anticorpo – Humoral Medida por célula Citotóxica Auxiliar
Células	Macrófagos/monócitos Células dendríticas Células NK Fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos)	Células B (RI humoral) Células T (RI celular) células T CD4 células T CD8
Fatores solúveis	Moléculas do sistema complemento e citocinas	citocinas
Sistema	Aparentemente simples, reconhecimento e resposta rápida e direta	Reconhecimento e resposta altamente complexa

## CAPÍTULO 2. HISTÓRICO DA CITOMETRIA DE FLUXO

**Raquel Ferraz**

### 2.1. Introdução

A citometria de fluxo pode ser definida como metodologia, tecnologia e/ou ferramenta direcionada ao estudo de células, e utilizada na identificação, avaliação, e diferenciação de diversas características celulares como conteúdo de DNA e RNA, receptores de superfície, atividade enzimática, produção de citocinas e de íons. Baseia-se na detecção de substâncias fluorescentes (fluorocromos) acoplados a anticorpos, capazes de se ligar a determinada molécula presente nas células - avaliadas uma a uma. Além disso, a citometria de fluxo permite ainda a separação rápida e purificada de uma suspensão heterogênea de células – processo denominado *Sorting*.

O princípio básico da citometria resume-se no emprego de uma radiação laser direcionada, que excita substâncias fluorescentes (fluorocromos) presentes nas células, através das quais podemos interpolar informações biológicas, moleculares e/ou químicas das células em suspensão. Estas células marcadas são então transportadas e protegidas por um fluxo hidrodinâmico contínuo (solução salina), que acomoda as mesmas, de forma que individualmente sejam interceptadas pelo laser. Ao ser excitado pela radiação do laser, o fluorocromo emite luz, que dependendo do comprimento de onda, possui uma cor característica. Os sistemas óticos (espelhos) e eletrônicos, coletam, filtram e convertem em pulsos elétricos os parâmetros de dispersão de luz e fluorescência emitidos. A aquisição destes parâmetros se dá através de um sistema computacional específico, permitindo ainda que o usuário interaja com a máquina e controle as funções da mesma (Figura 2.1). A seguir, os pulsos elétricos são convertidos em dados digitais ou analógicos, enviados a um computador e avaliados em software específico capaz de reproduzir através de gráficos mono e biparamétricos, informações físicas, químicas e biológicas de cada célula, em função da intensidade de fluorescência e da luz dispersada.



Figura 2.1. Citômetro de fluxo padrão. Câmara de fluxo, para onde a suspensão é aspirada; sistema de espelhos e foto-sensores para direcionamento e captação de luz, sistema computacional para a conversão em dados digitais e análise.

## 2.2. Como iniciou este estudo?

Especialistas de diversas áreas (como biologia, engenharia, ciência da computação, biologia molecular, física e matemática) através de técnicas científicas e do constante e crescente interesse em aprimorar as mesmas, contribuíram para o surgimento do primeiro citômetro de fluxo e para o desenvolvimento destes equipamentos até os dias atuais.

A história da citometria de fluxo pode ser contada a partir da invenção do microscópio ótico; seguido dos corantes, que permitiram a visualização de constituintes celulares; e das substâncias fluorescentes acompanhadas do surgimento do microscópio de fluorescência. O desenvolvimento dos anticorpos monoclonais associado ao uso das substâncias fluorescentes possibilitou uma maior especificidade na identificação dos componentes celulares, com conseqüente classificação mais detalhada das células. Posteriormente, o surgimento do laser, o desenvolvimento eletrônico, e a revolução da informática computacional foram fundamentais para a evolução destes equipamentos.

A invenção do microscópio no século XVII foi seguida da descoberta das células sanguíneas, que por sua vez, despertou o interesse dos pesquisadores em saber o número destas células.

Neste cenário iniciou-se uma série de estudos e descobertas, que ao serem associadas e aprimoradas, resultaram nas aplicações do que conhecemos hoje como **Citometria de Fluxo**.

**1930, Suécia – Caspersson** - Começou a estudar os ácidos nucléicos das células e sua relação com o crescimento e funcionamento das mesmas. Este pesquisador desenvolveu um microespectrofotômetro capaz de medir, com certa precisão, ácidos nucléicos e o

conteúdo protéico baseado na absorção de luz ultravioleta (UV) em um comprimento de onda que se aproximava de 260 – 280 nm.

**1934, Canadá – Andrew Moldaven** - Desenvolveu um contador de células com um sensor fotoelétrico, acoplado na ocular do microscópio, no qual as células previamente coradas eram visualizadas e registradas passando por um tubo capilar montado sob um microscópio ótico.

**1940, E.U.A. – Coons** - O médico Albert Coons desenvolveu uma técnica de imunofenotipagem, que revolucionou os estudos na área de imunologia, na qual ele observou que os anticorpos poderiam ser conjugados à fluoresceína sem comprometer sua propriedade de ligação específica ao antígeno

**1949, E.U.A. – Wallace Coulter** - Publicou o artigo: “*Means for counting particles suspended in a fluid*” no qual patenteou o primeiro contador de células eletrônico utilizando um método alternativo de detecção e contagem individual de células em um meio líquido – solução salina isotônica. O contador de células desenvolvido por Wallace Coulter permitia uma contagem rápida e automatizada de células sanguíneas, e passou a ser utilizado em laboratórios clínicos.

**IMPORTANTE:** Os princípios deste equipamento caracterizam alguns fundamentos da citometria de fluxo conhecidos atualmente: uma única célula passando através de um fluxo de solução salina (foco hidrodinâmico), detecção de sinais elétricos, e análise automatizada destes sinais.

**IMPORTANTE:** A Coulter Electronics Inc. foi uma das empresas de citometria de fluxo de maior importância no mercado mundial, e que, em meados de 2000, foi comprada pela Beckman, tornando-se conhecida como Beckman Coulter.

**1952/53, Inglaterra – Crosland e Taylor** - Semelhante ao princípio desenvolvido por Coulter, Crosland e Taylor, se basearam no uso de um sistema de fluidos pelo qual a célula era centralizada ao passar pelo mesmo, permitindo que houvesse um alinhamento para a contagem eletrônica.

**1953 - Parker e Horst** - Patentaram um contador de células capaz de detectar duas cores. Usado como contador hematológico de hemácias, coradas em vermelho; e leucócitos, corados em azul.

**1965, E.U.A – Louis Katmentsky** - Baseado nos avanços da citoanálise, Katmentsky associou a câmara de Crosland e Taylor à absorção de radiação UV desenvolvendo um microscópio baseado na espectrofotometria, e projetou um dispositivo capaz de selecionar as células da amostra e separá-las.

**1965, E.U.A – Mack Fulwyler** - Descreveu um separador de células – *Cell Sorter* - no qual as células sanguíneas eram adquiridas em equipamento do tipo ‘Coulter Counter’ e posteriormente a interceptação do laser eram desviadas por um campo eletrostático e coletadas em tubo de ensaio.

**1967 E.U.A - Van Dilla** - Teve influência do trabalho de Crosland-Taylor, montando uma câmara com o mesmo princípio de foco hidrodinâmico. Van Dilla desenvolveu o primeiro citômetro de fluxo com a configuração ortogonal e utilização de um laser argônio (488nm) como fonte luminosa.

**1969, Alemanha – Dittrich e Gohde** - Iniciou uma das aplicações mais importantes e utilizadas da citometria – uso de corantes de DNA – utilizando o brometo de etídeo. Primeiro citômetro de fluxo comercializado – ICP11.

**IMPORTANTE:** Naquela época, ‘citofotometria de pulso’ era o nome original do que conhecemos hoje por citometria de fluxo.

**1969, E.U.A. - Leonard Herzenberg** - Utilizou um equipamento similar ao de Van Dilla, e começou a utilizar a combinação de fluorescências, em protocolos multiparamétricos incluindo o que hoje conhecemos como tamanho e granularidade celular.

No final dos anos 60, os citômetros passaram a ser usados, também, para se obter amostras homogêneas de células a partir de amostras de leucócitos separando linfócitos e granulócitos.

**1974, E.U.A – Howard Shapiro** - Desenvolveu uma configuração ótica, com instrumentos de bloqueio de passagem de luz que permitiu a utilização de diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão de luz.

**1974 – Leonard Herzenberg** - Patenteou os citômetros desenvolvidos por seu grupo na Universidade de Stanford, E.U.A. (e que foram comercializados pela empresa BECTON & DICKINSON - BD) com a sigla FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorter*).

**1975 – Köhler e Milstein** - Introduziram a tecnologia dos anticorpos monoclonais. Prêmio Nobel.

**1975 – Gray** - Realiza a primeira descrição de cariótipo através da citometria de fluxo.

**1976 – Andreff** - Utiliza a citometria para classificar leucemias.

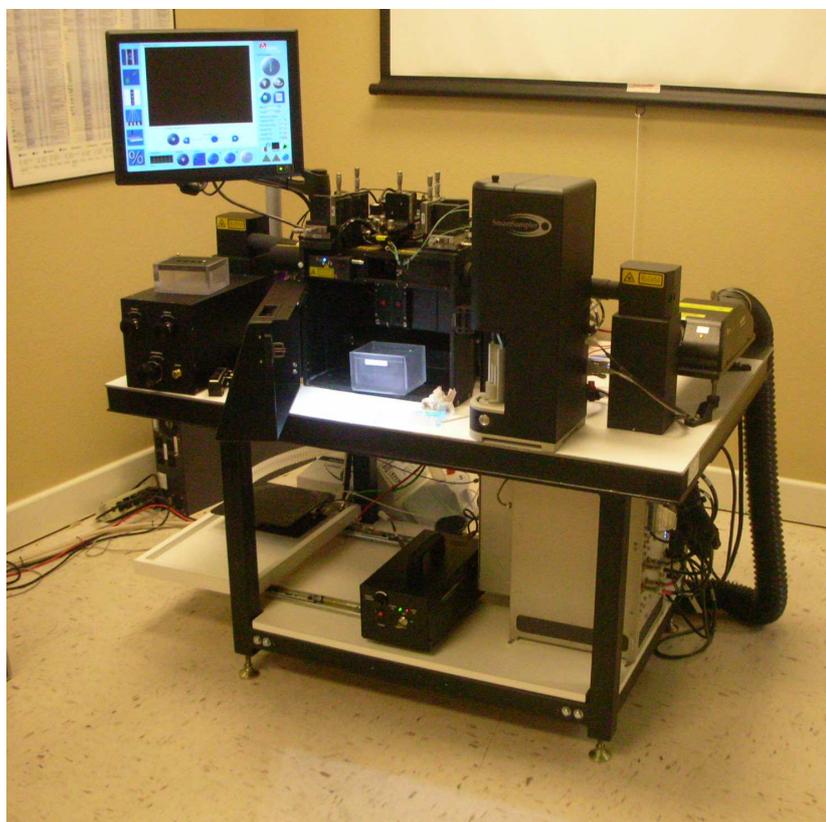
**1977 – Loken** - Mediu simultaneamente dois antígenos celulares com um só laser e realizou a chamada ‘compensação eletrônica’.

**1978 – Wallace Coulter** - Sua empresa, Coulter Electronics, Inc. lança no mercado o primeiro EPICS (*Electronically Programmabl Individual Cell Sorter*).

**1979 – Darzynkiewicz e Traganos** - Através do estudo de DNA e utilização de laranja de acridina publicam os primeiros trabalhos sobre ciclo celular utilizando a citometria de fluxo.

**IMPORTANTE:** A sigla EPICS está para os citômetros de fluxo da empresa hoje conhecida como Beckman Coulter, assim como a sigla FACS está para os citômetros de fluxo da empresa hoje conhecida como Becton & Dickinson (BD). A evolução dos citômetros a partir da década de 1980 aconteceu com a produção de equipamentos de ambas as empresas, as quais junto com a Dako-Cytomation (hoje em dia comprada pela Beckman Coulter) dominaram o mercado da citometria de fluxo.

Neste cenário, uma variedade de aplicações citofluorimétricas vem sendo desenvolvida e aprimorada progressivamente, devido à um crescente desenvolvimento dos recursos e tecnologia dos citômetros. Sendo assim, atualmente podemos encontrar no mercado citômetros de fluxo equipados com até seis lasers; com cada vez mais fotosensores (capazes de detectar até 11 comprimentos de onda diferentes (11 cores) acompanhando a produção de uma maior diversidade de fluorocromos; e *cell sorters* capazes de separar até 6 populações celulares diferentes; permitindo assim uma maior variedade e detalhamento de caracterizações fenotípicas e funcionas, assim como uma separação de populações celulares, como o moderno cell sorter da Beckman Coulter, Moflo (Figura 2.2).



**Figura 2.2. MoFlo XDP Cell Sorter. Beckman Coulter - 3 lasers, 11 cores - foto cortesia: Bertho, A.L.**

No Brasil, a história começa em 1988 com a chegada do primeiro citômetro de fluxo no País – o EPICS 751 da Coulter Electronics, Inc (Figura 2.3) instalado no Departamento de Protozoologia, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.



**Figura 2.3. EPICS 751 Cell Sorter Coulter Electronics. Primeiro citômetro de fluxo no Brasil – 2 lasers, 4 cores. Foto cortesia: Bertho A.L.**

Desde então a citometria de fluxo, devido a suas diversas aplicações na Biologia e na Biomedicina, apresenta uma crescente demanda de utilização por vários laboratórios clínicos e de pesquisa em todo o País, e por isso houve um aumento considerável na compra destes equipamentos. A partir de 1992, todo laboratório clínico que participasse da rede CD4/HIV teria, por determinação do Ministério da Saúde, que possuir um citômetro de fluxo em suas dependências para determinar as taxas da relação entre linfócitos  $CD4^+$  e  $CD8^+$  em pacientes HIV positivos. Além disso, laboratórios que trabalham com diagnóstico de leucemias necessitariam destes equipamentos para alcançarem seus laudos clínicos. Por causa disso, a FIOCRUZ e outras instituições de pesquisa (p.ex. UFRJ) criaram Plataformas Multiusuários de Citometria de Fluxo aumentando seus parques instrumentais e concentrando alguns citômetros de modo a oferecer essa tecnologia para a comunidade científica nacional.

No caso da FIOCRUZ existem atualmente duas Plataformas de Citometria de Fluxo:

- Plataforma do Programa de Desenvolvimento Tecnológico e Insumo em Saúde (PDTIS) – onde se encontra um FACS Aria Cell Sorter da BD (Figura 2.4).



**Figura 2.4.**FACS Aria Cell Sorter. 2 lasers 11cores foto cortesia: Ferraz, R.

- Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz – onde se encontram um FACS Calibur da BD (Figura 2.5); um Cyan ADP (Figura 2.6) e um EPICS ALTRA Cell Sorter (Figura 2.7), ambos da Beckman Coulter.



**Figura 2.5.** FACS Calibur Bench-top Analyzer – BD. 2 lasers, 4 cores. Foto cortesia: Ferraz, R.

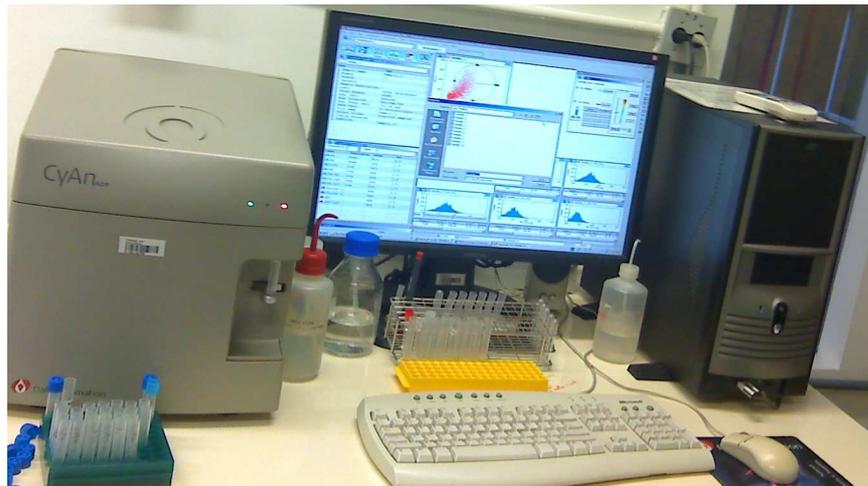


Figura 2.6. Cyan ADP Bench-top Analyzer – Dako Cytomation. 2 lasers 7 cores – foto cortesia: Ferraz, R.



Figura 2.7. EPICS Altra Cell Sorter – Beckman Coulter - 1 laser, 4 cores – foto cortesia: Bertho, A.L.

## CAPÍTULO 3. PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

**Raquel Ferraz**

### 3.1. Conceito Básico

A citometria de fluxo é um método utilizado para o estudo de células e é resultado da reunião e aplicação de técnicas desenvolvidas na área da computação; na produção de anticorpos monoclonais e de fluorocromos; na tecnologia dos raios laser; e na eletrônica. Permite a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (humanas, de animais, protozoários, fungos, ou bactérias), previamente preparados e marcados com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, com afinidade por determinada molécula de interesse.

Estes fluorocromos são excitados por uma radiação laser e emitem um comprimento de onda (cor) que é detectado por um sensor, chamado de fotomultiplicadores (PMTs) capazes de converter a luz captada em sinais eletrônicos, que são enviados ao computador, possibilitando, através de *software* específico, uma análise multiparamétrica para obtenção dos resultados. Esta análise é realizada através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respectivas características morfológicas das células.

### 3.2. Preparação das amostras para aquisição por citometria de fluxo

Para utilizar a citometria de fluxo como ferramenta de estudo as amostras devem estar em uma suspensão. Dois protocolos principais devem ser seguidos: um **protocolo de separação de células**; e outro **protocolo de marcação citofluorimétrica (Capítulo 7)**.

Seja esta amostra de sangue periférico, de cultura celular, de medula óssea, de tecido, ou de líquor, as células devem ser dissociadas e de forma a evitar a formação de grumos na suspensão. A seguir, deve-se escolher as partículas e ou moléculas celulares de interesse que irão receber a marcação. Para a escolha dos fluorocromos é necessário saber a configuração ótica do citômetro de fluxo a ser utilizado, em relação aos filtros que direcionam as cores a cada PMT.

### 3.3. Fluorocromos

A identificação de moléculas na superfície ou no interior das células (imunofenotipagem) através da utilização de anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos ou substâncias fluorescentes, ambos capazes de emitir cor, é a base para os protocolos citofluorimétricos (Capítulo 8).

Os fluorocromos são moléculas fluorescentes, que estão inicialmente em repouso, que são excitados por uma determinada fonte luminosa (laser), emitindo uma luz de comprimento de onda (cor) característica.

Quando utilizados em protocolos citofluorimétricos, e, portanto, ligados (mesmo que de forma indireta) a uma célula, os fluorocromos são excitados quando esta célula é interceptada pela luz do laser.

A maioria dos fluorocromos é excitada por um laser argônio (comprimento de onda de 488 nm), presente em todos os citômetros de fluxo. Alguns fluorocromos são excitados por outro comprimento de onda, e por isto, alguns citômetros são configurados com mais de um laser, p.ex.:

- Laser Ultravioleta – 355 nm
- Laser Violeta-Azul – 405 nm
- Laser Hélio-Neônio (HeNe) – 633 nm

Os fluorocromos são geralmente acoplados a anticorpos com afinidade por determinada estrutura química das células e biologicamente significativas, as quais podem caracterizar um tipo celular, um evento bioquímico ou um tipo de resposta imunológica. Por exemplo, o receptor de superfície CD3 está presente na membrana de todos os linfócitos T, e se utilizarmos um anticorpo anti-CD3 acoplado a um fluorocromo, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (488 nm de excitação e 525 nm de emissão) (Figura 3.1), todo linfócito T da amostra ao ser interceptado pelo laser terá o fluorocromo (FITC) excitado e o comprimento de onda que ele emite será captado pelo PMT através da configuração ótica.

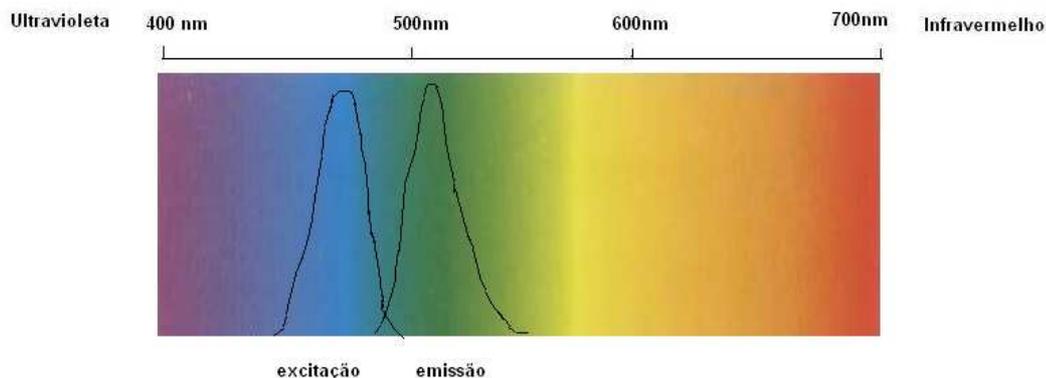


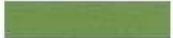
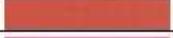
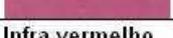
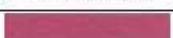
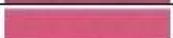
Figura 3.1: Espectro de comprimento de onda de excitação e de emissão do FITC.

Estes anticorpos estão comercialmente disponíveis no mercado por empresas especializadas como, a Beckman Coulter, Becton & Dickinson, Dako, entre outras. A combinação anticorpo monoclonal-fluorocromo deve ser escolhida de acordo com as moléculas que se deseja avaliar (Tabela 1.1) e a cor que o fluorocromo vai emitir.

Vale lembrar que para a escolha do fluorocromo é fundamental conhecer a configuração dos citômetros em relação aos filtros e número de PMTs, que se pretende utilizar para aquisição das amostras. Assim, se um citômetro tem três PMTs para fluorescência, sabemos que poderemos escolher uma combinação de três monoclonais diferentes, cada um com um fluorocromo específico. Além disso, deve-se conhecer qual comprimento de onda de cada fluorocromo para se escolher um filtro adequado para ser colocado a frente de cada PMT, permitindo a detecção da cor emitida.

Alguns fluorocromos e seus respectivos comprimentos de onda de excitação, pico máximo de emissão, e cor correspondente, estão na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1. Fluorocromos e seus respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão, e cor correspondente à emissão**

Fluorocromo	Laser de excitação (nm)	Máxima emissão (nm)	cor
FITC	488nm	525nm	
Alexa 488	488nm	519nm	
PE	488nm	578nm	
PercP	488nm	675nm	
Pe-texas red	488nm	615nm	
Pe-Cy5	488nm	667nm	
Pe-Cy7	488nm	785nm	Infra vermelho
APC	633nm	661nm	
APC-Cy7	633nm	785nm	Infra vermelho
APC-Alexa750	633nm	779nm	Infra vermelho
7AA-D	488nm	655nm	
Iodeto de Propídeo	488nm	617nm	

**IMPORTANTE:** Quanto mais lasers e PMTs um citômetro tiver, maior variedade de fluorocromos poderá ser utilizada em uma mesma amostra.

Conhecendo as propriedades de excitação e de emissão de cada fluorocromo é possível escolher combinações de anticorpos monoclonais a serem usadas em conjunto, de forma que diferentes moléculas de interesse podem ser avaliadas em uma mesma célula. Por exemplo: antiCD4-FITC, antiCD8-PE, antiCD3-PercP em um citômetro que tenha PMTs capazes de captar comprimentos de onda de 525 nm, 578 nm, 667 nm, respectivamente.

**IMPORTANTE:** No caso da marcação ser feita com mais de um anticorpo monoclonal, deve-se tomar cuidado para não escolher fluorocromos cujos comprimentos de onda se sobreponham.

### 3.4. Princípios básicos (Figura 3.2)

Após a preparação da amostra<sup>1</sup>, o tubo contendo a suspensão de células é acoplado ao citômetro de fluxo e as células são aos poucos, aspiradas por um sistema de pressão e levadas à uma câmara especial (*flow cell*)<sup>2</sup>. Além de receber a suspensão de células, esta câmara é banhada por uma solução salina<sup>3</sup>, responsável por um fluxo contínuo<sup>4</sup> o qual, junto

com o desenho cônico da câmara, força a acomodação das células uma atrás da outra<sup>5</sup> de forma que ao deixarem esta câmara por um pequeno orifício (50 - 200 $\mu$ m de diâmetro) sejam individualmente interceptadas<sup>6</sup> por uma radiação laser. Este encontro resulta na refração da luz do laser e na emissão de fluorescência(s) de acordo com o(s) fluorocromo(s) presentes na célula que é interceptada pelo laser (Figura 3.2).

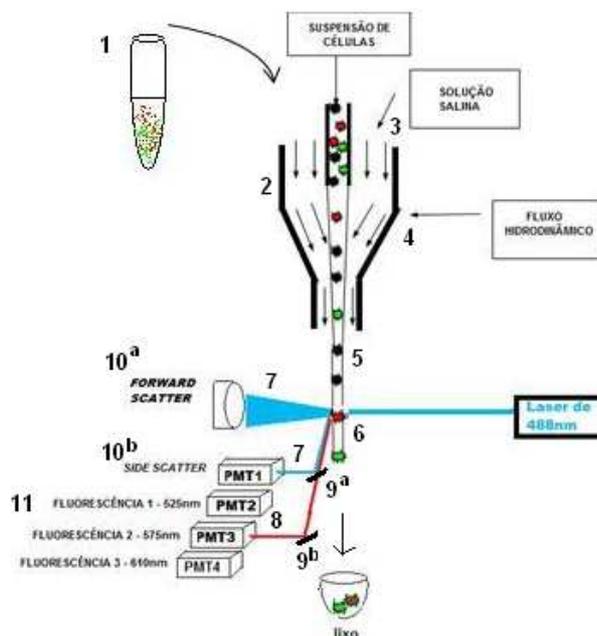


Figura3.2. Princípios básicos. Esquema do caminho da célula com fluorocromo acoplado até a fluorescência ser detectada por PMT específico. O caminho está numerado de 1 à 11.

### 3.4.1. Sistema ótico

Para que as informações de emissão de luz, que neste caso representam propriedades da célula, sejam determinadas, é preciso que esta luz atinja um determinado PMT. Para isto, é necessário que a luz emitida pelo fluorocromo e a luz do laser refratada pela célula passem por filtros com propriedades específicas, de permitir a passagens de determinados comprimentos de onda e refletir outros, e direcionando, assim, a luz para os PMTs.

### 3.4.2. Tipos de filtro

- Filtros Dicroicos: capazes de refletir um determinado comprimento de onda e deixar que outros comprimentos passem, ou seja, atravessem o filtro. Podem ser do tipo *long pass* (reflete um comprimento de onda e deixa passar comprimentos de onda maiores)

e *short pass* (reflete um comprimento de onda e deixa passar comprimentos de onda menores).

- Filtros de Interferência: deixam passar um comprimento de onda específico e evitam que um comprimento de onda diferente daquele que se deseja detectar interfira. São chamados de *band pass*.
- Filtros de bloqueio: têm um poder maior de reflexão, não deixando passar nenhum comprimento de onda acima daquele que ele reflete. São chamados de *block*.

Além de excitar os fluorocromos, a luz do laser argônio, ao interceptar a célula, é refratada e dispersada permitindo que propriedades físicas da célula, como tamanho e granularidade sejam avaliadas. A luz dispersada na mesma direção do laser (*forward scatter*) permite analisar o tamanho celular <sup>10a</sup>. Quanto maior for a partícula, maior será o ângulo de incidência da luz do laser, dispersada pela partícula, que atinge o fotossensor <sup>7a</sup> (Figura 3.2 e Figura 3.3).

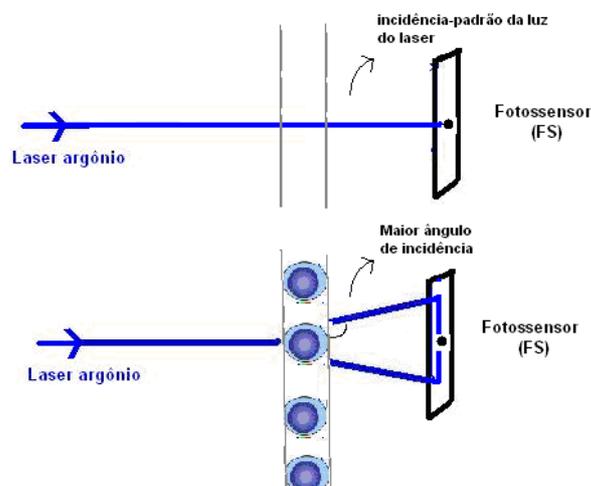


Figura 3.3. Avaliação dos parâmetros tamanho e granularidade de acordo com a incidência da luz do laser sobre a célula. Luz do laser atravessando o fluxo de solução salina no intervalo entre uma amostra e outra, e incidência-padrão no fotossensor de tamanho (FS); e luz do laser sendo refratada pela célula, de acordo com seu tamanho, formando ângulo de refração – maior incidência de luz detectada.

Simultaneamente, a luz do laser refratada devido à granularidade celular, assim como a luz emitida pelos fluorocromos, são captadas e enviadas por lentes que as direcionam lateralmente para os PMTs, de acordo com a configuração ótica (filtros) do citômetro (Figura 3.3.).

Assim, um filtro dicróico *long pass* 488nm, deixa passar todos os comprimentos de onda acima de 488nm e reflete a luz do laser argônio refratada pela célula, direcionada então para um filtro de interferência (*band pass*) que a deixa passar comprimento de onda de

488nm. Finalmente chegando ao PMT<sup>10b</sup>, a luz detectada determina o que chamamos de *side scatter*<sup>10b</sup> ou granularidade celular. Ao mesmo tempo, as fluorescências que passam pelo filtro dicróico *long pass* 488nm<sup>9a</sup> são refletidas por um outro filtro dicróico *long pass*<sup>9b</sup> de determinado comprimento de onda, e então chegam ao PMT<sup>11</sup> após passar por um filtro de interferência (*band pass*) específico para cada fluorescência (Figura 3.2 e Figura 3.4).

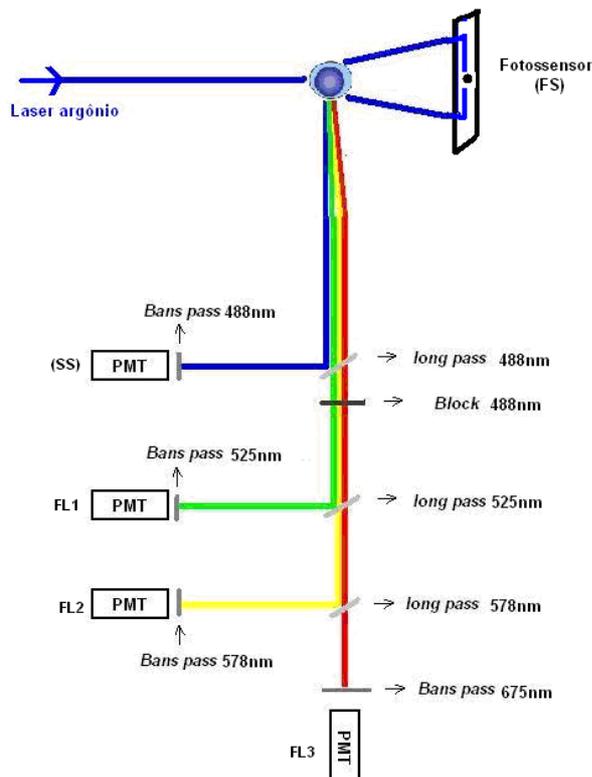


Figura 3.4. Esquema básico da disposição dos filtros dicróicos - *Long pass*; de interferência (*band pass*) e do filtro de bloqueio (*block*) - e do caminho das cores até o PMT.

### 3.4.3. Sistema eletrônico

Os fótons captados pelos PMTs são convertidos em pulsos elétricos, enviados para o computador e utilizados para representar a intensidade de fluorescência detectada em cada PMT, na forma analógica ou digital.

### 3.4.4. Software

Em fração de segundos, milhares de células passam uma a uma pelo laser e toda a informação quanto a intensidade de fluorescência é detectada e convertida. A avaliação das informações de tamanho e de granularidade, fenotípicas e ou funcionais, simultaneamente à aquisição é realizada através de um software específico.

Antes de começar a aquisição de amostras, deve-se conectar o citômetro a este software e nele montar um protocolo com gráficos mono e biparaméricos específicos para análise dos diferentes parâmetros de tamanho, granularidade e fluorescência(s).

Toda análise se baseia, primeiro, na identificação das populações quanto às propriedades físicas, isto é, tamanho e granularidade, selecionados (no software) para os eixos x e y (Figura 3.5)

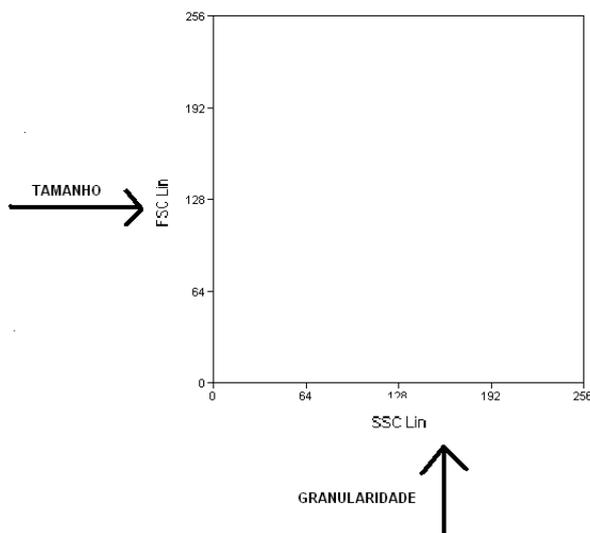


Figura 3.5. Dot plot de tamanho vs. Granularidade

A seguir, deve-se montar os gráficos para a avaliação de intensidade de fluorescência dos respectivos fluorocromo(s) referente a cada célula. Pode-se avaliar a intensidade de uma única fluorescência, através de um gráfico monoparamétrico, chamado histograma (Figura 3.6).

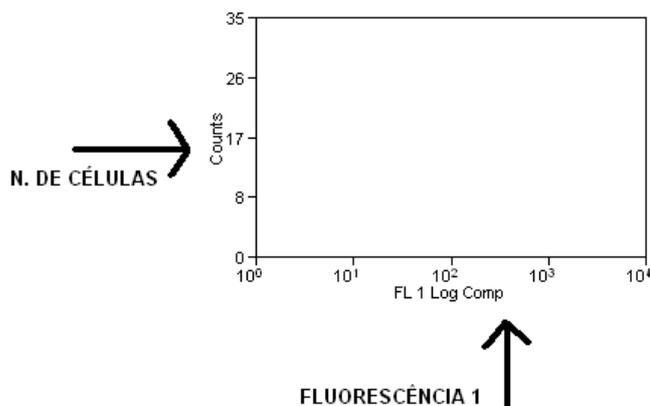


Figura 3.6. Histograma de número de células vs. intensidade de fluorescência.

**IMPORTANTE:** As células não marcadas, ou seja, que não possuem a molécula de interesse, também são interceptadas pelo laser. Sendo assim, a luz refratada (tamanho e granularidade) são captados pelos fotossensores e elas também aparecem nos gráficos de análise daquela amostra. Ao mesmo tempo, nos gráficos de análise de intensidade de fluorescência, estas células aparecem como ‘negativas’ para aquele comprimento de onda.

Quando se deseja avaliar a intensidade das fluorescências emitidas pelos fluorocromos, ou qualquer um dos parâmetros físicos, deve-se montar um gráfico biparamétrico, chamado de *dot plot*, selecionando para o eixo x e y, a fluorescência correspondente ao fotomultiplicador que a detecta (ou FSC; ou SSC), geralmente em escala logarítmica. Este gráfico deve ser dividido em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4). A intensidade de fluorescência representada no Q1 é referente as células marcadas com o fluorocromo X; o Q2 representa a intensidade de fluorescência das células marcadas tanto com o fluorocromo X quanto com o fluorocromo Y; as células negativas para ambos os fluorocromos são representadas no Q3; e finalmente, o Q4 representa a intensidade de fluorescência das células positivas para o fluorocromo Y.

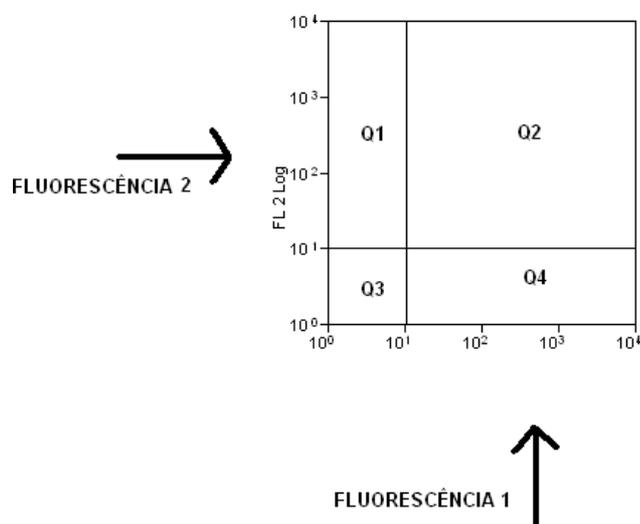


Figura 3.7: *Dot plot* de intensidade de fluorescência X vs. intensidade de fluorescência Y.

É possível montar um protocolo com a variedade desejada de histogramas e *dot plots*, de forma que, conforme cada amostra vai sendo adquirida, os gráficos vão sendo preenchidos de acordo com a intensidade de luz refratada e de fluorescência.

Os *softwares* permitem a seleção de regiões que se deseja analisar, chamadas de *gate*.

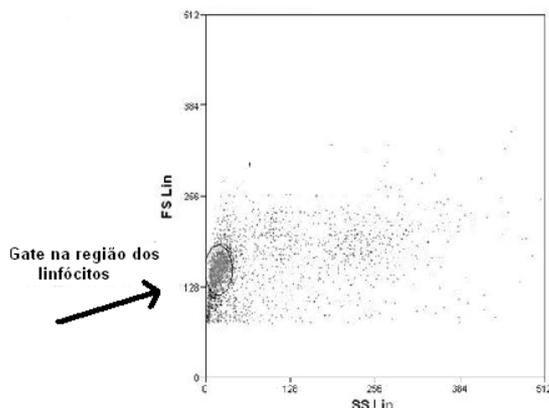


Figura 3.8: Tamanho vs. granularidade de células, e *gate* na região dos linfócitos.

A partir deste *gate*, pode-se determinar a intensidade de fluorescência somente das células situadas nesta região. Por exemplo, em uma amostra de células submetidas a um protocolo citofluorimétrico de imunofenotipagem utilizando anti-CD8-FITC e anti-CD4-PE, pode-se fazer um *gate* no *dot plot* de tamanho e granularidade, que definam a população de linfócitos de acordo com suas características morfológicas, e a partir da mesma avaliar a intensidade de fluorescência de FITC vs. PE (Figura 3.9).

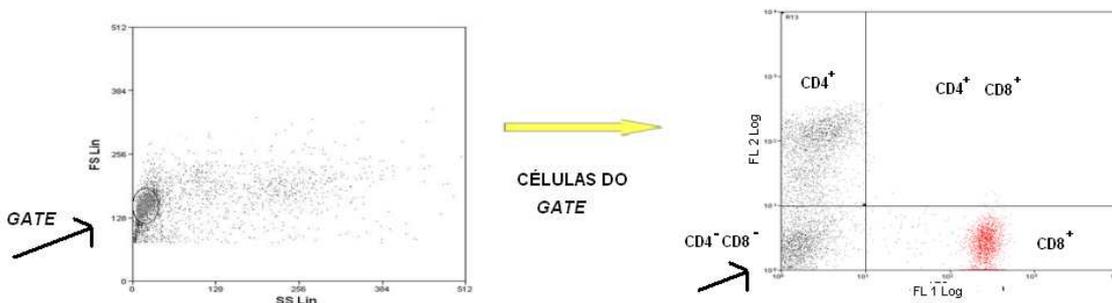
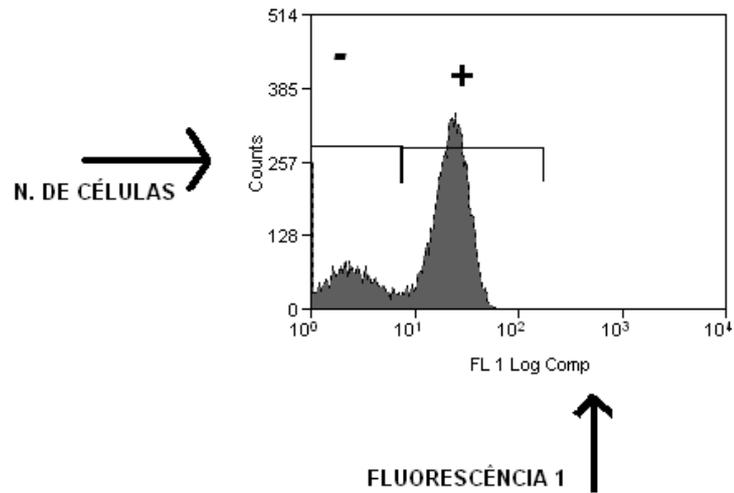


Figura 3.9. *Gate* de linfócitos, e análise dos mesmo quanto às moléculas de superfície CD4 e CD8, de acordo com a intensidade de fluorescência de PE e FITC, respectivamente.

No histograma identifica-se um pico positivo de fluorescência (a partir de 10<sup>1</sup>) e um negativo (entre 10<sup>0</sup> e 10<sup>1</sup>) (Figura 3.10).



**Figura 3.10: Interpretação do histograma. Células negativas para a FL1 representadas no 1<sup>o</sup> pico, e células positivas para FL1, representadas no 2<sup>o</sup> pico.**

Assim, é possível determinar o percentual de células em cada quadrante ou *gate*, representado em números, e desta forma os dados obtidos de diversas amostras são compilados e sua análise pode resultar em uma conclusão de importância no seu estudo científico.

## CAPÍTULO 4. APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO NA APOPTOSE

**Raquel Ferraz**

A apoptose ou morte celular programada é um fenômeno fisiológico que regula, através de um mecanismo genético, a homeostase dos tecidos, em um processo oposto ao da mitose. A regulação desta morte é um fator importante em muitos processos biológicos, tais como maturação e diferenciação celular, e renovação de populações celulares. Entretanto o desequilíbrio na homeostase levando a uma exacerbação ou inibição da apoptose está relacionada com o aparecimento, agravamento ou cura de diversas doenças infectoparasitárias como Leishmaniose, Doença de Chagas, Hanseníase, Hepatite e AIDS, além de ser um mecanismo característico no desenvolvimento de tumores.

A apoptose se caracteriza por diversos eventos bioquímicos como, ativação de caspases iniciadoras e efetoras, que culminam na fragmentação do DNA; eventos morfológicos, como a diminuição do tamanho celular e formação de corpos apoptóticos; e ainda eventos moleculares como a expressão de Fas (CD95) na membrana da célula programa para morrer por apoptose, e de fosfatidilserina, em um mecanismo capaz de sinalizar para os macrófagos que estas células devem ser fagocitadas. Além disso, outras moléculas podem ser associadas aos eventos apoptóticos como a família de proteínas Bcl-2, o gene supressor tumoral p53, a molécula solúvel FasL que se liga no receptor Fas (ligação esta capaz de acionar a via extrínseca da apoptose), e é aplicada ainda no estudo do metabolismo mitocondrial.

Por conta destas diversas moléculas que caracterizam os eventos apoptóticos, a citometria de fluxo é uma ferramenta cada vez mais utilizada no estudo de diversas doenças associadas a este processos de morte programada, acompanhando a descoberta e utilização de substâncias fluorescentes e fluorocromos acoplados a anticorpos capazes de se ligar a estas moléculas e receptores que caracterizam a apoptose.

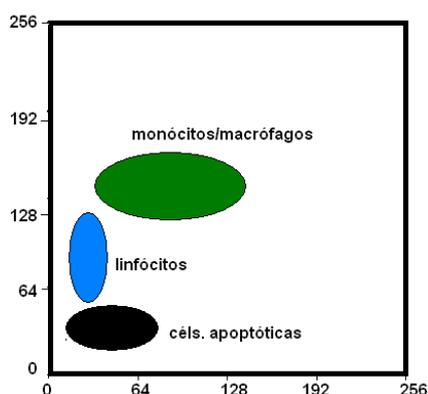
**IMPORTANTE:** A citometria de fluxo também se aplica aos estudos de necrose através da utilização de alguns protocolos que se baseiam na comparação dos dois tipos de morte celular. Sendo assim, deve-se conhecer as diferenças e as características comuns entre necrose e apoptose.

Diversas metodologias se aplicam ao estudo da apoptose, porém a citometria de fluxo vem se mostrando a técnica de escolha por oferecer vantagens como análise multiparamétrica de propriedades celulares que caracterizam a apoptose, além de possibilitar ainda a determinação das células no ciclo celular. Além disso, as informações simples quanto ao tamanho e a granularidade das células podem fornecer informações que diferenciam as células apoptóticas das demais.

Algumas das aplicações mais utilizadas para estudar apoptose, através da citometria de fluxo estão listadas a seguir:

#### 4.1. Alterações morfológicas (*Forward and Side Scatter*)

As alterações morfológicas das células em processo de morte por apoptose podem ser avaliadas por citometria de fluxo através da luz do laser refratada pela célula, isto é, sem a necessidade de submeter a amostra a protocolo citofluométrico. Sabendo que durante a apoptose a célula diminui de tamanho, como resultado do encolhimento celular, e torna-se mais granular como resultado da condensação da cromatina, um dot plot de tamanho vs. granularidade possibilita a identificação desta população (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Células em apoptose. As células apoptóticas podem ser identificadas de acordo com seu tamanho e granularidade característicos.

A maior vantagem desta análise é a simplicidade do preparo da amostra, o baixo custo, e a possibilidade de combinar a análise morfológica com a análise de marcadores de superfície para a identificação da população de células mortas.

## 4.2. Iodeto de Propídeo (PI)

O PI é uma substância com a propriedade de se intercalar em pequenas seqüências de bases nucleotídicas (entre 4 e 5) e de emitir uma cor (vermelha, de 617 nm) quando excitadas pelo laser argônio. Aplicado em protocolos citofluorimétricos inicialmente para estudo do ciclo celular em substituição ao Brometo de Etídeo (excitado por laser UV), passou a ter aplicação também nos estudos da apoptose. O PI é um dos corantes com afinidade por DNA mais utilizados e sua aplicação pode ser baseada em três protocolos diferentes:

- **Viabilidade celular:** Pela propriedade de ser impermeável à membrana plasmática íntegra, o PI é utilizado em protocolos citofluorimétricos como corante vital de forma que as células negativas para a marcação com PI estão viáveis. Nas células mortas o PI tem acesso ao DNA celular em função da perda da integridade da membrana plasmática destas células (Figura 4.2).

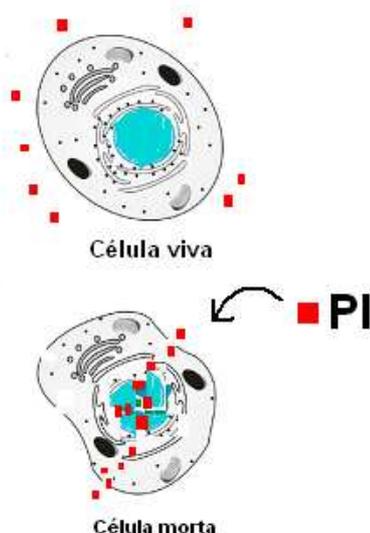


Figura 4.2. Avaliação da viabilidade celular com PI. As células viáveis apresentam-se com membrana íntegra, impermeável ao PI. As células mortas apresentam perda da integridade da membrana e marcam-se com PI, que se intercala nos ácidos nucléicos.

- **Ciclo celular:** O protocolo para identificar as células em diferentes fases do ciclo celular é baseado em uma solução que contém PI; um detergente para a permeabilização de membranas (NP-40; Triton X-100); Ribonuclease A, para degradação do RNA e para que a marcação seja específica para DNA; Citrato de Sódio; Cloreto de Sódio; em água destilada. A análise é baseada na quantificação de DNA no interior das células. Assim, células na fase G2M do ciclo têm o dobro de DNA do que as células na fase G0/G1, representadas pela intensidade de fluorescência

em escala linear. Da mesma forma, as células em apoptose são representadas por menor intensidade de fluorescência já que o DNA está fragmentado (Figura 4.3).

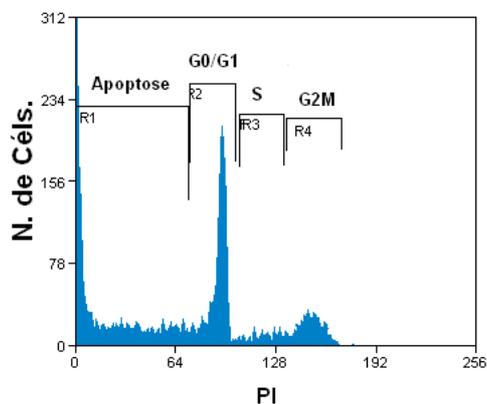


Figura 4.3. Avaliação do ciclo celular. A intensidade de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA, definindo as células em diferentes fases do ciclo celular, e células apoptóticas, com menos DNA marcado do que as células viáveis em G0/G1.

- **PI hipotônico:** Posteriormente ao protocolo aplicado para o estudo de ciclo celular e adaptado para o estudo da apoptose, foi padronizado um protocolo para a avaliação da fragmentação de DNA, caracterizando as células em apoptose. Para isso é utilizada uma solução hipotônica para ressuspender as células (PI, Citrato de Sódio e TritonX-100), em uma concentração que facilita a entrada do PI por transporte transmembranar. Com este protocolo a membrana nuclear das células não é alterada, permitindo uma avaliação fiel da fragmentação nuclear. Além disso, outra característica importante deste protocolo é a análise em escala logarítmica, já que em escala linear o pico que representa as células em apoptose fica ‘escondido’, devido à baixa intensidade de fluorescência (Figura 4.4).

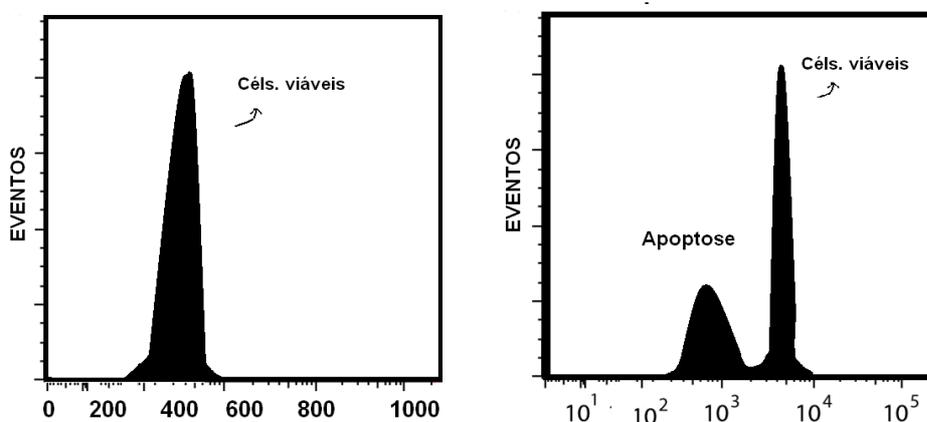
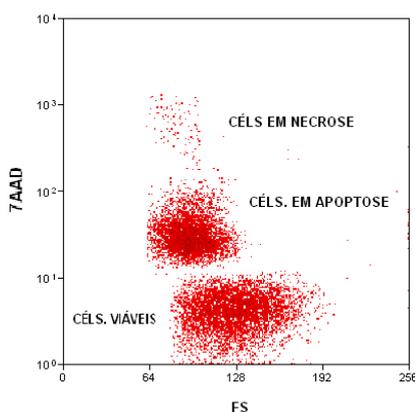


Figura 4.4. Utilização do PI hipotônico. Células (céls.) da mesma amostra, submetidas ao protocolo de PI hipotônico, analisadas em escala linear e logarítmica.

### 4.3. 7-AAD (7-amino-actinomicina D)

O 7-AAD é um corante de viabilidade celular com a propriedade de se inserir entre as bases Citosina – Guanina em fita dupla de DNA. Durante o processo de morte a membrana plasmática é progressivamente alterada, tornando-se permeável à 7AAD, que então se liga no DNA acessível no interior da célula (alteração da membrana nuclear e/ou condensação da cromatina e fragmentação do DNA).

A análise das células viáveis e não viáveis é feita através da intensidade de fluorescência, de forma que as células vivas são representadas pelo pico negativo, e o pico de intensidade de fluorescência positiva representa as células mortas. Inicialmente, a 7AAD foi utilizada para a identificação de apoptose, e posteriormente passou-se a analisar também as células em necrose, as quais são representadas por uma intensidade de fluorescência maior do que a das células em apoptose (Figura 4.5).



**Figura 4.5: Marcação de células apoptóticas com 7AAD. Intensidade de fluorescência da 7AAD e respectivas populações de células (céls.) viáveis, em apoptose e em necrose.**

Quando excitado pelo laser argônio a 7AAD emite fluorescência entre 620 e 675nm, e simultâneas marcações de superfície e intracelular com fluorocromos de outro comprimento de onda podem ser realizadas para associar características fenotípicas e funcionais ao processo de morte celular (Figura 4.6).

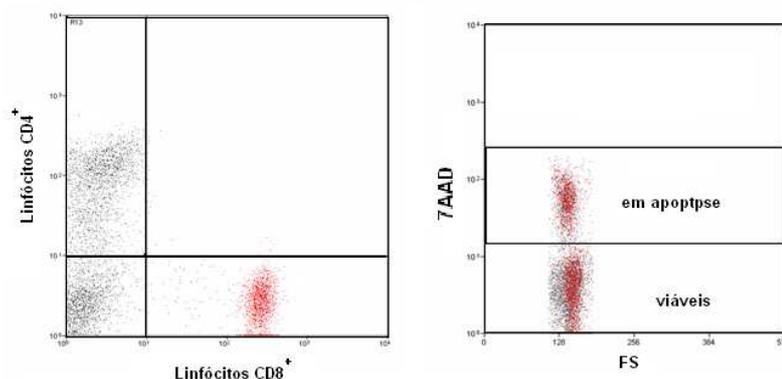


Figura 4.6: Protocolo multiparamétrico de tripla marcação (CD4-FITC, CD8-PE, 7AAD) baseado em *gate* de linfócitos.

#### 4.4. Hoechst 33342

Corante utilizado tanto na citometria de fluxo como na microscopia. Excitado por laser UV, o Hoechst 33342 tem pico máximo de emissão de 461nm emitindo uma cor azul. Este corante é utilizado como um substituto do DAPI para a marcação de ácido nucléico devido a sua maior propriedade lipofílica e conseqüente afinidade por membrana celular (e, portanto sem a necessidade de permeabilização da membrana), com aplicabilidade no estudo de replicação e divisão celular, e apoptose.

No estudo da apoptose o uso Hoechst é combinado ao PI (kit Hoechst 33342/PI) em ensaios baseados na menor intensidade de fluorescência de Hoechst nas células apoptóticas, devido à cromatina compactada, em comparação às células viáveis; e maior intensidade de fluorescência das células apoptóticas. Em relação ao PI, impermeável às células viáveis, apresenta maior intensidade de fluorescência para as células necróticas, quando comparadas às células apoptóticas (Figura 4.7).

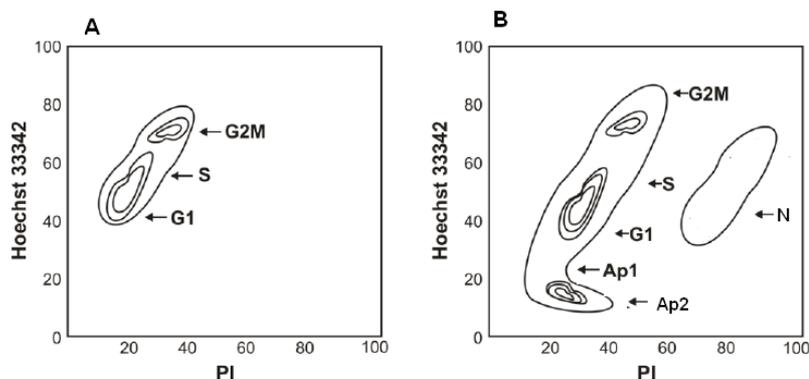


Figura 4.7: Dupla marcação Hoechst vs. PI. Células viáveis em ciclo celular representadas pela diferença de intensidade de fluorescência do Hoechst no *dotplot* A. Células viáveis positivas para o Hoechst, células em apoptose inicial e tardia positivas para PI, e células necróticas duplamente marcadas, no *dotplot* B.

#### 4.5. DAPI (Diamino-2-Fenilindol)

Corante de ácido nucléico com afinidade pela ligação Adenina-Timina em DNA dupla fita, e propriedade de emitir fluorescência azul (461nm) quando excitado por laser UV. Também é capaz de se ligar ao RNA, se intercalando na ligação Adenina-Uracila, emitindo neste caso, fluorescência com pico de emissão de 500nm (Figura 4.8 e 4.9). É também utilizado o em protocolos multiparamétricos, em função de seu pico de emissão não sobrepor o pico de emissão dos fluorocromos mais utilizados, como FITC e PE.

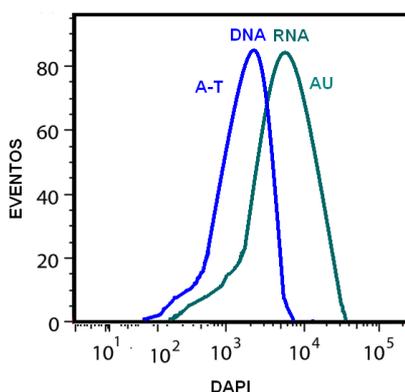


Figura 4.8: Pico de intensidade de fluorescência do corante DAPI quando ligado ao DNA e ao RNA.

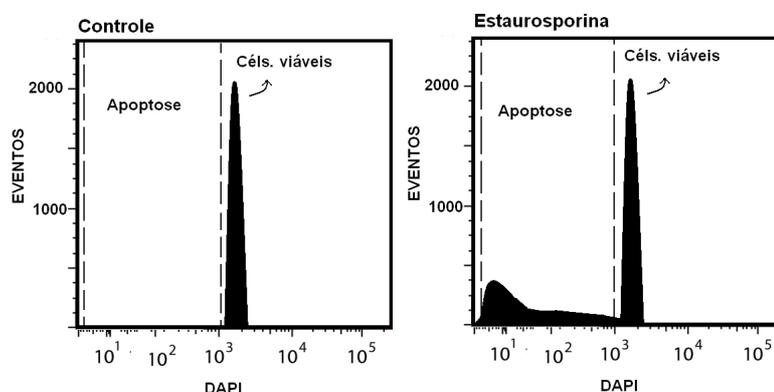
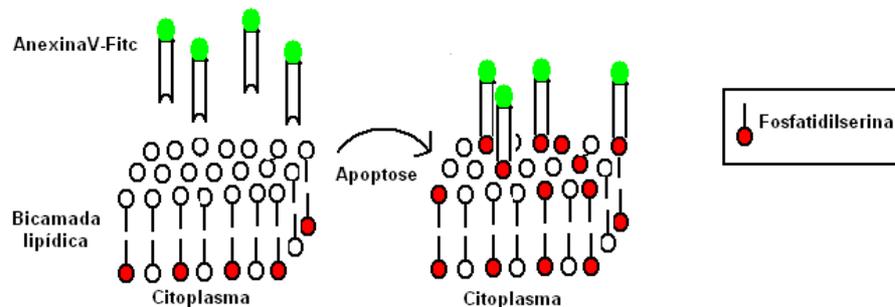


Figura 4.9: Células não estimuladas, e células com indução de apoptose. DAPI em menor intensidade de fluorescência nas células com DNA fragmentado.

#### 4.6. Annexina-V

Proteína com a propriedade biológica de se ligar à fosfatidilserina em uma ligação de alta afinidade. Este fosfolípídeo está presente na superfície interna da membrana plasmática, voltados para o citoplasma, e é translocado para a superfície externa na fase inicial da

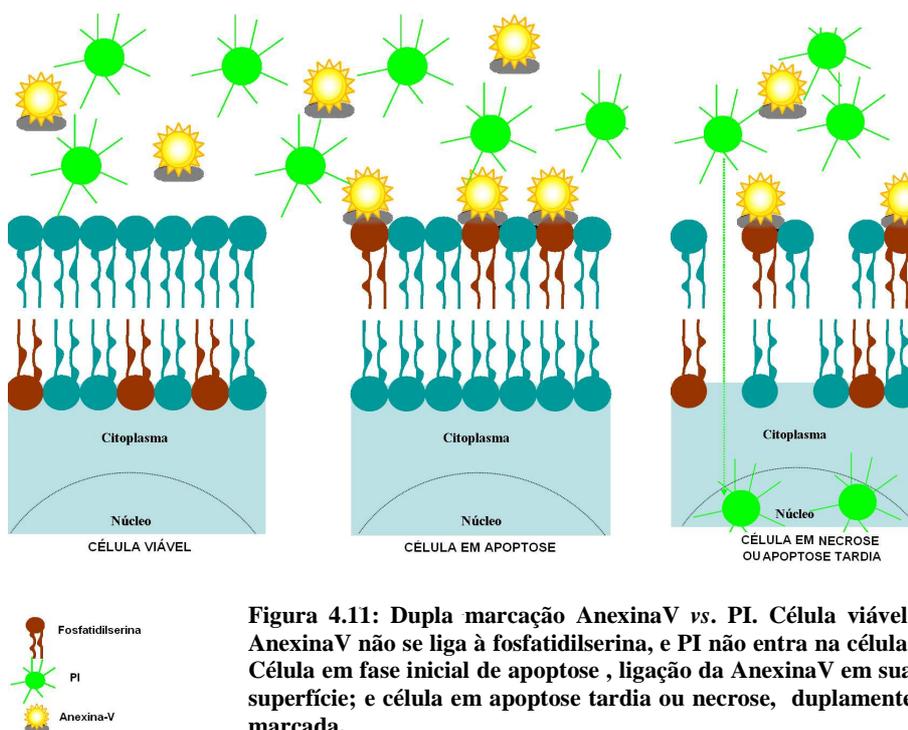
apoptose funcionando como sinalização para fagocitose desta célula por macrófagos (Figura 4.10).



**Figura 4.10.** Translocação da fosfatidilserina, da superfície interna para a superfície externa da membrana plasmática na fase inicial da apoptose, e ligação com a AnexinaV.

Esta molécula conjugada a um fluorocromo é utilizada na citometria de fluxo para identificar as células em apoptose, e por ser um marcador de superfície que pode ser conjugado a qualquer fluorocromo é frequentemente utilizada em conjunto a outros marcadores.

Uma das combinações mais utilizadas é AnexinaV e PI para diferenciar as células necróticas (positivas somente para a marcação com PI), as células em apoptose inicial (ainda com a membrana íntegra o suficiente para o PI não passar; positivas somente para AnexinaV), e as células em apoptose tardia (dupla marcação) (Figura 4.11 e 4.12).



**Figura 4.11:** Dupla marcação AnexinaV vs. PI. Célula viável, AnexinaV não se liga à fosfatidilserina, e PI não entra na célula. Célula em fase inicial de apoptose, ligação da AnexinaV em sua superfície; e célula em apoptose tardia ou necrose, duplamente marcada.

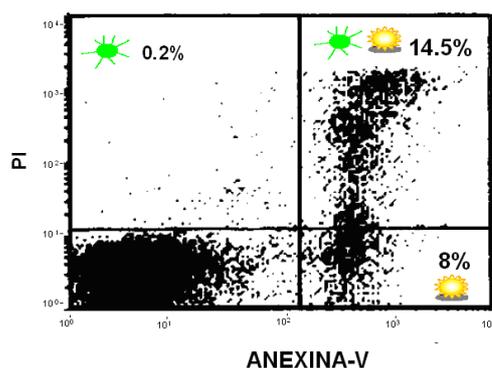


Figura 4.12: *Dotplot* PI vs. AnexinaV. Q1 células em necrose; Q2 células em apoptose tardia ou necrose; Q3 células viáveis; Q4 células em fase inicial de apoptose.

### 4.7. Rodamina 123

Excitado pelo laser argônio, com pico de emissão máxima em 528 nm, também possui a propriedade de se acumular no interior da mitocôndria metabolicamente ativa. Quando esta organela apresenta-se viável esse corante se acumula no espaço intermembranas, onde é esterificado. Quando a mitocôndria perde seu potencial de membrana a Rodamina 123 não é esterificada pelos prótons H<sup>+</sup> e nem se acumula no espaço intermembranas. Reduções na intensidade de fluorescência desta sonda, detectadas através do deslocamento dos picos no histograma, representam a perda do potencial de membrana (Figura 4.13).

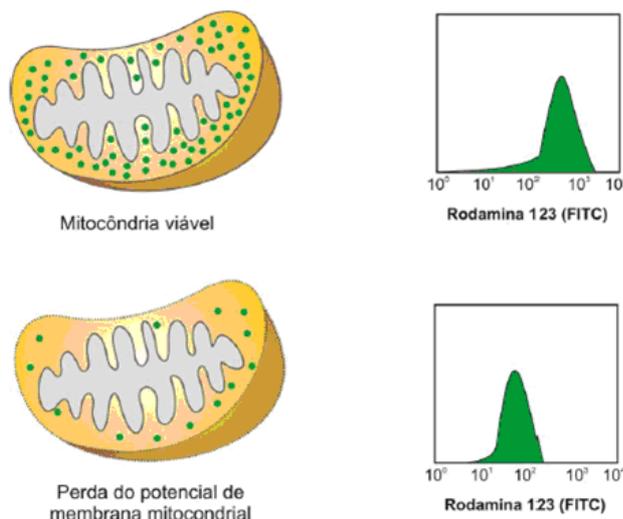
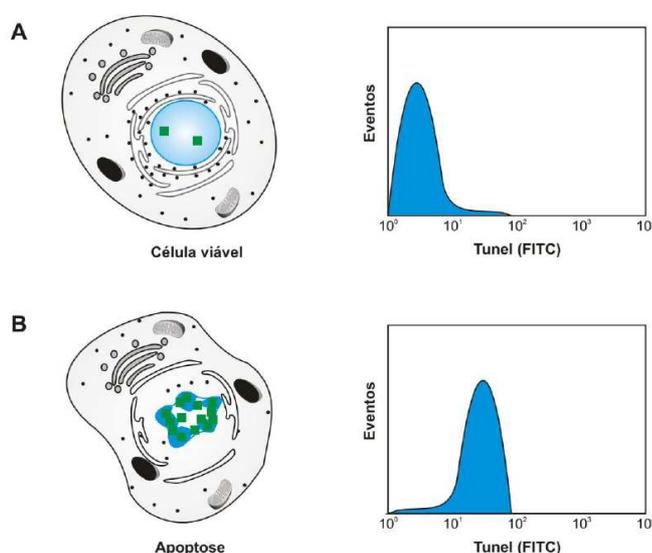


Figura 4.13: Mitocôndria de célula viável hiperpolarizada, com acúmulo de Rodamina 123 e alta intensidade de fluorescência; e mitocôndria de célula em apoptose com perda do potencial de membrana e menor ligação de Rodamina 123.

#### 4.8. TUNEL

Nos kits comerciais baseados no TUNEL utiliza-se a enzima TdT (transferase terminal deoxinucleodil) para adicionar nucleotídeos marcados (dUTP-FITC) à extremidade 3' do DNA. A aplicabilidade no estudo da apoptose é decorrente da extremidade 3' exposta em cada fragmento de DNA durante o processo apoptótico. Sendo assim, quanto maior a intensidade de fluorescência, maior a fragmentação do DNA, e caracterização da apoptose (Figura 4.14).



**Figura 4.14:** Célula com DNA intacto e dUTP, marcado com fluorocromo, ligado às duas extremidades 3'. Célula em apoptose, e dUTP ligado à várias extremidades 3' do DNA fragmentado.

#### 4.9 DiOC<sub>6</sub>(3)

Marcador de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) com propriedade de emissão de fluorescência. Tem afinidade por membranas hiperpolarizadas, se acumulando na membrana mitocondrial de células vivas, identificadas por alta intensidade de fluorescência em análise citofluorimétrica. Durante o processo de apoptose ocorre a formação de canais e poros na membrana mitocondrial das células diminuindo a capacidade do DiOC<sub>6</sub>(3) se acumular na membrana deste organela, e assim as células apoptóticas são representadas por baixa intensidade de fluorescência.

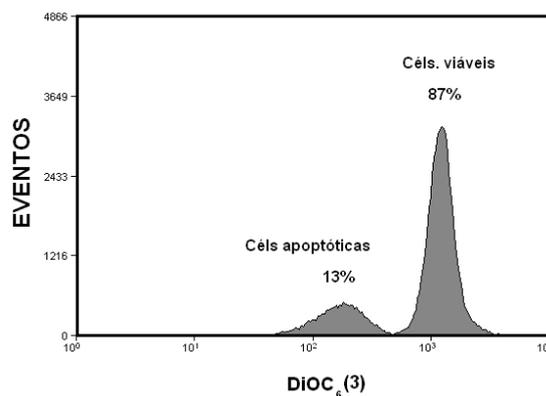


Figura 4.15: Representação da marcação com Dioc<sup>6</sup>(3): Células viáveis representadas por alta intensidade de fluorescência, e células em apoptose, em menor número, com menor intensidade de fluorescência.

#### 4.10. Anticorpo monoclonal

Além dos corantes que se ligam a moléculas específicas que permitem a identificação das células em apoptose, os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromo também podem ser utilizados para este estudo, desde que tenham afinidade por proteínas, receptores de superfície, ou qualquer molécula que caracterize a morte celular por apoptose. Alguns exemplos incluem as proteínas próapoptóticas Bax e Bid, proteína antiapoptótica Bcl-2, caspase-3, receptor Fas, e proteína p53 (Figura 4.16).

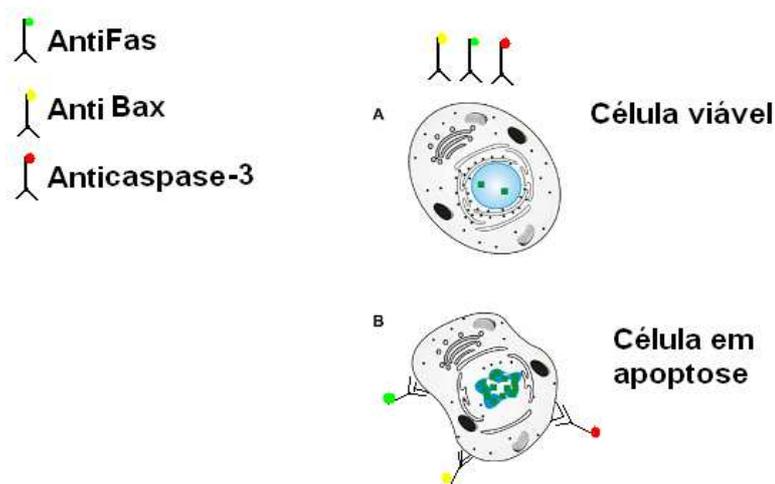


Figura 4.16: Anticorpos monoclonais antiFas, antiBax e Anticaspase-3, com afinidade por moléculas que caracterizam a apoptose, conjugados a fluorocromos. Estes anticorpos monoclonais não se ligam célula viável, e portanto identificam as células apoptóticas.

## CAPÍTULO 5. APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO NA PROTOZOOLOGIA

**Grazielle Alves Ribeiro**

A protozoologia consiste no estudo dos protozoários, que são seres unicelulares eucariontes. O protozoário é uma célula única que para sobreviver realiza todas as funções vitais, como respiração, alimentação, reprodução, locomoção e excreção. Os protozoários apresentam morfologia bastante diversificada, que varia conforme sua fase evolutiva e meio em que estão inseridos. Apresentam-se como formas esféricas, ovais ou alongadas. A locomoção, necessária para a busca por habitats adequados à sobrevivência, é realizada a partir de estruturas especializadas, como pseudópodes, cílios ou flagelos. De acordo com as organelas apresentadas para locomoção os protozoários são divididos em quatro filos principais: Mastigophora (com flagelos), Sarcodina (com pseudópodes), Sporozoa (sem estruturas especializadas) e Ciliophora (com cílios). Os protozoários podem ser de vida livre, comensais, mutualistas ou parasitos. Dentre os parasitos de maior importância médica destacam-se os gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Giardia*, *Trichomonas*, *Entamoeba*, *Toxoplasma* e *Plasmodium*.

O estudo dos protozoários pode ser realizado através de métodos de observação direta por microscopia óptica ou eletrônica, que permitem elucidar aspectos morfológicos relacionados à biologia destes organismos, e também através do estudo de aspectos bioquímicos, de biologia celular e molecular.

A citometria de fluxo permite uma rápida e quantitativa medida das características ópticas das células e possibilita a avaliação da viabilidade reprodutiva, atividade metabólica, integridade e permeabilidade de cada uma delas individualmente. Quando as células são avaliadas por citometria de fluxo, três parâmetros são medidos: tamanho, granularidade e a fluorescência emitida pelos corantes que tem interação específica com os componentes intracelulares.

A citometria de fluxo abre um leque de opções e perspectivas para o conhecimento. Entretanto, torna-se indispensável um grande conhecimento da biologia dos sistemas estudados, dos reagentes utilizados, dos métodos de marcação e dos controles experimentais.

No estudo dos protozoários, a citometria de fluxo constitui-se como uma potente ferramenta que possibilita análises multiparamétricas de milhares de células individualmente, dentro de uma população heterogênea. A técnica possibilita a avaliação qualitativa e quantitativa das células e de seus constituintes. Embora a microscopia de fluorescência

também permita o estudo da resposta de células individualmente a determinados tratamentos utilizando o mesmo repertório de corantes fluorescentes utilizados na citometria de fluxo, o estudo microscópico é bastante trabalhoso e os resultados estão sujeitos a uma grande variação devido à dimensão reduzida da amostra analisada e à subjetividade. Vantagens da citometria de fluxo sobre a microscopia de fluorescência incluem um alto grau de precisão estatística, devido ao maior número de amostras avaliadas, e eliminação da subjetividade. Diversas abordagens podem ser realizadas a partir da citometria de fluxo no estudo de protozoários e das doenças por eles provocadas.

O *Sorting* por citometria é um método pelo qual se torna possível separar células de acordo com suas características físicas, como tamanho e granularidade, sem a utilização de marcação por anticorpos monoclonais. Essa técnica possibilita a clonagem de parasitos de várias espécies como *Leishmania ssp* ou *T. cruzi*, que são utilizados com frequência em estudos biológicos e bioquímicos por diferentes laboratórios. Além disso, essa técnica permite o estudo de fenômenos imunológicos que utilizam populações de células purificadas a partir de amostras heterogêneas.

A citometria de fluxo pode ser aplicada para discriminar morfológicamente formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas envolvidas no ciclo da doença de Chagas. Permite também o estudo de aspectos de diferenciação que ocorrem durante a transformação de um estágio evolutivo em outro através da avaliação dos padrões de superfície de cada forma do parasito. Alguns estudos também utilizam a citometria para a diferenciação de promastigotas de *Leishmania* e caracterização de anticorpos espécie-específicos.

Em laboratórios clínicos, a viabilidade de *Trichomonas vaginalis* é determinada pelo uso da microscopia de luz (contagem diferencial de organismos móveis e imóveis). Marcadores fluorescentes de viabilidade, como iodeto de propídeo possibilitam que estes ensaios sejam realizados por citometria de fluxo. Esse protocolo fornece a discriminação entre a população viável e inviável e permite uma contagem estatística mais confiável do que aquela obtida por microscopia óptica, uma vez que remove a subjetividade e aumenta a precisão do ensaio.

Protocolos de citometria de fluxo também podem ser utilizados para detecção de cistos de *Giardia lamblia* na água e nas fezes. Os métodos tradicionais envolvem procedimentos para concentração dos cistos e posterior visualização por microscopia convencional, sendo bastante demorados. Protocolos baseados em citometria de fluxo são mais eficientes e rápidos. A marcação das amostras com anticorpo monoclonal específico para o parasito e com Iodeto de Propídeo (marcador de morte celular) possibilita não só a detecção

do parasito nas amostras como também a detecção da viabilidade das amostras (Figura 5.1). A avaliação da viabilidade é um parâmetro importante para se avaliar os riscos de infecção e para a monitoração do tratamento.

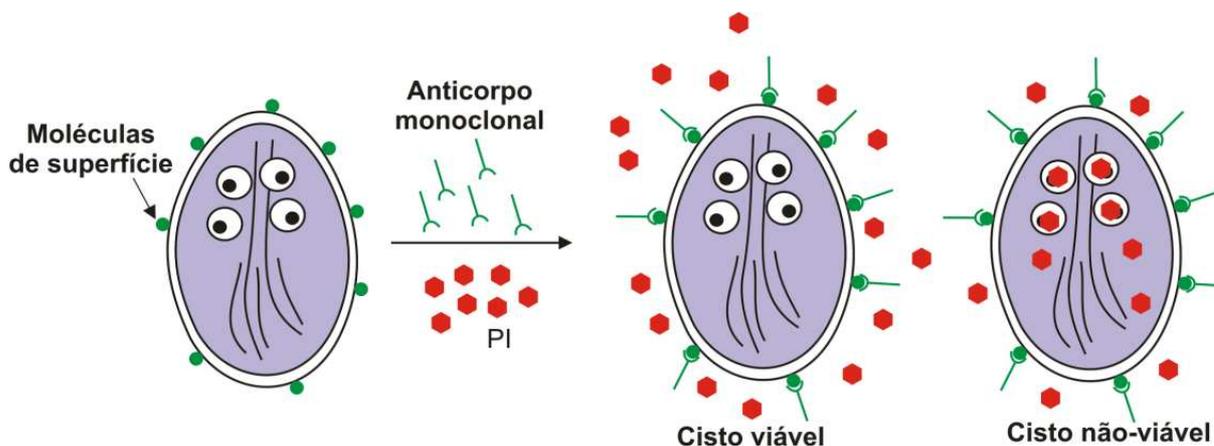


Figura 5.1. Detecção de cistos de *Giardia* e da viabilidade celular. A detecção pode ser realizada a partir de uma marcação com anticorpos monoclonais para moléculas de superfície desse parasito e a avaliação simultânea da viabilidade dos mesmos pode ser realizada com o marcador de morte celular Iodeto de Propídeo (PI).

Em estudos relacionados à detecção da Doença de Chagas, a citometria de fluxo pode ser utilizada como instrumento de análise qualitativa e quantitativa da presença de anticorpos líticos, dirigidos a epítomos expressos apenas em tripomastigotas vivos (Figura 5.2).

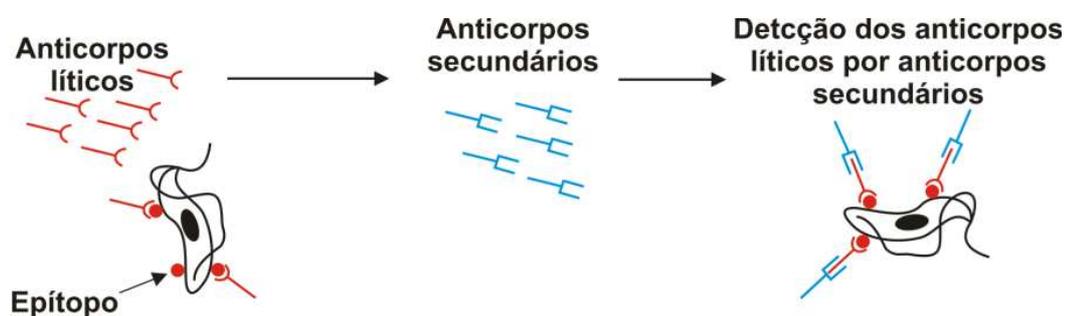


Figura 5.2. Diagnóstico da Doença de Chagas. O diagnóstico pode ser realizado através da detecção de anticorpos específicos para as formas tripomastigotas vivas do parasito.

A citometria de fluxo pode ser utilizada no estudo da interação patógeno-célula hospedeira. Essa ferramenta possibilita detectar, por exemplo, a interação entre macrófagos e *Leishmania amazonensis* de acordo com as características físicas da célula hospedeira. A detecção da internalização dos parasitos pela célula hospedeira baseia-se no aumento da granularidade dos macrófagos. Esse aumento da granularidade indica a presença de parasitos no interior de vacúolos parasitóforos dos macrófagos (Figura 5.3).

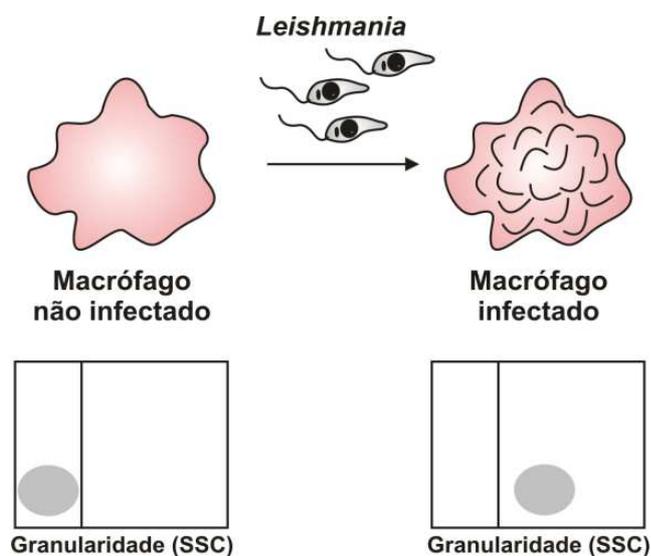


Figura 5.3. Detecção da interação entre macrófagos e *L. amazonensis* por citometria de fluxo. Os macrófagos infectados apresentam maior granularidade do que aqueles não infectados.

A citometria de fluxo também possibilita a quantificação da taxa de infecção de macrófagos por amastigotas de *Leishmania*. A partir da fixação e permeabilização da célula hospedeira, torna-se possível a marcação das amastigotas com anticorpos monoclonais, como por exemplo, o anticorpo monoclonal específico para lipofosfoglicano do parasita intracelular (Figura 5.4). Por citometria a quantificação da taxa de infecção torna-se mais eficiente e rápida em relação aos métodos de contagem convencionais, permitindo que esse tipo de protocolo seja utilizado na avaliação antileishmanial de diferentes amostras.

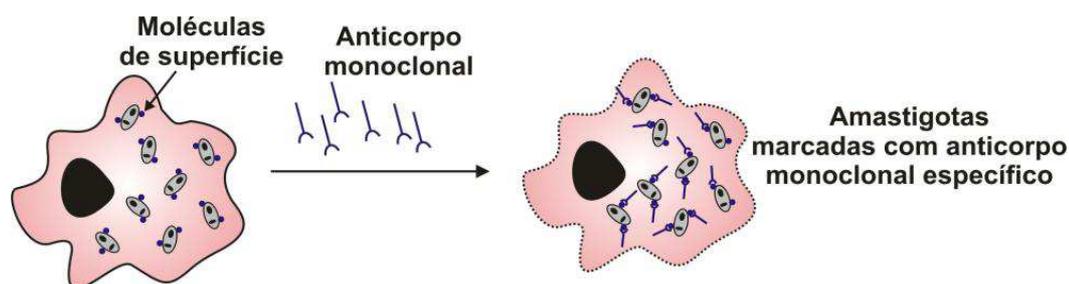
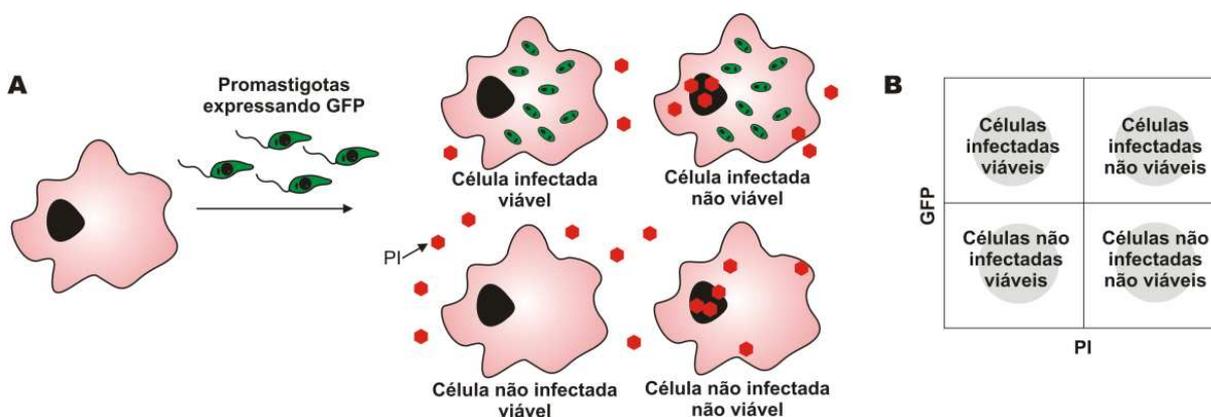


Figura 5.4. Quantificação da taxa de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Marcação de amastigotas, com anticorpo monoclonal específico, no interior de macrófagos infectados após permeabilização.

Protocolos baseados em citometria permitem a avaliação simultânea dos efeitos antiparasitários e citotóxicos de diferentes compostos. Utilizando-se parasitos *Leishmania* transgênicos expressando proteínas repórteres, tais como a proteína verde fluorescente (GFP) é possível avaliar não só a morte do parasito em resposta a determinado estímulo no interior da célula hospedeira, como também a viabilidade desta célula hospedeira. A marcação com o corante vermelho fluorescente PI, permite a avaliação da viabilidade da célula hospedeira, enquanto que a fluorescência verde (GFP) emitida pelos parasitos no interior da célula fornece a indicação da carga parasitaria. A redução da intensidade de fluorescência verde indica uma redução na carga parasitaria dos macrófagos, já que estes terão uma quantidade menor de parasitos e conseqüentemente uma menor emissão de fluorescência pela GFP. Neste protocolo, a permeabilização da célula hospedeira para se acessar as amastigotas não é necessária, como descrito no parágrafo anterior e, portanto, a viabilidade dessas células também pode ser avaliada. Esse método, portanto, permite avaliar simultaneamente os efeitos antileishmanial e citotóxico de diversos compostos (Figura 5.5.).



**Figura 5.5.** Avaliação simultânea do efeito antileishmanial e citotóxico de diversos compostos. (A) Esquema mostrando a análise simultânea da presença do parasito marcado com GFP no interior da célula hospedeira e da viabilidade dessa célula, uma vez que a permeabilização neste caso não é necessária já que os parasitos já são geneticamente marcados. (B) Histograma representativo.

Quando comparado com os métodos de contagem de parasitas em preparações microscópicas, a avaliação do efeito de compostos antileishmaniais através de citometria de fluxo apresenta maior objetividade e permite uma significativa redução do tempo gasto na análise, visto que milhares de células são avaliadas a cada segundo.

A citometria de fluxo também é utilizada para avaliar a proliferação celular em *Leishmania*. O corante intracitoplasmático 5-6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE) pode ser utilizado para se avaliar a divisão celular. O CFSE permite a identificação da descendência celular e a análise da história da divisão de células individuais.

O CFSE se liga as células parasitárias e a cada divisão a fluorescência das células cai pela metade, o que faz deste corante uma ferramenta ideal para monitorar a proliferação celular. Cada célula filha herda aproximadamente a metade da marcação de CFSE, permitindo assim o acompanhamento e quantificação das divisões celulares.

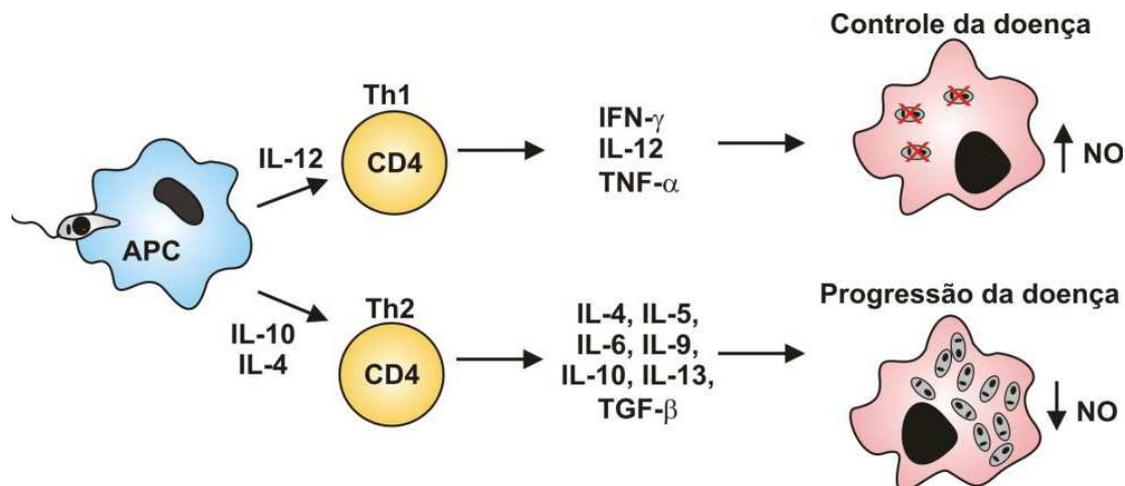
Na tentativa de entender melhor as diferentes patogenias causadas por parasitas, vários estudos envolvendo a interação do parasita com a célula hospedeira têm sido desenvolvidos com o uso da citometria de fluxo. A interação entre essas células é dependente da interação de vários ligantes na superfície do parasito com receptores na superfície da célula hospedeira.

A interação de promastigotas de *Leishmania* com as células do hospedeiro baseia-se no reconhecimento de ligantes do parasito por receptores dos fagócitos. Essas interações incluem a ligação de moléculas de superfície do parasito (lipofosfoglicanos e gp63) ou de opsoninas derivadas do hospedeiro (complemento, fibronectina e imunoglobulinas) aos múltiplos receptores dos macrófagos. Nesse sentido, a citometria de fluxo torna-se uma ferramenta útil para avaliação destes ligantes e receptores, responsáveis pelo estabelecimento da infecção pelos parasitos. A citometria pode ser utilizada como instrumento de estudo da expressão e da modulação de receptores e ligantes de superfície, a partir da marcação com diferentes anticorpos.

Além disso, pode ser utilizada também para investigar diversos parâmetros associados à ativação ou anergia do sistema imune, com a identificação simultânea das subpopulações celulares envolvidas. A distinção de subpopulações celulares envolvidas com a patogenia, principalmente linfócitos, é realizada a partir da marcação de moléculas de superfície. A análise da expressão dessas moléculas de superfície permite identificar e avaliar a representatividade de um determinado tipo celular em uma determinada infecção. O perfil das moléculas expressas nessas células varia de acordo com o parasito envolvido, desencadeando diferentes patogenias.

A avaliação dos mecanismos imunológicos associados à leishmaniose é extremamente importante, uma vez que a resposta imune celular está diretamente relacionada à patologia da doença. A infecção por *Leishmania* desencadeia uma resposta imune bastante complexa, que se inicia com a resposta imune inata, na qual receptores presentes na superfície de macrófagos, células dendríticas e NK reconhecem moléculas presentes na superfície dos parasitas, tais como lipofosfoglicanos. Após o reconhecimento dos parasitos, essas células induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF-alfa, IFN- $\gamma$  e IL-12, bem como moléculas coestimulatórias. Nesta doença os macrófagos exercem um triplo papel, sendo células hospedeiras, células efectoras e células apresentadoras de antígenos (APC) que

ativam células T específicas. Em modelos experimentais tem sido demonstrado que a resposta Th1 leva à cura da doença, enquanto a resposta Th2 leva à progressão da doença (Figura 5.6). A partir dos ensaios com citometria de fluxo é possível detectar o perfil da infecção, relacionado à predominância de células do tipo Th1 ou Th2. Através de marcadores específicos é possível realizar uma investigação detalhada das características imunofenotípicas das células envolvidas na imunidade inata (macrófagos e monócitos) e adaptativa (subpopulações linfocitárias) no decorrer da infecção.



**Figura 5.6. Resposta imune direcionada à *Leishmania*.** Em modelos animais, a suscetibilidade ou resistência à doença depende do tipo de citocinas secretadas e do perfil de células T ativado. Enquanto a resposta Th1 induz a destruição do parasito, a resposta Th2 possibilita a sobrevivência do parasito e a progressão da doença.

O estado de ativação de macrófagos infectados ou não com algum parasito também pode ser avaliado por citometria de fluxo utilizando-se a marcação de superfície para moléculas relacionadas à ativação celular ou marcadores intracelulares que identificam, por exemplo, o óxido nítrico.

A replicação dos parasitos nos macrófagos é um processo regulado por citocinas, que atuam no desenvolvimento da infecção ou na morbidade da doença. A citometria pode ser utilizada com a finalidade de identificar essas citocinas e as principais subpopulações celulares produtoras.

A citometria de fluxo também pode ser utilizada para quantificar o papel funcional de determinada organela ou a resistência biológica de um determinado parasita a drogas além de auxiliar na delimitação do mecanismo de ação de um determinado fármaco.

A citometria de fluxo oferece uma metodologia simples para realizar análise do ciclo celular, que consiste no conjunto de acontecimentos bioquímicos e morfológicos responsáveis pela proliferação celular. A citometria possibilita o acompanhamento da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo em resposta a determinados estímulos ou à ação de

drogas. Possibilita também a visualização de células com padrão anormal no conteúdo de DNA.

A citometria de fluxo é extensivamente utilizada em estudos de apoptose. As teorias e modelos sobre morte celular programada são baseados na observação de marcadores apoptóticos tais como retração celular, protuberâncias (*blebs*) na membrana plasmática, condensação da cromatina, fragmentação de DNA, formação de vesículas, externalização de fosfatidilserina, estresse oxidativo, perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), liberação de proteínas mitocondriais (citocromo c, endonuclease G, fatores indutores de apoptose) e atividade de proteases (caspases). Apesar de ser ainda uma questão em debate, o mecanismo de morte celular programada tem sido detectado em diversos parasitas unicelulares, inclusive em kinetoplastidas do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*, em resposta a vários estímulos quimioterápicos.

A avaliação dos níveis de apoptose nesses organismos por citometria de fluxo é realizada por métodos que detectam características específicas desse processo, como externalização de fosfatidilserina por anexina V-FITC, detecção de alterações no potencial de membrana mitocondrial por rodamina ou JC-1; detecção de fragmentação do DNA através da técnica de Tunel, entre outros. Iodeto de propídeo e 7-AAD possibilitam observar em células permeabilizadas a existência de populações hipodiplóides, também compatíveis com a ocorrência de apoptose. Ensaios de apoptose em promastigotas de *Leishmania* tratadas com diferentes compostos (antimoniais, camptotecina e peróxido de hidrogênio) demonstraram que durante o processo de morte celular programada ocorre a liberação de cálcio dos estoques intracelulares para o citoplasma das células. Esse íon é tóxico para o potencial de membrana mitocondrial, devido a atividade de canais de cálcio não específicos presentes na membrana dessa organela, desencadeando o processo de apoptose. A detecção do aumento desse íon no citoplasma celular pode ser feita por citometria de fluxo utilizando-se o corante fluorescente Indo-1.

Nesse capítulo, objetivamos exemplificar algumas aplicações da citometria de fluxo na protozoologia. Neste contexto, uma variedade de aplicações podem ser propostas e realizadas com base na citometria de fluxo, provendo resultados interessantes e um considerável aumento no nível de conhecimento sobre as infecções parasitárias por protozoários.



As doenças infecciosas são causadas por uma variedade de microorganismos. Parasitos intracelulares obrigatórios, como algumas bactérias, fungos e protozoários, utilizam sua própria maquinaria celular para a replicação, transcrição e tradução do seu material genético. Tais parasitos também obtêm suas próprias fontes de energia metabólica. Os vírus, por sua vez, são pequenas partículas que carregam pouco mais do que a informação genética na forma de ácidos nucleicos. A replicação desses organismos depende obrigatoriamente da maquinaria celular do hospedeiro. Dessa forma, os vírus são considerados os “verdadeiros” parasitos obrigatórios. Eles apresentam um genoma pequeno composto de um único tipo de ácido nucleico – DNA ou RNA- que, em ambos os casos, pode ser formado por uma única fita ou dupla-fita. O genoma viral fica envolto por uma proteína que, dependendo do tipo de vírus, também é envolto por um envelope lipídico. Os vírus replicam-se de várias formas. Em geral, sua replicação envolve (1) dissociação das partículas virais, (2) replicação do genoma viral, (3) síntese de proteínas virais usando a maquinaria da célula infectada, (4) organização desses componentes para a formação das partículas virais e (5) sua liberação para o meio celular de forma lisogênica ou lítica.

Dentre os diversos tópicos inerentes ao estudo dos vírus e suas propriedades, incluem-se: classificação e estrutura viral; replicação viral; patogênese viral; imunologia viral; vacinas virais; terapias virais; métodos de diagnósticos; quimioterapia antiviral, etc. Durante a evolução de uma infecção viral, o reconhecimento inicia a resposta inata na qual uma série de moléculas efetoras e células estão envolvidas, no sítio da infecção, para promover a destruição do agente invasor e conter sua replicação e disseminação. Os principais mecanismos da imunidade inata contra os vírus são a inibição da infecção pelos interferons  $\alpha$  e  $\beta$  e a morte de células infectadas, mediada pela célula *NK*. Se a imunidade inata não for o suficiente para conter a infecção viral, tornam-se necessários mecanismos de defesa mais específicos. Outras células serão recrutadas, mais moléculas serão produzidas e respostas altamente específicas serão geradas - imunidade adaptativa. A imunidade adaptativa contra infecções virais é mediada por anticorpos, os quais bloqueiam a ligação do vírus e a entrada na célula hospedeira, e por células T citotóxicas, os quais eliminam a infecção destruindo as células infectadas. Alguns vírus, assim como outros parasitos, desenvolveram mecanismos para escapar dessas defesas, ficando latentes ou destruindo células que tenham um papel central na imunidade efetora. Dependendo do tipo do vírus e da magnitude das respostas efetoras geradas, as infecções virais podem apresentar um perfil agudo ou tender para a cronicidade. As infecções agudas são caracterizadas por intensa replicação viral e ativação da imunidade inata e adaptativa culminando no *clearance* viral e geração de uma memória de vida longa.

Nas infecções virais crônicas, níveis elevados de replicação viral persistem por longos períodos levando a uma estimulação contínua e conseqüente perda da capacidade funcional e elaboração de respostas efetoras pelo sistema imune.

Os estudos da patogenia das infecções virais, diagnóstico e o monitoramento de uma doença infectoparasitária envolvem uma série de fatores que incluem a caracterização e quantificação do parasito, das células, dos receptores e mediadores inflamatórios envolvidos. Para isso utilizam-se ensaios de imunofenotipagem com anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromo ou sondas fluorescentes, ambos específicos a antígenos virais encontrados na superfície, citoplasma ou núcleo de células infectadas. Com esse propósito, a citometria de fluxo torna-se uma ferramenta de extrema aplicação e importância. Para demonstrar o estudo das infecções virais por citometria, utilizamos como base um exemplo de infecção crônica (causada pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida – HIV) e um exemplo de infecção aguda (Dengue).

As interações vírus-célula do hospedeiro vêm sendo analisadas em conjunto com a citometria de fluxo por mais de 25 anos. O potencial da Citometria de Fluxo para análise multiparamétrica traz duas vantagens importantes no estudo de infecções virais:

- Detectar e quantificar células infectadas;
- Avaliar modificações fenotípicas e funcionais das células infectadas ou não infectadas.

## **6.2. Detecção e quantificação de células infectadas**

A citometria de fluxo permite caracterizar células infectadas obtidas de amostras biológicas de pacientes infectados ou de culturas celulares infectadas com vírus. Em geral, a infecção de células por vírus resulta na produção de ácidos nucléicos e/ou proteínas que se acumulam dentro da célula. Além disso, a infecção causada por vírus envelopados está associada à expressão de glicoproteínas do envelope viral na superfície de células infectadas. Esses componentes virais podem ser avaliados por citometria através de “sondas” acopladas a fluorocromos específicas a segmentos de ácido nucléico viral ou anticorpos monoclonais específicos a antígenos virais ou a marcadores celulares, com intuito de se detectar e quantificar subpopulações distintas de células infectadas.

Na infecção causada pelo HIV a desregulação observada nas células T CD4+, tanto quantitativa quanto qualitativamente, é a marca desta doença. A Infecção pelo HIV pode ser definida como um estado de ativação imune crônica tendo seu curso clínico dividido em 3 fases: Infecção primária – fase precoce (período de tempo a partir da infecção inicial pelo

vírus até o desenvolvimento da resposta de anticorpos); fase assintomática ou de latência clínica; e fase sintomática, onde surgem as doenças que definem a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Com o uso da citometria de fluxo, podemos monitorar a fase inicial da infecção permitindo detectar, por exemplo, a infecção precoce e maciça das células T CD4<sup>+</sup> e sua depleção utilizando anticorpos específicos para proteínas do nucleocapsídeo viral, por exemplo a p24, versus moléculas de superfície características das células CD4 ou outras. De fato, com auxílio da citometria de fluxo estudos demonstraram que células marcadas para p24 aumentam com a progressão da doença e decaem a um nível basal em pacientes aidséticos tratados com terapias antiretrovirais.

Ao longo da progressão da infecção pelo HIV, ocorre a perda contínua de linfócitos TCD4. Em um determinado momento, quando os níveis de células T CD4 estão muito baixos no paciente isso gera um quadro de imunodeficiência grave, com o desenvolvimento e/ou reaparecimento de diversas infecções oportunistas, ao qual pode culminar com o óbito do paciente, em ausência de tratamento. A infecção pelo Citomegalovírus Humano (HCMV) é geralmente assintomática em indivíduos imunocompetentes, entretanto, vem se apresentando como uma importante infecção oportunista em indivíduos HIV positivo. O HCMV pertence à família Herpesviridae. Na fase aguda, ocorre uma intensa replicação viral com disseminação do vírus pelo sangue, levando a um maior risco de progressão da doença clínica. A quantificação da carga viral em pacientes com infecção persistente pode promover um método para prever o desenvolvimento da doença e ajudar a diferenciar a infecção assintomática da sintomática. A identificação por citometria de populações de células infectadas no sangue periférico de pacientes que receberam transplante de medula óssea, usando anticorpos monoclonais específicos a antígenos virais de fase precoce é um método rápido para o diagnóstico imediato da doença. A caracterização da proteína da matriz do HCMV (pp65) fagocitada por neutrófilos do sangue periférico através de anticorpos monoclonais é uma alternativa bastante utilizada no monitoramento da carga viral sistêmica como um marcador substituto para o diagnóstico da doença e início do tratamento com terapias antivirais

A Dengue é conhecida atualmente como a arbovirose mais importante no mundo. Transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*, ela é uma doença causada por uma infecção aguda e que causa desde manifestações brandas até quadros graves que podem culminar no óbito. O uso da citometria é importante para complementar os estudos de diagnóstico. Neste contexto, nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes na fase aguda da doença é possível detectar antígenos virais por citometria, enquanto que na fase convalescente não.

Além disso, estudos *in vitro* vêm demonstrando que fagócitos mononucleares representam alvos importantes da replicação viral (Figura 6.2). De forma interessante, comparando-se o percentual de células infectadas entre pacientes brandos e graves, foi confirmado o papel dessas células como fontes de disseminação viral na fase inicial e conseqüente gravidade da doença. Através do uso de anticorpos monoclonais específicos a proteínas do envelope ou não estruturais do vírus é possível detectar sua presença tanto em fagócitos mononucleares como em células endoteliais e hepatócitos; e sua ausência em linfócitos.

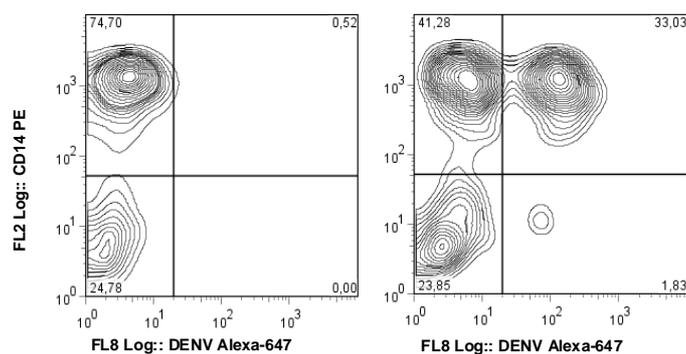


Figura 6.2: Caracterização de monócitos humanos infectados ou não com DENV-2. Monócitos obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis foram cultivados em meio apenas(A) ou vírus infeccioso (C). As células foram recuperadas e marcadas extracelularmente com Ac anti-CD14 PE e em seguida, intracelularmente com anticorpo anti-dengue conjugado com Alexa fluor 647. O percentual de células CD14+, infectadas ou não, foi estabelecido por citometria de fluxo. (Figura cortesia: Carvalho, A.T.).

Vem sendo bastante explorada em protocolos de citometria de fluxo, a avaliação da atividade antiviral de diferentes drogas *in vitro*. O monitoramento de pacientes submetidos a terapias antivirais, através da análise de amostras clínicas, permite o uma avaliação da susceptibilidade ou resistência ao tratamento.

### 6.3. Características fenotípicas – Susceptibilidade e funcionalidade

#### 6.3.1. Susceptibilidade

A infecção viral é iniciada pela interação do vírus com receptores específicos na superfície de células – alvo e co-receptores. Portanto, a identificação de células expressando receptores que interajam de alguma forma com partículas virais representou um avanço na compreensão da imunopatogenia de diversas infecções virais e do tropismo desses vírus por diferentes tecidos e órgãos.

Na infecção causada pelo HIV, o receptor é a molécula CD4 (expressa preferencialmente em linfócitos T auxiliares); e os co-receptores associados à migração, CXCR-4 (expresso preferencialmente em linfócito T auxiliares) e CCR-5 (expresso preferencialmente em macrófago). Os linfócitos T CD4 são os principais alvos de infecção e replicação viral. Portanto, o vírus HIV é capaz de subverter o sistema imune do hospedeiro por infectar os linfócitos TCD4, que normalmente orquestram as respostas imunes adaptativas. Isso gera um quadro de imunossupressão (AIDS) levando a uma deficiência na montagem de respostas imunes contra infecções oportunistas.

Durante a infecção causada pelo vírus dengue, a partícula viral liga-se a receptores específicos e/ou entra na célula por endocitose mediada por receptor. Dentre os vários candidatos sugeridos como receptores para o vírus, incluímos as moléculas DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrine – expresso preferencialmente em células dendríticas), CD14, receptores do tipo Toll e um receptor de manose (MBL). Esses marcadores são específicos de fagócitos mononucleares, principais alvos da infecção pelo vírus dengue.

### 6.3.2. Funcionalidade

Os vírus também podem modular a expressão de proteínas de superfície ou intracelulares em células infectadas ou não infectadas. Essas alterações podem ser causadas pela ativação celular em decorrência da resposta imune desencadeada contra o patógeno ou por influência direta do vírus, como um mecanismo de escape. O padrão fenotípico de diferentes subpopulações pode refletir na funcionalidade e diferenciação (*naive*, efetora, memória) dessas células e pode ser monitorado por citometria.

Tem sido observado que células T CD4<sup>+</sup> obtidas de pacientes infectados por HIV apresentam um decréscimo na expressão de moléculas envolvidas na sua ativação e nas moléculas associadas as funções de linfócitos B. A resposta citotóxica mediada pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> é crucial para supressão da replicação viral em indivíduos HIV positivos. O mecanismo de citotoxicidade se dá pelo reconhecimento específico de epítopos virais apresentados via MHC-I pelas células infectadas. Proteínas virais do HIV podem induzir a diminuição de MHC-I na superfície de células infectadas na fase aguda da doença, diminuindo portanto, a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

O Vírus da Hepatite C (HCV) causa uma doença crônica, podendo levar a uma cirrose hepática em decorrência do tropismo preferencial do vírus por hepatócitos. Um

mecanismo pelo qual o HCV escapa do sistema imune e estabelece uma infecção persistente é prejudicando as funções efetoras das células dendríticas. Estudos *in vitro* por citometria demonstram que células dendríticas infectadas tem uma diminuição na expressão de MHC-I e, portanto um defeito no desencadeamento de respostas efetoras do tipo Th1.

Nas infecções causadas por Dengue, apesar dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK não serem susceptíveis a replicação viral, trabalhos utilizando a técnica de citometria demonstram que a frequência aumentada dessas subpopulações celulares no sangue periférico dos pacientes está associada a um aumento na expressão de grânulos citotóxicos em pacientes na fase aguda da doença (Figura 6.3 e Figura 6.4). Monócitos obtidos do sangue periférico de pacientes da fase aguda com a forma branda da doença, apresentam um aumento na expressão de receptores do tipo *Toll* 2 e 4, indicando que o perfil fenotípico ativado dessas células é importante na imunopatogenia da Dengue (Figura 6.5).

**IMPORTANTE:** Uma família de receptores bastante estudada na Imunologia, caracterizada e quantificada por citometria de fluxo em muitos estudos de imunopatogenia de doenças, são os receptores do tipo *Toll*. Essas moléculas podem estar expressas na superfície celular ou compartimentalizadas em endossomas e atuam como receptores de reconhecimento padrão para uma variedade de moléculas derivadas dos microorganismos (PAMPs). A via de sinalização pelos receptores do tipo *Toll* induz a produção de diversos peptídeos antimicrobianos e citocinas que contribuem na defesa inata contra patógenos intracelulares e extracelulares.

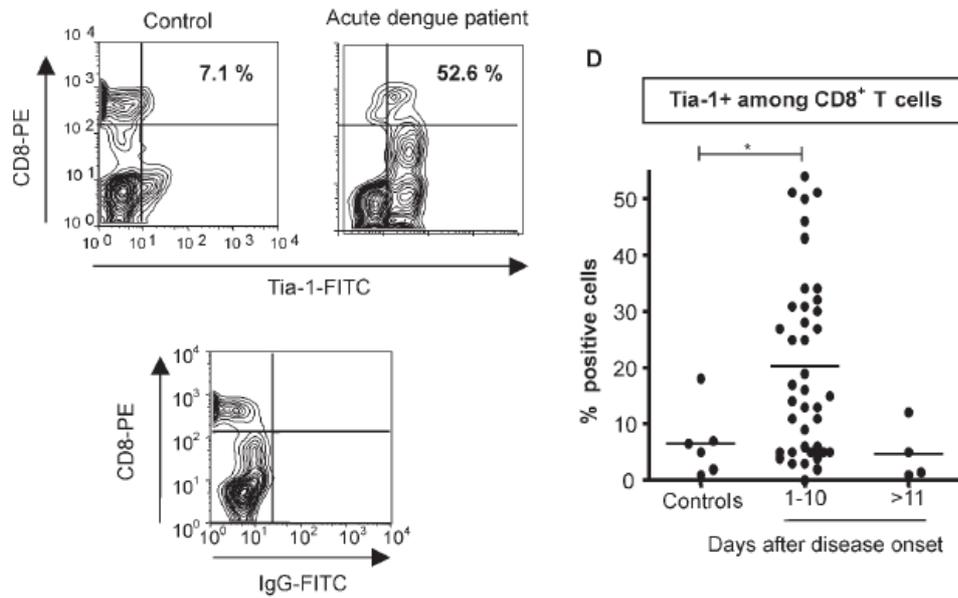


Figura 6.3: Ativação de linfócitos TCD8 durante a infecção por dengue. PBMCs do sangue periférico de indivíduos saudáveis (n:9) e de amostras de pacientes em diferentes dias da doença. As células foram marcadas extracelularmente com Ac anti-CD8 PE e em seguida, intracelularmente com anticorpo anti-Tia 1 FITC ou seu isotipo anticorpo IgG1 FITC Os números em cada quadrante dos gráficos de dot plot indicam o percentual de células Tia+ na subpopulação de linfócitos TCD8. As médias estão representando os 3 diferentes grupos de pacientes e controle. para cada paciente e controles. A significância estatística foi avaliada pelo teste Mann-Whitney U com \* representando  $P < 0,05$  (Figura cortesia: Azeredo, E. L. et al.).

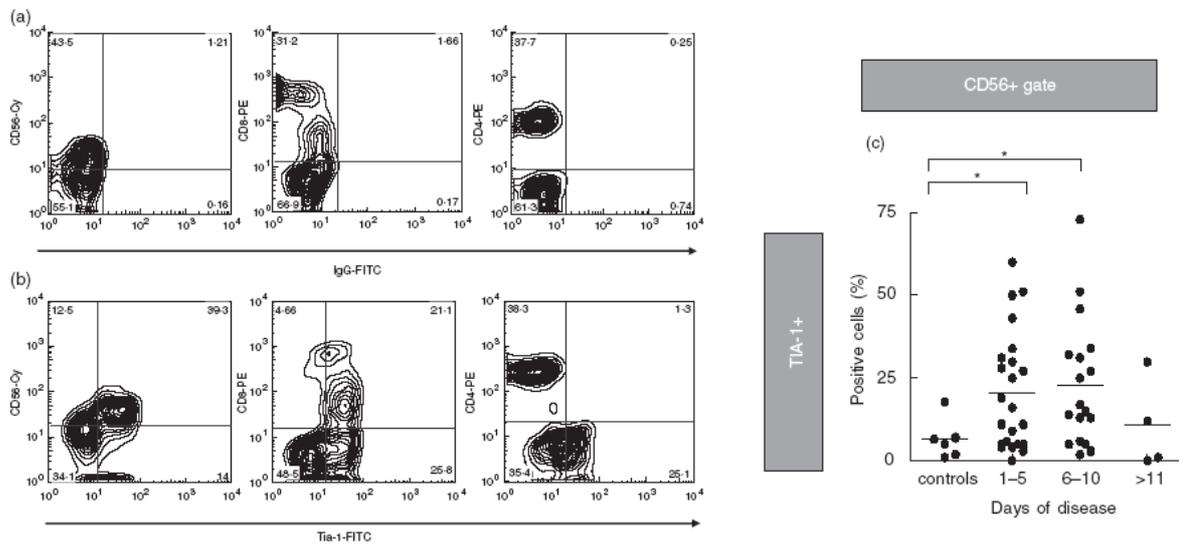
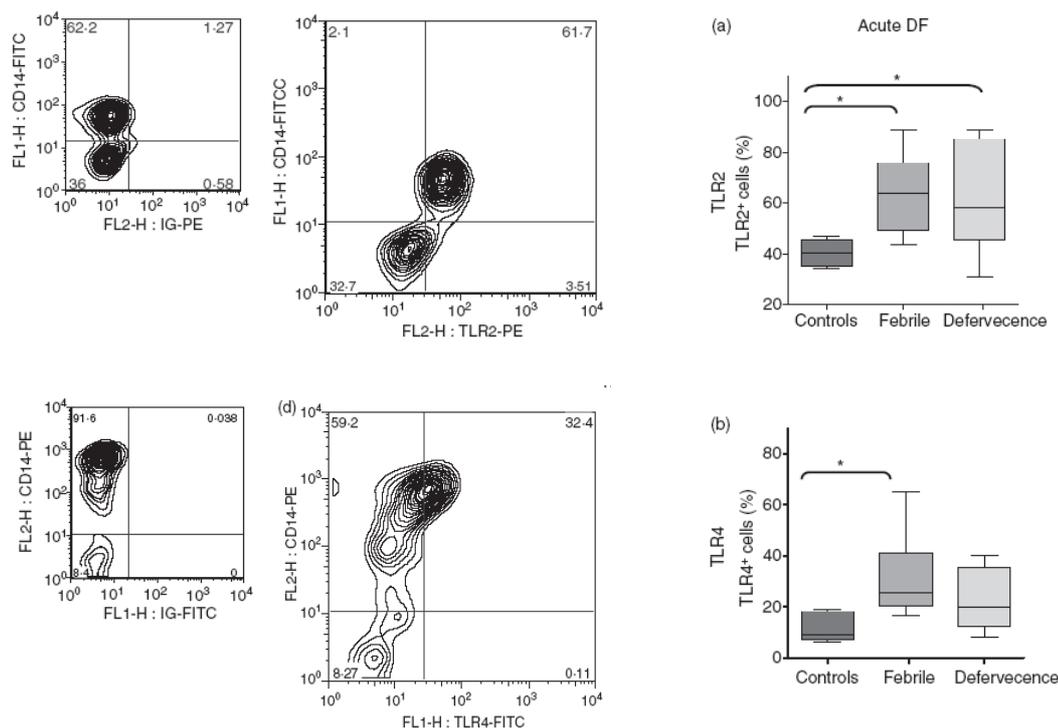


Figura 6.4: Ativação de células NK durante a infecção por dengue. PBMCs do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de amostras de pacientes em diferentes dias da doença foram analisadas por citometria de fluxo. As células foram marcadas extracelularmente com Anitocorpo anti-CD56 Cy e em seguida, intracelularmente com anticorpo anti-Tia 1 FITC ou seu isotipo anticorpo IgG1 FITC Os números em cada quadrante dos gráficos de dot plot indicam o percentual de células Tia+ em subpopulações de células NK CD56+. As médias estão representando os 3 diferentes grupos de pacientes e controle. para cada paciente e controles. A significância estatística foi avaliada pelo teste Mann-Whitney U com \* representando  $P < 0,05$ . (Figura cortesia: Azeredo, E. L. et al.).



**Figura 6.5:** Detecção de TLR-2 e TLR-4 em pacientes com Febre do Dengue: PBMCs do sangue periférico de indivíduos saudáveis (n: 6)s e de amostras de pacientes da fase febril (n: 10) e defervescência (n: 13) foram analisadas por citometria de fluxo. As células foram marcadas extracelularmente com Anticorpos anti-CD14 FITC e anti-TLR-2 PE (isotipo IgG PE) ou com Anticorpos anti-CD14PE e anti-TLR4 FITC (Isotipo IgG FITC). Os números em cada quadrante dos gráficos de *dot plot* indicam o percentual de células + duplo marcadas, marcação simples ou nenhuma marcação. A média dos percentuais de monócitos TLR-2+ e TLR-4+ estão representadas para cada paciente e controles nos gráficos A e B. A significância estatística foi avaliada pelo teste Mann-Whitney U com \* representando  $P < 0,05$ . (figura cortesia: Azeredo, E. L. *et al.*).

#### 4. Apoptose

A apoptose é um evento essencial tanto na fisiologia quanto na patogenia dos organismos. Ela compreende um processo ativo de autodestruição, geneticamente regulado e orquestrado por uma cascata complexa de eventos bioquímicos, liderando com mudanças morfológicas e finalmente morte celular por uma cadeia enzimática complexa. Uma variedade de sinais e estímulos, incluindo citocinas, agentes virais, químicos ou físicos podem desencadear este evento. O programa pode ser engatilhado ou disparado por duas vias: extrínseca (receptores de morte) e intrínseca (via mitocondrial). Independente de como ela é iniciada, a apoptose resulta na ativação das caspases que clivam proteínas celulares e promovem a destruição do material genético. Os produtos da replicação viral são freqüentemente associados a alterações nas vias de biossíntese de proteínas nas células infectadas. Algumas vezes essas mudanças são importantes ativar a apoptose.

A desregulação da apoptose durante a infecção pelo HIV é vista como um fator importante na depleção de células TCD4 e TCD8 e progressão da doença. Proteínas virais

induzem a apoptose de células TCD4 infectadas ou não, por diminuir a expressão de proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 como o Bcl-2, ou pelo aumento da expressão de receptores e ligantes da família de morte, como Fas e FasL. O aumento na expressão de Fas em células TCD4 *naive* e de memória; e a diminuição na expressão de Bcl-2 e Bcl-xL e clones de linfócitos TCD8 HIV específicos tornam essas células mais susceptíveis a apoptose. Proteínas virais induzem a diminuição da expressão de moléculas de MHC-I em células infectadas, prevenindo a apoptose mediada por citotoxicidade de linfócitos TCD8. O uso de marcação por citometria para avaliar potencial de membrana mitocondrial e exposição de fosfatidilserina demonstra que PBMCs de pacientes HIV positivos são mais susceptíveis a apoptose quando comparados aos PBMCs de pacientes que receberam terapia antiviral. Outro dado interessante é que o vírus também é capaz de inibir a atividade citotóxica de células *NK* em células dendríticas infectadas, tornando-as importantes reservatórios para a persistência viral em tecidos linfóides.

A apoptose vem sendo descrita nas infecções por Flavivírus. O papel de proteínas virais e mediadores inflamatórios produzidos durante a infecção promovem a indução da apoptose. Resíduos de aminoácidos da proteína de membrana do sorotipo 2 do vírus dengue provocam disfunção mitocondrial e ativação de caspases em linhagens de células epiteliais infectadas. Em pacientes na fase aguda da doença foi demonstrado um aumento na frequência de uma subpopulação de Linfócitos TCD8 do sangue periférico expressando baixos níveis de Bcl-2 comparado aos controles e pacientes na fase de convalescência (Figura 6.6). A infecção *in vitro* do vírus induz a expressão de fosfatidilserina e receptor Fas em monócitos infectados *in vitro* (Figura 6.7). Todos esses eventos podem contribuir na susceptibilidade a gravidade da Dengue.

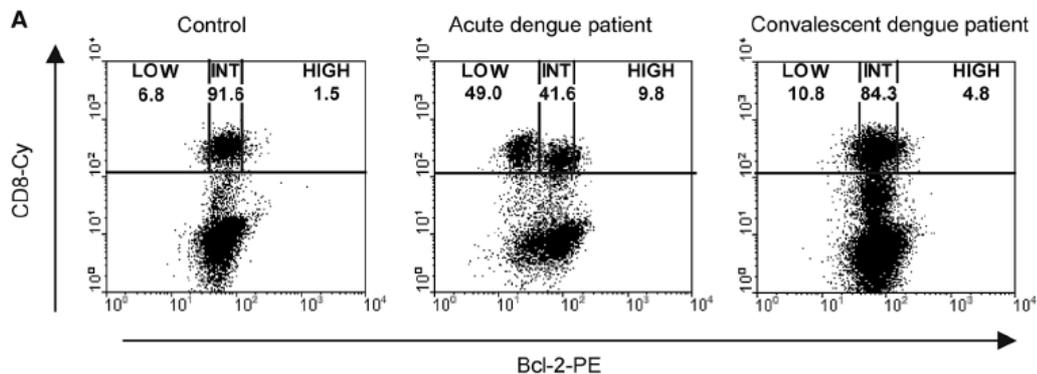


Figura 6.6. Diminuição na expressão de Bcl-2 em linfócitos TCD8<sup>+</sup> de pacientes na fase aguda da Dengue: A expressão *ex vivo* de Bcl-2 em linfócitos T CD8<sup>+</sup> obtidos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes na fase aguda e de convalescência, respectivamente. O percentual de células expressando níveis baixos, intermediários ou elevados de Bcl-2 foram determinadas por citometria através da marcação com anticorpos anti-Bcl-2 PE e anti-CD8 Cy 5.5. Os gráficos são representativos, onde: PBMCs isolados de controles (n = 8); pacientes na fase aguda (1-10 dias n = 10) e nas fases de convalescência (> 11 dias n = 9) (Figura cortesia: Azeredo, E. L. *et al.*).

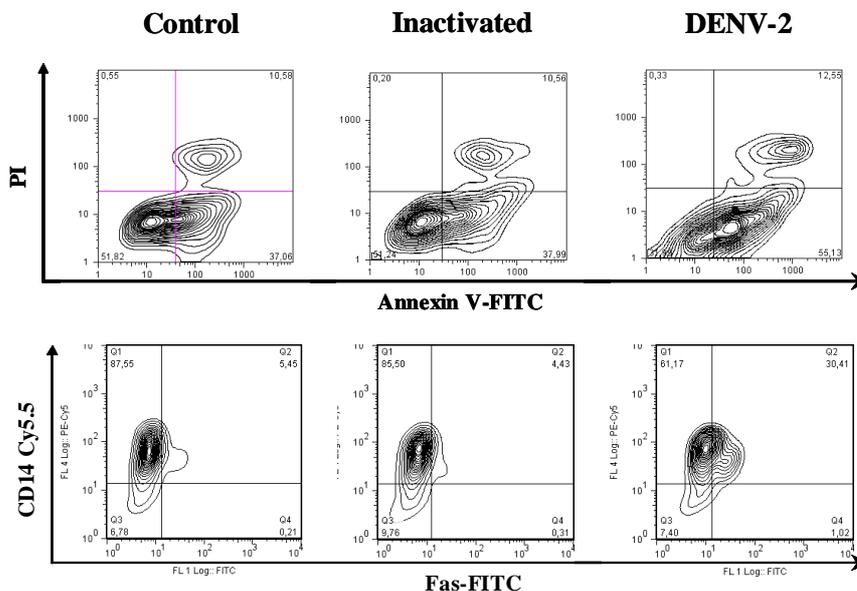


Figura 6.7. Vírus Dengue-2 aumenta apoptose de monócitos humanos infectados *in vitro*. Monócitos foram obtidos a partir de PBMCs de indivíduos saudáveis, cultivado e infectado com vírus da dengue. Dois dias após infecção as células foram recuperadas e marcadas com anexina V FITC e iodeto de propídeo para avaliação de células apoptóticas e necróticas; e anticorpos anti-CD14 Cy5.5 e anti-Fas FITC para avaliação de monócitos expressando receptor Fas. Os gráficos são representativos 6 experimentos independentes. (Figura cortesia: Carvalho, A.T.).

## CAPÍTULO 7. CONCEITOS BÁSICOS E APLICAÇÃO DE *SORTING*

Raquel Ferraz

A citometria de fluxo tem como princípio principal a aquisição e a análise de células e prover informações acerca das características físicas, químicas e biológicas destas células. Os citômetros de fluxo que possuem esta capacidade são chamados de citômetros analisadores. Além deste recurso, alguns citômetros possuem uma configuração particular e um sistema específico que permitem a separação de populações celulares puras e homogêneas, a partir de uma amostra heterogênea, de acordo com critérios de características biológicas predefinidos (Figura 7.1). Estas populações purificadas se tornam, então, disponíveis para avaliações morfológicas ou genéticas, bem como para ensaios funcionais e de terapêutica. Este processo citofluorimétrico é conhecido como *Flow Sorting* (ou *Cell Sorting*) e os citômetros de fluxo capazes de realizar este processo são chamados de *Cell Sorters*.

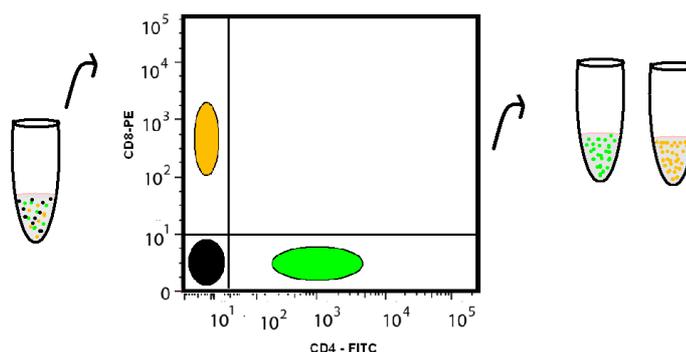


Figura 7.1: Separação de células. Análise de amostra heterogênea, submetida ao *Sorting* e separada em amostras homogêneas.

Desde as primeiras aplicações, realizadas por Leonard Herzenberg, o *Sorting* vem sendo cada vez mais aplicado, tanto na área da biologia como na área industrial, devido à capacidade única de isolar populações celulares em um processo relativamente rápido; às condições estéreis que permitem que estas populações sejam submetidas a outras metodologias; à pureza e integridade das células isoladas e, portanto, confiabilidade do processo.

No entanto, foi em estudos na imunologia que o *Sorting* teve sua utilização mais acentuada, com a realização, por exemplo, de purificações de subpopulações de linfócitos. Detalhar todas as aplicações desta tecnologia citofluorimétrica não faz parte do escopo desta apostila, deste modo listaremos, abaixo, uma seleção de técnicas para ilustrar a versatilidade do *Sorting* por citometria de fluxo, algumas das quais serão detalhadas mais adiante:

- Clonagem de uma única célula a partir de células de hibridoma para a produção de anticorpos monoclonais;
- Seleção de células progenitoras (CD34+) em busca de células-tronco pluripotentes;
- Isolamento e purificação de diferentes linhagens, incluindo células-tronco, a partir de amostras de medula óssea;
- Seleção células transfectadas com um marcador de expressão, como a Green Fluorescence Protein (GFP);
- Isolamento mutiparamétrico de células a partir de populações mistas;
- Sexagem de sêmem através do *Sorting* de espermatozóides utilizando a diferença no conteúdo de DNA entre os cromossomos portadores de X e Y;
- *Sorting* de uma única célula para ensaios in vitro a partir de um clone celular.

## 7.1 Princípios

Durante a aquisição e análise das amostras devemos definir, nos *dot plots* e/ou histogramas, regiões de interesse (*gates*) para selecionar as populações celulares que desejamos separar. O processo de *Sorting* se inicia com o estabelecimento de procedimentos junto ao software e ao equipamento visando que as células escolhidas sejam direcionadas para um recipiente que as armazenarão (tubos ou vários tipos de placas de cultivo).

Estes procedimentos incluem uma vibração da câmara de fluxo (*Flow Cell*) levando o fluxo contínuo de salina a se “quebrar” em gotas (*droplets*). Assim cada célula dentro de uma gota é interceptada pelo laser e posteriormente passa por uma placa de carregamento de elétrons, onde recebe uma carga positiva ou negativa dependendo do critério de seleção pré-estabelecido no *software* de aquisição e análise. Por exemplo, se duas subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, forem escolhidas para serem separadas, cada gota contendo uma destas células receberá uma carga positiva e outra gota contendo a outra célula receberá uma carga negativa. A seguir, as gotas são atraídas por placas defletoras com carga elétrica contrária à da gota, de forma que as gotas carregadas ao invés de seguir o fluxo de líquido contínuo, regular do equipamento, são atraídas pelas respectivas placas (Figura 7.2).

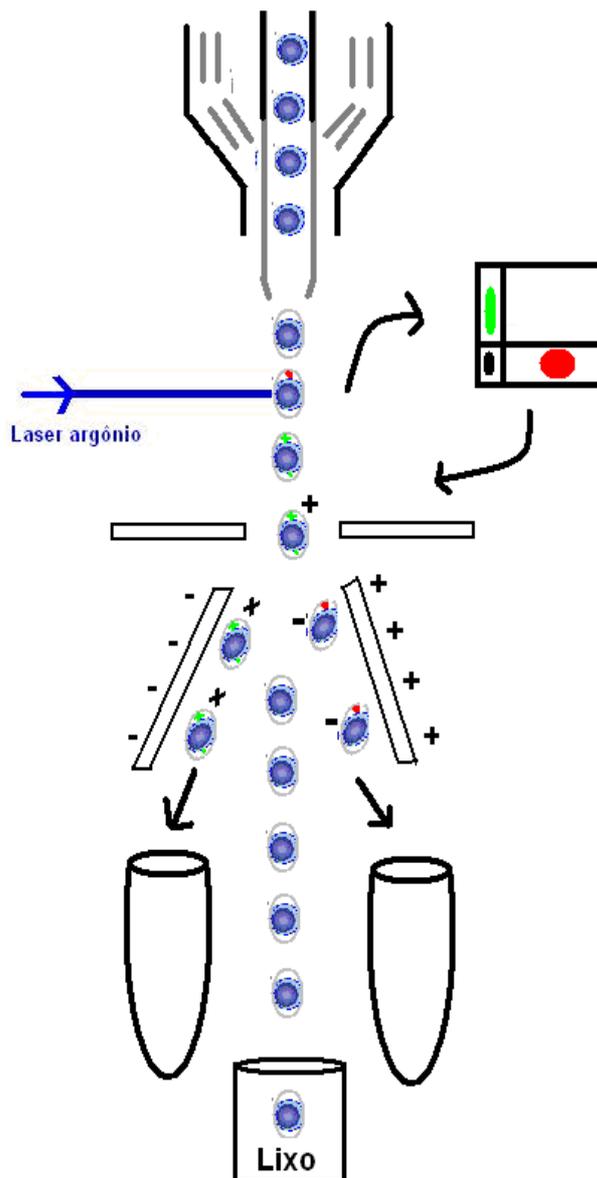


Figura 7.2: Princípio do *Cell Sorting*.

**IMPORTANTE:** Alguns usuários de citômetro de fluxo utilizam, ao invés de solução salina, água destilada para realizar a análise de amostras. Entretanto, para o *Sorting* é fundamental que as gotas sejam formadas por solução salina, já que a separação das células é baseada na transferência de íons.

Através de parâmetros eletrônicos específicos, como frequência, fase, e *drop delay*, deve-se ajustar o equipamento quanto à distância precisa entre a primeira gota a ser formada e a *flow cell*; a distância entre as gotas de forma que cada uma contenha uma única célula ao ser interceptada pelo laser; e o tempo correto que cada gota deve levar entre a *flow cell* e a placa de carregamento, a fim de atingir 100% de pureza de eficiência da separação homogênea das

populações celulares. A eficácia do *Sorting* pode ser conferida através de nova aquisição das células isoladas, as quais devem ser positivas somente para o parâmetro que foi selecionado.

## 7.2 Aplicações do *Sorting*

O *Sorting* é um processo que pode ser utilizado tanto em pesquisa básica, quanto em pesquisa clínica nas áreas de imunologia, microbiologia, genética, parasitologia, oncologia, biologia molecular e toxicologia.

A partir da amostra homogênea submetida ao *Sorting*, podem-se utilizar diversos ensaios experimentais e metodologias devido ao alto grau de pureza das amostras, a integridade das células após a separação, além das condições estéreis em que é realizado este processo. Além disso, utilizando esta tecnologia é possível determinar o número de células a ser separado, o que confere ainda mais especificidade a este processo.

Em alguns equipamentos é possível, ainda, separar apenas uma célula, em um processo chamado de *Single Cell Sorting* (ou clonagem), muito utilizado para clonar parasitos para serem cultivados para enriquecimento de acervos das coleções parasitárias ou serem utilizados em ensaios *in vitro* ou de biologia molecular. Geralmente neste processo cada célula é direcionada para um poço de placa de cultivo e para isso o citômetro de fluxo deve ter além do suporte específico para placa que permite a sua movimentação para que cada poço receba a célula, um dispositivo para calcular a direção que esta deve seguir (Figura 7.3).

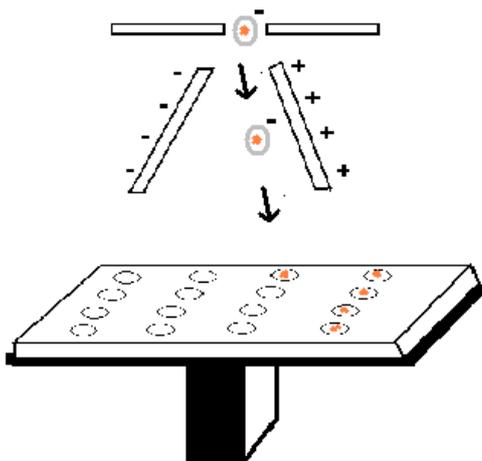


Figura 7.3. Clonagem. Placa de cultivo em movimento para que cada poço receba uma célula.

**IMPORTANTE:** A clonagem de parasitos pode ser baseada apenas na análise de parâmetros morfológicos característicos daquela célula, isto é, tamanho e granularidade. Sem a necessidade do uso de anticorpos e fluorocromos.

Os ensaios *in vitro* utilizando amostras homogêneas são utilizados para uma variedade de aplicações, podendo ser útil na avaliação de características fenotípicas e funcionais de uma mesma população celular frente a estímulos específicos, na infecção de uma única célula com determinado parasito, assim como em ensaios de dosagem, resistência e ação de drogas.

O seqüenciamento é outra metodologia aplicada a partir de uma população celular obtida por *Sorting*. Estas células podem, ser submetidas então a estudos genéticos de seqüenciamento do DNA, utilizando a PCR, mostrando que a citometria de fluxo combinada à biologia molecular, permite a realização da fenotipagem e genotipagem.

Na área da fertilização a separação de espermatozóides tem sido aplicada através de marcadores de viabilidade celular, ou ainda através da diferença de conteúdo de DNA entre os cromossomos X e Y, muito utilizada para reprodução de bovinos, mas eticamente ainda controversa para reprodução humana.

Outra aplicação do *Sorting* inclui estudos de célula-tronco pluripotente a partir da purificação de diferentes linhagens de células progenitoras de amostra de medula óssea.

Com o avanço tecnológico e o aprimoramento dos equipamentos, atualmente alguns citômetros de fluxo *cell sorter* são capazes de separar 100 mil eventos por segundo, e separar até seis populações a partir de uma mesma amostra, abrindo caminho para uma variedade de aplicações.

## CAPÍTULO 8. PROTOCOLOS PARA CITOMETRIA DE FLUXO

Amanda Torrentes de Carvalho

### 8.1. Protocolos de Citometria

Os protocolos para análise em citometria de fluxo devem ser preparados considerando alguns fatores importantes:

- 1) Quantas cores o citômetro de fluxo é capaz de ler;
- 2) Saber o tipo e a quantidade da amostra (sangue, fluídos, tecidos, parasitos, etc.);
- 3) Cuidado no preparo e estoque dos reagentes de citometria;
- 4) Saber quais os marcadores serão utilizados e a cor de fluorescência de cada um deles;
- 5) Utilizar um controle interno (isotipo);
- 6) Organização e armazenamento dos dados obtidos.

### 8.2. Preparo da Amostra

Para que seja possível analisar uma amostra no citômetro é necessário, primeiramente, que o material esteja em suspensão celular. Materiais como sangue periférico, medula óssea, líquido peritoneal e pleural, são suspensões celulares naturais. Amostras obtidas de culturas celulares também são consideradas suspensões, embora o procedimento de obtenção dependa do tipo de célula que está sendo cultivada. Já órgãos como baço, fígado e tecidos tumorais, devem ser submetidos a processamentos especiais para obtenção das células. Em alguns casos, as amostras devem também ser filtradas para reduzir qualquer tipo de variável que possa influenciar durante os procedimentos de marcação ou danos durante a aquisição das amostras pelo citômetro. Geralmente é requerido, 0.5 ml de suspensão celular, com uma concentração ideal na faixa de  $10^5$  to  $10^6$  células/mL. Para muitas amostras, mesmo em suspensão, é necessária uma etapa de separação de células por ensaios específicos para obtenção da(s) subpopulação de interesse e eliminação de hemácias e *debris* celulares.

Tomando todos os cuidados necessários, segue-se a etapa de marcação das células com anticorpos específicos.

Como sabemos para a técnica de citometria as amostras analisadas são submetidas a um ensaio de Imunofenotipagem, ou seja, um sistema de marcação via Anticorpos específicos e/ou reveladores a um sítio, ou sítios antigênicos de um antígeno.

**IMPORTANTE:** A separação por *Ficoll-Hypaque* é bastante utilizada para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). O *Ficoll-Hypaque* consiste em uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. Quando apropriadamente misturado em temperatura ambiente, o *Ficoll-Hypaque* é mais denso que as células mononucleares e as plaquetas. Por ser uma solução tóxica e causar lise celular, a mistura é colocada no fundo de um tubo e o sangue (coletado em presença de anticoagulante para evitar a coagulação) é vagarosamente colocado sobre a fase de *Ficoll*. Após centrifugação, as duas fases tornam-se bem visíveis e a separação ocorre da seguinte maneira: na fase superior ficam o plasma e seus constituintes solúveis, na interface as células mononucleares, em seguida o *Ficoll* e após os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo.

**IMPORTANTE:** Para que seja possível a análise correta no citômetro, devemos ficar atento a vários procedimentos, tanto na obtenção quanto no preparo e procedimentos de marcação das amostras. Minimizar a perda de material a ser analisado, reduzir alterações morfológicas e evitar ou minimizar variáveis que influenciem na antigenicidade, são alguns exemplos.

### 8.3. Ensaio de Imunofenotipagem

A imunofenotipagem consiste num sistema de marcação via interações entre anticorpos específicos, antígenos e anticorpos reveladores. O desenvolvimento de ensaios de imunofenotipagem tem sido útil para clínicos e epidemiologistas elaborarem diagnósticos conclusivos. A citometria é uma técnica imunológica fundamental, utilizada para detecção de Antígenos ou Anticorpos numa amostra, baseado nessas interações. O uso de anticorpos específicos de amplo espectro torna a citometria uma das mais técnicas laboratoriais mais sensíveis e específicas, fornecendo dados tanto qualitativos quanto quantitativos. Além da análise de células normais, as aplicações clínicas do uso da citometria na imunofenotipagem também se estendem a identificação e estudo patológico de leucócitos e outras células sanguíneas.

Os citômetros têm a habilidade de selecionar e quantificar simultaneamente diversos parâmetros distintos de uma amostra contendo milhares de células. Essa análise é feita individualmente para cada célula e em poucos minutos. As células são geralmente marcadas direta ou indiretamente (via anticorpos) com fluorocromos, quando excitados ou quando submetidos a uma ação ou atividade de um componente celular em particular.

**IMPORTANTE:** A intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo acoplado à uma molécula, como o anticorpo, está diretamente relacionada com o número de locais de ligação dessa molécula de reconhecimento. Geralmente os anticorpos conjugados a fluorocromos específicos a um determinado antígeno podem também se ligar de forma inespecífica a outras moléculas presentes na célula. Para evitar a interferência de falsa positividade nos resultados é preciso quantificar e eliminar a fluorescência inespecífica, comparando as amostras marcadas com anticorpo específico à amostras marcadas com um anticorpo isotópico - anticorpo da mesma classe do anticorpo específico mas com especificidade para algo irrelevante.

**IMPORTANTE:** Cuidados devem ser tomados para que a concentração ideal do anticorpo disponível não decaia em decorrência da sua ligação a formas solúveis do antígeno na amostra a ser testada.

#### **8.4. Marcação direta**

O uso de anticorpos conjugados a fluorocromos para identificar antígenos específicos dentro ou na superfície das células é bastante explorado na Imunologia e imunodiagnóstico, onde a maioria das amostras celulares já está em suspensão. Quando o anticorpo de detecção já vem conjugado a um fluorocromo, dizemos que o ensaio de imunodeteção utilizado é uma marcação direta. As células em suspensão são incubadas com os anticorpos conjugados ou anticorpo controle (isotipo). Posteriormente as amostras são submetidas à lavagem para a eliminação dos anticorpos que não se ligaram (Figura 8.1).

Esse ensaio tem a vantagem de ser rápido e simples porque apenas uma única incubação com um ou mais anticorpos marcados com fluorocromos e de especificidade distintos é requerida. Entretanto, é necessário que todos os anticorpos sejam conjugados a fluorocromos distintos e, portanto, sua produção torna-se mais complexa, o que encarece o produto.

#### **8.5. Marcação indireta**

Na imunodeteção indireta, as células em suspensão são incubadas com um anticorpo não marcado, específico ao antígeno que se quer avaliar (anticorpo primário). Posteriormente as células são lavadas e incubadas com um anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo que é específico a imunoglobulina da mesma natureza no qual o anticorpo

primário foi gerado e analisado. O anticorpo controle (isotipo) correto nesse tipo de imunoenensaio será um anticorpo não conjugado da mesma classe de imunoglobulina do anticorpo primário e também será incubado ao anticorpo secundário conjugado (Figura 8.1).

Ao contrário da marcação direta, a marcação indireta é um ensaio mais demorado e dispendioso, pois requer o uso de dois tipos de anticorpos, além de aumentar a probabilidade de marcações inespecíficas. Entretanto, a principal vantagem desta técnica compreende na maior sensibilidade devido à amplificação do sinal adquirida pela ligação de vários anticorpos secundários a um único anticorpo primário (Figura 8.1).

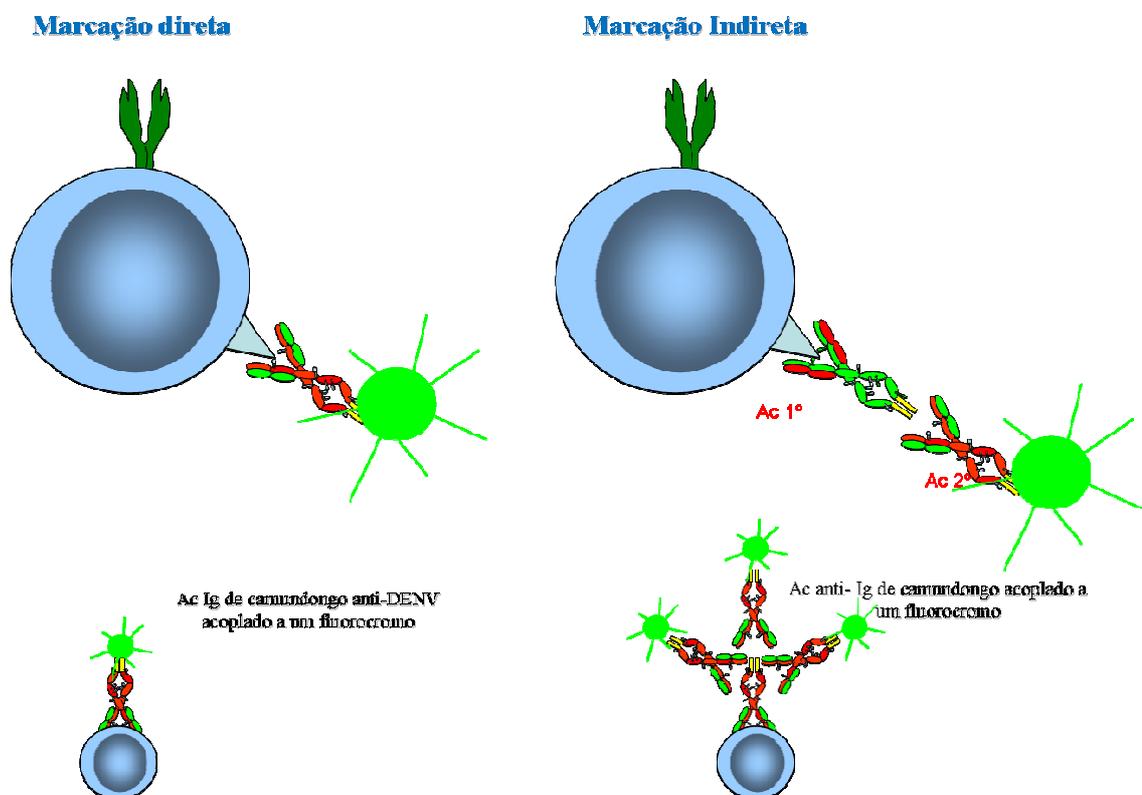


Figura 8.1. Marcação direta e indireta

## 8.6. Marcação extracelular

Uma das aplicações clínicas mais comuns da citometria de fluxo é a determinação de antígenos de superfície (imunofenotipagem) (Figura 8.2). Todas as células normais expressam uma variedade de marcadores de superfície. Entretanto, anomalias associadas a maturação ou causadas pela infecção por parasitas intracelulares podem interferir na expressão natural dessas moléculas. Através da citometria podemos distinguir entre células saudáveis e aquelas anormais ou infectadas.

### 8.6.1. Solução de fixação: Células vivas *versus* células fixadas

Existem boas razões para o uso de células vivas quando se quer caracterizar a expressão de receptores de superfície. Nessas condições, tenta-se ao máximo manter as células num estado “natural”, próximo do que ocorre *in vivo*. Portanto o ajuste da quantidade de sal, temperatura, pH e outros componentes protéicos devem obedecer a um parâmetro fisiológico.

Nos protocolos de marcação extracelular, geralmente fixamos as amostras ao término do ensaio de imunofenotipagem para preservar as marcações, permitindo uma análise posterior. A utilização do protocolo de fixação celular em citometria, antes dos procedimentos de marcação extracelular, pode alterar a antigenicidade do anticorpo causando resultados falso-negativos, embora a ultraestrutura da membrana celular permaneça íntegra.

**IMPORTANTE:** Em protocolos de marcação para avaliação funcional da habilidade fagocítica e morte celular é necessário o uso de células viáveis, sem etapa de fixação. Como são eventos dinâmicos, a preparação de amostras “temporárias” possibilita a visualização de material biológico “*in vivo*”, no seu estado natural.

Adiante será explicado com mais detalhes a importância da etapa de fixação e os tipos de fixadores a serem utilizados durante o procedimento de citometria de fluxo.

### 8.6.2. Solução de bloqueio

Anticorpos podem se ligar de forma inespecífica, geralmente com baixa afinidade, a outros componentes da célula. Portanto, um passo importante nos procedimentos de marcação extracelular é o uso de soluções que inibam ou reduzam as marcações inespecíficas. Essas soluções são chamadas de soluções de bloqueio. As ligações inespecíficas geralmente ocorrem como produto da adsorção de moléculas de anticorpo à superfície celular sem haver reação antígeno-anticorpo ou pela interação da porção Fc da imunoglobulina com receptores na superfície de diferentes populações leucocitárias. Portanto, durante os procedimentos de marcação, costuma-se tratar as amostras previamente com uma solução de bloqueio, composta de salina tamponada (pH fisiológico), albumina sérica bovina e plasma humano inativado.

### 8.6.3. Solução de lavagem

Independente da procedência da amostra utilizada e do protocolo de marcação a ser utilizado, é importante que ela seja mantida em soluções contendo nutrientes para sua manutenção e sob condições que evitem ao máximo sua degeneração. Além disso, células mortas, *debris*, anticorpos que não se ligaram ao antígeno, excesso de soluções de bloqueio e de fixação, devem ser removido da suspensão para não influenciarem na viabilidade, morfologia e funcionalidade celular. Portanto, nos diferentes protocolos de citometria, desde a obtenção da amostra e durante todo ensaio de marcação, as células são submetidas a lavagens sequenciais. A solução de lavagem geralmente é feita com salina tamponada de pH fisiológico, azida sódica e albumina sérica bovina. Geralmente, as demais soluções citadas anteriormente e a seguir são feitas a partir da solução de lavagem.

**IMPORTANTE:** Durante o preparo de soluções para o tratamento de amostras celulares em citometria de fluxo, deve-se ajustar as concentrações de sal e pH nessas soluções. Altas concentrações de sal e pH extremo podem levar ao rompimento dos imunocomplexos antígeno – anticorpo.

### 8.7. Marcação intracelular

Em muitas áreas de pesquisa, vem se tornando de extrema importância a detecção e/ou quantificação de antígenos intracelulares incluindo componentes estruturais, enzimas, fatores de transcrição e glicoproteínas destinadas a secreção ou exportadas (Figura 8.2).

Anticorpos, assim como substâncias fluorescentes, são moléculas relativamente grandes, não sendo permeável a membrana das células. Portanto, se componentes internos devem ser marcados, as membranas plasmáticas e das organelas devem ser permeabilizadas, antes ou durante o ensaio de imunodeteção. Ao mesmo tempo, os antígenos-alvo devem permanecer dentro da célula. Por estas razões, os protocolos de marcação intracelular também são acompanhados de etapas de fixação.

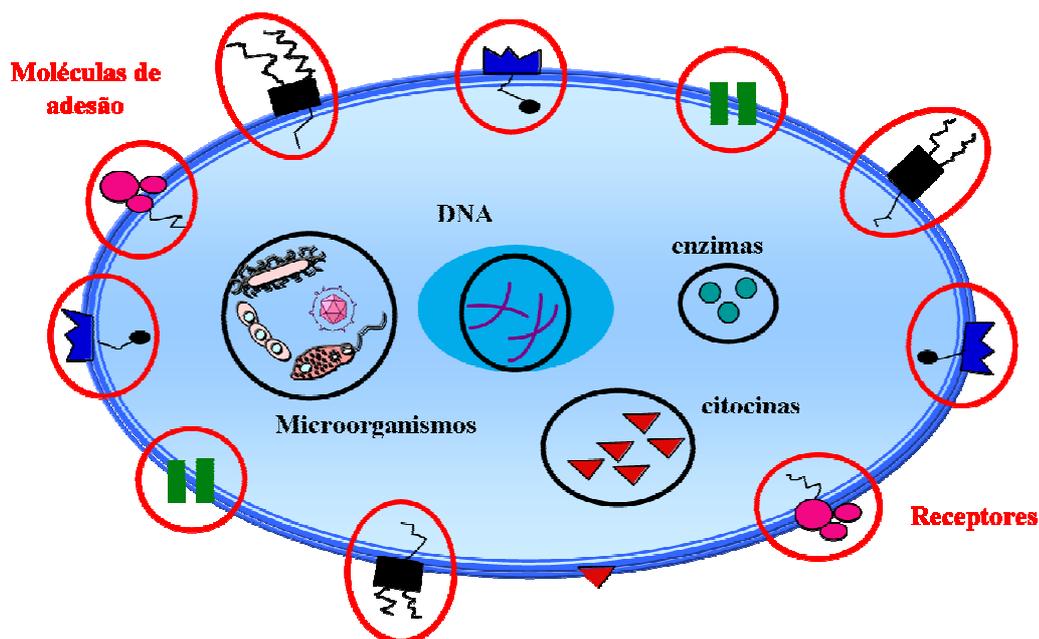


Figura 8.2. Marcação extra e intracelular

### 8.7.1. Solução de fixação

A antigenicidade, em geral, é perdida progressivamente com o aumento da concentração e tempo de incubação das amostras com o agente fixador. Portanto, para a escolha do fixador ideal deve-se sempre levar em consideração essas duas características.

Existem dois tipos principais de agentes fixadores utilizados em citometria e em outros ensaios laboratoriais que requeiram esse tipo de procedimento.

Os alcoóis e acetonas competem com as moléculas de água na formação de pontes de hidrogênio causando a precipitação local de proteínas. Porém, eles não fixam ácidos nucleicos ou carboidratos que, portanto, extravasam das células durante as etapas de lavagem. Um outro problema no uso desses tipos de fixadores em citometria é que eles tendem a formar agregados celulares.

O paraformaldeído é o fixador mais utilizado em citometria. Ele consiste na forma polimerizada do formaldeído, mas que pode se dissolver vagarosamente em solução aquosa com pH e temperatura apropriados. O formaldeído reage, ligando-se covalentemente a muitas macromoléculas biológicas. Seus principais alvos são grupos amino em aminoácidos de proteínas e nas bases de ácidos nucleicos. Ele também é um bom fixador de lipídios e não altera os grupamentos funcionais de glicoproteínas de superfície celular.

**IMPORTANTE:** Pós-fixação – A ligação dos anticorpos a antígenos de superfície ou intracelulares pode ser preservada encubando paraformaldeído, diluído em solução salina tamponada (PBS). A fixação sob essas circunstâncias irá prevenir a perda da marcação fluorescente nas amostras. Como a exposição ao fixador pode promover danos estruturais às células, este é utilizado em baixas concentrações e incubado por um curto período de tempo. Essa fixação “branda” é o suficiente para inibir alterações celulares geradas por vias metabólicas ou energéticas.

### **8.7.2. Solução de permeabilização – saponina**

Após a fixação “branda” com formaldeído, as células também mostram um aumento na permeabilidade a moléculas pequenas mais ainda permanecem impermeáveis a grandes moléculas como os anticorpos. A saponina é o agente permeabilizante mais utilizado em citometria. Produzida por várias plantas, a molécula de saponina contém uma região lipofílica que se insere nas membranas e interage com colesterol, fosfolipídios e proteínas. As saponinas rompem as interações entre colesterol e fosfolipídio e criam poros na membrana das células grandes o suficiente para permitir a entrada de macromoléculas, sem alterar a integridade da membrana e preservando a morfologia e os antígenos de membrana, em baixas concentrações.

**IMPORTANTE:** A formação dos poros pela saponina é reversível. Os anticorpos devem entrar na célula para marcar o antígeno intracelular. Após a etapa de incubação, aquelas moléculas que não interagiram com o antígeno devem ser retiradas por lavagem. Portanto, é essencial manter a saponina em todas as etapas do procedimento de marcação das amostras.

## **CAPÍTULO 9. PRÁTICA DE IMUNOFENOTIPAGEM E APOPTOSE**

### **Amanda Torrentes de Carvalho, Grazielle Alves Ribeiro & Raquel Ferraz**

#### **9.1. Tipos de amostras utilizadas em ensaios de citometria de fluxo**

A. Amostra de sangue:

- Em tubos com EDTA - é o preferencial para a imunofenotipagem e demais protocolos de marcação com anticorpos monoclonais;
- Em tubos com Heparina – quando as células forem submetidas à ensaios de cultivo celular.

B. Cultura de células - Dependendo do tipo celular a obtenção pode ser feita por ação enzimática, térmica e/ou mecânica;

C. Outras: Líquor; lavados peritoneal e bronco-alveolar (BAL) pulmonar; MO - suspensões celulares naturais;

D. Órgão ou tecidos: Processamentos especiais para obtenção das células em suspensão – ação enzimática, mecânica e/ou térmica.

#### **9.2. Protocolo Prático – Marcação de receptores de membrana e de apoptose em PBMCs**

Para a caracterização fenotípica (imunofenotipagem) de algumas subpopulações de linfócitos T e para a determinação de apoptose nessas células, aplica-se o mesmo protocolo citofluorimétrico tanto para amostras de sangue (obtidas por punção venosa), quanto para células de cultura.

##### **9.2.1. Métodos de processamento de sangue para ensaios de citometria de fluxo**

Há duas maneiras de utilizar amostras de sangue para serem submetidas a protocolos de citometria de fluxo:

- Sangue Total (submetido a uma lise prévia das hemácias) - ST
- Células Mononucleares do Sangue Periférico (submetidos a uma centrifugação em gradiente de sedimentação) - PBMC

Serão abordados três protocolos para obtenção de ST (A, B e C) e um protocolo para obtenção de PBMC (D) baseando-se na lise ou exclusão das hemácias, mantendo a morfologia dos leucócitos e a integridade da membrana celular:

**IMPORTANTE:** As hemácias são células críticas para a aquisição de amostras, podendo causar problemas de entupimento no equipamento e atrapalhar na identificação de linfócitos quanto ao tamanho e a granularidade e na análise dos resultados.

#### **A) Optilyse C (Beckman Coulter); Optilyse B (BD)**

O optilyse é um reagente próprio para a preparação de células a serem analisadas por citometria de fluxo, que se baseia na lise de hemácias e fixação dos leucócitos. Esse reagente deve ser armazenado em temperatura ambiente e já vem pronto para utilização, em uma única solução, composta de ácido fórmico para lise das hemácias, tampão e fixador (1,5% de formaldeído), não sendo necessária nenhuma diluição.

#### Protocolo:

- Em 100µL de sangue, contendo  $5 \times 10^5$  células (sangue pode estar diluído em PBS para ajustar as células para  $5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) adiciona-se 5 µL do Ac anti-CD4-FITC, 5 µL de Ac anti-CD8-PE e 5 µL de AC anti-CD3-PC5 (diluídos em PBS);
- Agitar em vortex e incubar por 20 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz; Lavar e centrifugar a amostra e em seguida adicionar 500 µL de Optilyse C, agitando imediatamente;
- Incubar por mais 10 minutos em temperatura ambiente;
- Adicionar 500 µL de PBS; agitar mais uma vez; e fixar com paraformaldeído 1%.
- Em 10 minutos a amostra já está pronta para ser analisada, mas pode ser armazenada por 24 horas na geladeira.

**IMPORTANTE:** Como a amostra é fixada não se pode realizar, por exemplo, protocolos de marcação para apoptose (7AAD e PI) ou proliferação celular, que necessitem de células viáveis. Outra limitação é a não eficiência da lise das hemácias em algumas patologias como insuficiência renal, hemoglobinopatias, etc...

### **B) Lysing solution, NH<sub>4</sub>Cl (Beckman Coulter)**

O Lysing solution permite a preparação de amostras como sangue e medula óssea, através da lise de hemácias por do cloreto de amônia (além de EDTA e bicarbonato de potássio). A solução vem 10x concentrada, e deve ser diluída em água deionizada somente no dia em que for fazer a lise, e depois descartada. Não se devem armazenar as amostras processadas na geladeira, somente a solução-mãe. A vantagem de sua utilização é que ele não tem componente de fixação e pode ser utilizado em protocolos que requeiram o uso de célula vivas.

#### Protocolo:

- Em 100µL da amostra contendo entre  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  células, adicionar o anticorpo monoclonal desejado e agitar por vortex por 5 segundos antes da etapa de incubação (por 20 minutos, protegido da luz e em temperatura ambiente);
- Após a incubação é adicionado 2mL da solução de lise, já diluída, e novamente agitada por 5 segundos; Outra incubação é feita, por 10 minutos, protegido da luz, para que ocorra a lise das hemácias;
- A amostra é submetida à centrifugação por 5 minutos a 300g; O sobrenadante é descartado e o pellet celular ressuspendido em 1mL de PBS seguido de mais 5 segundos de agitação no vortex;
- A amostra já está pronta para ser analisada, mas pode ser armazenada por até 2h na geladeira (**\*após este período a propriedade de fluorescência começa a ser prejudicada; já que a amostra não está fixada**). No caso de se utilizar uma solução fixadora uma nova lavagem deve ser realizada para em seguida adicionar a solução de fixação com paraformaldeído.

### **C) ImmunoPrep (Beckman Coulter)**

O ImmunoPrep também é um reagente utilizado no preparo dos leucócitos a serem analisados por citometria de fluxo, através da lise, tamponamento e fixação das células, previamente marcadas com os anticorpos monoclonais acoplados aos fluorocromos desejados. É composto por três soluções separadas: ImmunoPrep A (ácido fórmico), ImmunoPrep B (tamponamento) e ImmunoPrep C (fixação), que podem ser preparadas manualmente.

Além de ser um método extremamente facilitador (automatizado), o processamento das células com este reagente não necessita de etapa de lavagem, acelerando ainda mais o processo. O fixador mais utilizado é o formoldeído. Metanol e etanol são pouco usados por grumar as células.

O processamento das células pode ser realizado na bancada ou através do Multi Q prep (Beckman Coulter); ou FACS Prep (BD), que é um aparelho que possui um carrossel com capacidade de 32 amostras, capaz de distribuir os reagentes e misturar de forma automatizada. Muito utilizado nos laboratórios de análises clínicas, já vem com o código de barras pra identificação dos tubos; e este carrossel pode ser diretamente acoplado no citômetro para a análise das amostras.

#### **D) Obtenção de PBMC através de gradiente de Ficoll-Hypaque**

A solução de Ficoll-Hypaque é o gradiente de densidade mais utilizado para isolar células mononucleares. O Ficoll é um polímero de sacarose de alto peso molecular e o Hypaque (ou isopaque) é um composto orgânico iodado. Como um meio de separação, o ficoll aumenta a viscosidade promovendo a formação de rouleaux dos eritrócitos e o Hypaque aumenta a densidade do meio. Quando apropriadamente misturado e com densidade de 1077 em temperatura ambiente, o Ficoll-Hypaque é mais denso que as células mononucleares e as plaquetas. Com o uso de centrifugação, os granulócitos, eritrócitos e os monócitos carregados de ferro ficarão depositados no tubo de centrifugação. Os gradientes de Ficoll-Hypaque são os mais utilizados em laboratórios clínicos para separar os componentes celulares do sangue periférico.

Protocolo (Figura 9.1):

- Utilizam-se duas partes de sangue diluído em meio, colocada lentamente sobre uma parte de Ficoll que deve estar em temperatura ambiente. Dependendo do volume final, fazer em tubo de 15ml ou de 50ml (usar tubo de 50 ml para volume final maior do que 30 ml, porque volume pequeno pode prejudicar a visualização e retirada do anel de células). \* **O Ficoll é armazenado na geladeira e protegido da luz, mas nunca deve ser usado gelado para evitar sua polimerização e prejudicar na viabilidade das células presentes na amostra;**
- O sangue pode ou não estar diluído 1:1 em meio RPMI completo com 10% de SFB, ou em PBS. Se o sangue estiver fresco não tem problema usar sem diluição,

caso contrário é recomendado diluir pra não prejudicar a formação do anel de PBMC. \* **O ideal é utilizar o sangue fresco, processado em até 6h depois da coleta, podendo ser armazenado, desde que em temperatura ambiente, até 48h. Após 36 horas na bancada a qualidade do Ficoll começa a ser prejudicada;**

- Diferentes protocolos são utilizados para obtenção de PBMC através do Ficoll, mas geralmente o anel é formado com rotação de 400g durante 30 minutos em temperatura de 20°C. **Não é recomendado usar freio para não desfazer o anel, e preferencialmente usar aceleração mínima. Alguns protocolos aumentam a rotação e diminuem o tempo tanto na formação do anel quanto nas lavagens posteriores;**
- O anel de células mononucleares é retirado com cuidado, geralmente com pipeta Pasteur, para evitar aspirar Ficoll, que tóxico e causa lise celular, ou contaminação por granulócitos. A remoção de plasma em excesso causar contaminação da amostra por proteínas do plasma;
- A suspensão celular é transferida para outro tubo, no gelo, onde se acrescenta 10mL de meio de cultura e submete-se a solução a lavagens e centrifugações (250g, por 10 min, temperatura ambiente com freio e aceleração) de 3 a 4 vezes para a retirada de resíduo de Ficoll. Alguns protocolos recomendam fazer a última lavagem a 40 C;
- Em seguida as células devem ser ressuspensas em PBSAZ (2% de soro + 0,1% de azida sódica) e uma alíquota retirada e diluída 1:10 em Azul de Tripán 0,2% para verificar a viabilidade e contagem das células em câmara de Neubauer. A concentração celular deve ser ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL.
- Marcação de receptores de membrana e de apoptose de PBMC obtidos a partir de cultivos in vitro.

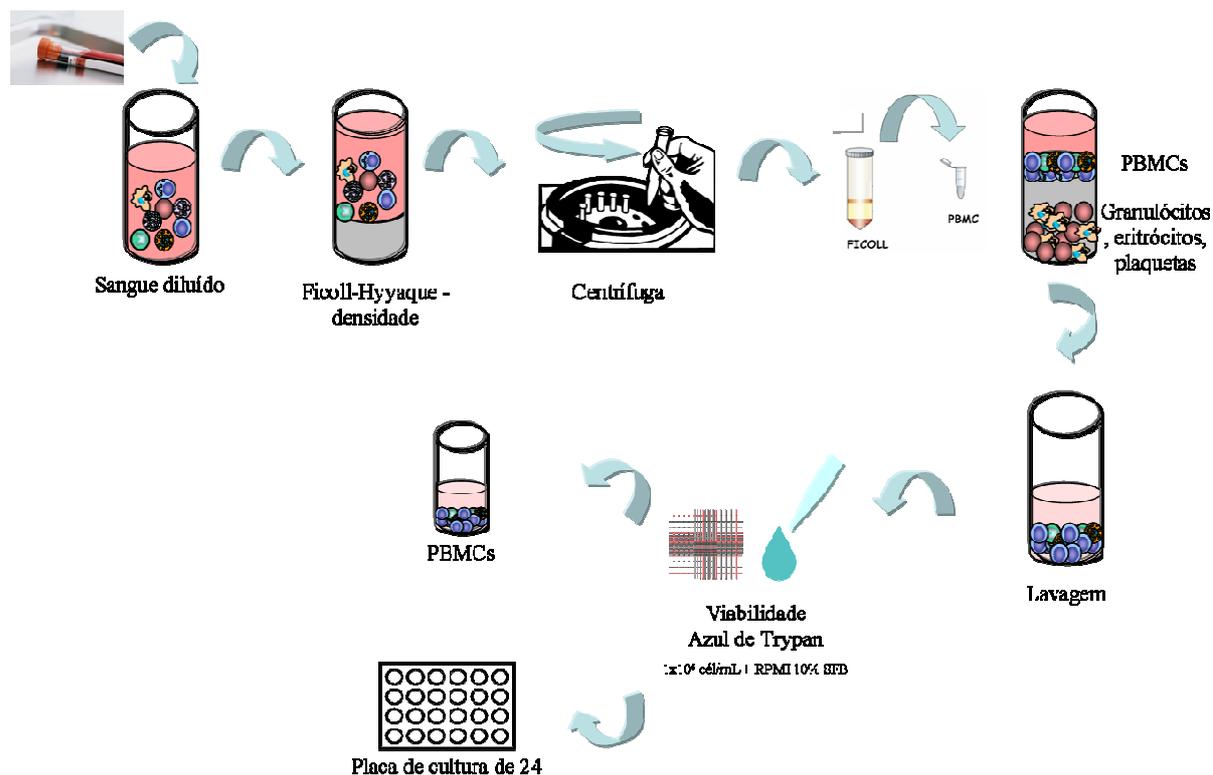


Figura 9.1. Obtenção de PBMCs pela técnica do Ficoll-Hypaque

Na cultura de PBMC os monócitos ficam aderidos no fundo da placa de cultura e sua obtenção geralmente requer ação mecânica por tripsinização ou raspagem do fundo da placa na presença de meio de cultura, em temperatura fria. As células cultivadas deverão ser retiradas dos poços da placa de cultura sem a etapa da raspagem, para obtenção da suspensão rica em linfócitos. Como, a marcação será feita para linfócitos, uma homogeneização com pipeta Pasteur, é suficiente para a retirada destas células e posterior lavagem para retirada do meio de cultura (5 minutos a 250g).

### 9.2.2. Protocolo para marcação de receptores de superfície e de apoptose

Após a etapa de obtenção de células por Ficoll-Hypaque ou de culturas, o pellet de células deve estar em uma suspensão de PBS<sub>AZ</sub>, de forma que em cada tubo de marcação tenhamos um volume final de 100µl. Obtém-se, então, 2 tubos para marcação das células separadas por Ficoll-Hypaque; 2 tubos para marcação de células cultivadas sem o estímulo; 2 tubos para a marcação de células cultivadas estimuladas, e 1 tubo controle (sem marcação).

A análise multiparamétrica por citometria será feita para se detectar as subpopulações de linfócitos. Nesse contexto são utilizados anticorpos monoclonais específicos para os receptores de superfície:

- Ac anti-CD3/PE-cy5: Antígeno de reconhecimento de linfócitos T;
- Ac anti-CD4/FITC: Antígeno de linfócitos T restritos ao MHC-II (Linfócitos T auxiliares);
- Ac anti-CD8/PE: Antígeno de linfócitos T restritos ao MHC-I (Linfócitos T citotóxicos);
- Para a detecção de células mortas foi utilizado o componente fluorescente 7AAD, um marcador de DNA celular que se liga nas bases guanina e citosina.

<b>Protocolo de marcação - volume final 100 <math>\mu</math>L</b>	
<b>Tubo 0</b>	70 $\mu$ L de PBS AZ + 10 $\mu$ L de IgG FITC + 10 $\mu$ L de IgG PE + 10 $\mu$ L de IgG PE Cy5
<b>Tubo 1</b>	70 $\mu$ L de PBS AZ + 10 $\mu$ L de CD4 FITC + 10 $\mu$ L de CD8 PE + 10 $\mu$ L de CD3 PE Cy5
<b>Tubo 2</b>	80 $\mu$ L de PBS AZ + 10 $\mu$ L de CD4 FITC + 10 $\mu$ L de CD8 PE <i>*após, 7AA-D 20 <math>\mu</math>g/mL</i>

- Incubar as amostras por 20 minutos, protegidas da luz, e à 40C;
- Adicionar 900  $\mu$ L de PBSAZ e centrifugar por 5 minutos a 250g. Nas amostras do tubo 0 e 1, o pellet é ressuspendido em 500  $\mu$ L de paraformaldeído (1%), para a fixação das células. No tubo 2, deve adicionar 4  $\mu$ L de 7AA-D + 96  $\mu$ L e incubar a amostra novamente por 20 minutos, protegida da luz, e à 40C;
- Centrifugar as células por 5 minutos a 250g, e fixar com 500  $\mu$ L de paraformaldeído (1%) + 2,5 $\mu$ L de AD (fixador específico para 7AA-D);
- Após a marcação as células estão prontas para serem adquiridas em citômetro de fluxo equipado com os filtros específicos para FITC, PE e 7AA-D (no caso FACS Calibur), ou armazenadas em temperatura entre 4 – 80C, protegidas da luz, por no máximo 4 dias.

## CAPÍTULO 10. AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS

**Amanda Torrentes de Carvalho, Grazielle Alves Ribeiro & Raquel Ferraz**

Para a utilização da citometria de fluxo como metodologia é preciso seguir uma série de etapas, desde o preparo da suspensão de células até a análise de dados, passando pela aquisição das amostras. Esta última deve ser realizada por profissional treinado, que conheça as características de funcionamento do equipamento, que podem variar de um citômetro para outro.

De uma forma geral estão descritos a seguir, sequencialmente, os procedimentos básicos para adquirir as amostras em um citômetro de fluxo.

**1º passo:** Definir que tipo de células será adquirido e quais moléculas se deseja avaliar.

**2º passo:** Conhecer o citômetro de fluxo onde a suspensão de células marcadas será adquirida, ou seja, qual o comprimento de onda do(s) laser(s) do equipamento, e quais comprimentos de onda os filtros que o equipamento possui são capazes de detectar.

**IMPORTANTE:** Existem tubos de material, tamanho e diâmetro específico para cada citômetro de fluxo. Todo equipamento possui um sistema de pressurização e, portanto, o tubo deve encaixar precisamente na agulha por onde a amostra é aspirada.

**3º passo:** Escolher uma combinação de fluorocromos de forma que a emissão de fluorescência de um não se sobreponha à emissão de outro fluorocromo.

**4º passo:** Utilizar o protocolo de marcação escolhido, para as células já em suspensão, com o(s) anticorpo(s) específico para a molécula de interesse e seu(s) respectivo fluorocromo. Manter as células em temperaturas entre 4° e 8°C protegidas da luz.

**IMPORTANTE:** Se a suspensão de células marcadas não for adquirida de imediato, recomenda-se utilizar uma solução fixadora de forma que a ligação célula-anticorpo, assim como a ligação anticorpo-fluorocromo (e sua capacidade de emitir cor), sejam preservadas até o momento da aquisição (aproximadamente 7 dias, dependendo do fluorocromo).

**5° passo:** Antes de ligar o citômetro, conferir se o compartimento de solução salina está cheio, e se compartimento de descarte está vazio. Ligar o citômetro e o computador conectado ao mesmo, e após ligar o laser aguardar 30 minutos antes da aquisição.

**6° passo:** Acionar o sistema de pressurização.

**IMPORTANTE:** O sistema hidráulico dos citômetros funciona a base de pressurização. Uma Bomba hidráulica bombeia a solução salina para a parte central da câmara do fluxo de forma a mantê-lo em um volume muito maior do que a amostra que está sendo adquirida, gerando uma pressão diferencial. Dessa forma a pressão exercida pela solução salina, juntamente com a velocidade do fluxo, estabiliza o fluxo de células que está sendo aspirada, garantindo o mínimo de deformação durante a passagem da amostra.

**7° passo:** Abrir o *software* de aquisição e montar os gráficos de acordo com os parâmetros que se deseja avaliar, isto é, tamanho vs. granularidade (padrão); fluorescência vs. fluorescência, vs. contagem de células, vs. tempo, vs. tamanho, vs. granularidade.

**IMPORTANTE:** Em qualquer aquisição o *dot plot* padrão, ou seja, o que vai definir a sua população de células, independente de fluorescência, é tamanho vs. granularidade. A partir deste *dot plot* podemos distinguir diferentes populações celulares, com tamanho e granularidade característicos, e selecionar as de interesse.

**8° passo:** Identificar (nomear), no software, a amostra a ser adquirida e salvá-la na pasta de arquivos de interesse, onde os dados serão armazenados.

**9° passo:** Colocar o tubo contendo a amostra no citômetro e iniciar a aquisição.

**IMPORTANTE:** A cada troca de amostras deve-se deixar a solução salina passar pela agulha para evitar contaminação da próxima amostra a ser adquirida.

**10° Passo:** A fim de evitar qualquer entupimento do sistema hidráulico, a contaminação do equipamento e das amostras subseqüentes a serem adquiridas deve-se Lavar o sistema hidráulico com aquisição de hipoclorito de sódio (em tubo de citometria) por

aproximadamente 5 minutos (alguns corantes precisam de um tempo maior para ser removidos completamente do equipamento, como PI), e aquisição de água destilada.

**11º Passo:** Despressurização do equipamento.

**12º Passo:** Reabastecimento do compartimento de solução salina, e esvaziamento do compartimento de descarte.

## CAPÍTULO 11. ANÁLISE DE DADOS

**Amanda Torrentes de Carvalho, Grazielle Alves Ribeiro & Raquel Ferraz**

Uma variedade de programas de computação, chamados *software*, são específicos para o armazenamento e análise dos dados adquiridos por citometria de fluxo, os quais são apresentados na forma de gráficos mono e biparamétricos. Assim, todo citômetro de fluxo possui determinado software no qual a análise concomitante a aquisição será realizada. Atualmente já existem alguns destes programas que permitem que a análise seja realizada *offline*, isto é, os dados são armazenados em arquivos e analisados após a aquisição.

**IMPORTANTE:** Cada arquivo corresponde a uma amostra.

Após a aquisição em citômetro FACSCalibur, seguimos com a etapa de análise dos dados experimentais adquiridos:

**IMPORTANTE:** Uma boa análise depende de uma aquisição bem ajustada.

**1º passo:** Escolha do programa de *software* específico para análise dos dados.

**2º passo: Elaboração dos gráficos e histogramas** - Depois de exibir os gráficos e histogramas você poderá alterar alguns parâmetros (Figura 11.1). O conjunto de todos os gráficos a serem utilizados para uma amostra chama-se protocolo, o qual também pode ser armazenado como um arquivo e, portanto, pode ser utilizado para as análises *offline*.

**3º passo: Gráfico 1 de morfologia dos linfócitos e marcações controle** – Criar gráfico 1 com parâmetros de tamanho (FSC) x granularidade (SSC) para selecionar morfologicamente os eventos que representam a população de linfócitos (R1); Também serão feitos gráficos de tamanho x marcação isotópica e/ou histogramas das marcações isotópicas: **Tubo 0**

**4º passo: Gráfico 2 da população de linfócitos T e Histograma 1** – A partir dos eventos individualizados na R1 criar gráfico 2 representando os linfócitos com parâmetros de tamanho x CD3; Selecionar e quantificar a região R2 que representa a subpopulação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>; Criar histograma 1 da marcação com CD3<sup>+</sup> sobreposto com a marcação de seu anticorpo isotípico: **Tubo 1**

**5º passo: Gráfico 3 das subpopulações de linfócitos T e Histogramas 2 e 3** - A partir da seleção da R2 no gráfico 2, criar o gráfico 3 com parâmetros de marcação CD4 x CD8. Com esse gráfico poderemos selecionar e quantificar, dentro da população de linfócitos T CD3<sup>+</sup> (R2), o percentual de linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>) e T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>); Também poderão ser feitos o histogramas 2 e 3, para cada marcação sobreposto com seus respectivos isotipos: **Tubo 1**.

**6º passo: Gráficos 4 e 5 da viabilidade das subpopulações de linfócitos T** - Criar gráfico 1 com parâmetros de tamanho (FSC) x granularidade (SSC) para selecionar morfologicamente os eventos que representam a população de linfócitos (R1); A partir da seleção da R1 no gráfico 1, criar o gráfico 3 com parâmetros de marcação CD4 x CD8; A partir do gráfico 3, selecionar a região dos eventos positivos para CD4 (R3) e dos eventos positivos para CD8 (R4); Criar o gráfico 4 a partir da R3 com parâmetros de marcação 7-AAD x FSC e o gráfico 5 a partir da R4 com parâmetros de marcação 7-AAD x FSC. Através dos gráficos 4 e 5 poderemos analisar as subpopulações de linfócitos T viáveis, em apoptose ou em necrose: **Tubo 2**

**7º passo:** O programa de *software* permite a observação dos valores estatísticos de cada amostra como número de eventos (totais ou por regiões), média (geométrica e aritmética) e mediana.

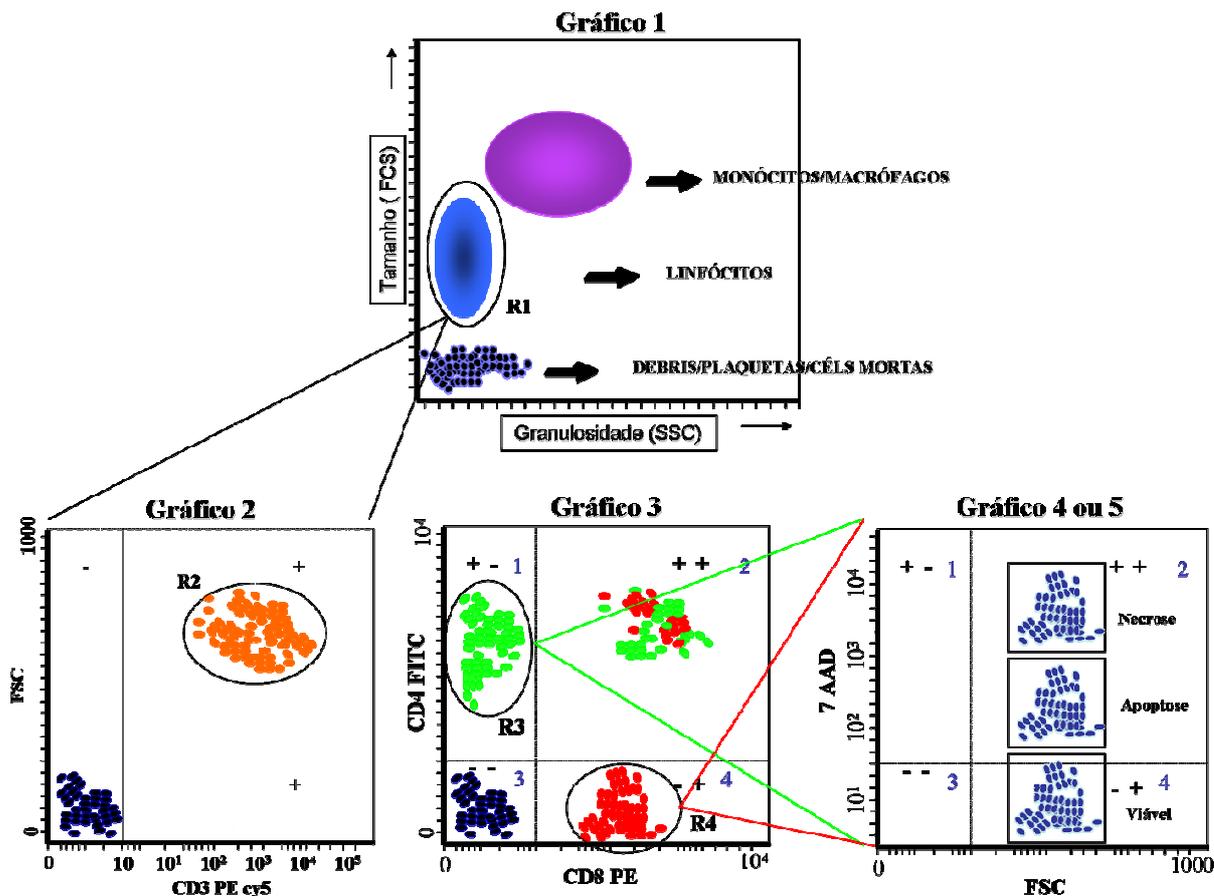


Figura 11: Gráficos em *Dot Plot* com parâmetros de FSC vs SSC; FSC vs CD3; CD4 vs CD8 e 7 AAD vs FSC e as regiões selecionadas para cada gráfico.

Gráficos dot plot - seleção das Regiões	
Gráfico 1	R1 - Morfologia dos linfócitos - parâmetros FSC x SSC
Gráfico 2	R2 - População de linfócitos T - parâmetros FSC x CD3
Gráfico 3	R3 e R4 - Subpopulações de linfócitos T - parâmetros CD4 x CD8 <i>*a partir da R2</i>
Gráfico 4	R3 - Viabilidade das subpopulações de linfócitos T auxiliares - parâmetros FSC x 7 AAD <i>*a partir da R3</i>
Gráfico 5	R4 - Viabilidade das subpopulações de linfócitos T citotóxicos - parâmetros FSC x 7 AAD <i>*a partir da R4</i>

Histogramas das marcações - Sobreposição	
Histograma 1	Marcação com Anticorpo isotipo IgG PE cy5 (linha azul) e Anticorpo anti-CD3 PE cy5 (linha vermelha)
Histograma 2	Marcação com Anticorpo isotipo IgG FITC (linha azul) e Anticorpo anti-CD4 FITC (linha vermelha)
Histograma 3	Marcação com Anticorpo isotipo IgG PE (linha azul) e Anticorpo anti-CD8 PE (linha vermelha)

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Celular e Molecular* 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005

Alberts B, Johnson A, Lweis J, Raff M, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science; 2002

Alvarez-Barrientos A, Arroyo J, Canton R, Nombela C, Sanchez-Perez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Apr;13(2):167-95.

Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clin Exp Immunol.* 2006 Feb;143(2):345-56.

Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology.* Jun;130(2):202-16.

Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Jun;101(4):437-49.

Bacal NS, Faulhaber MHW. *Aplicação prática em citometria de fluxo.* Editora Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2003

Barber GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2001 Feb;8(2):113-26.

Barbosa J, Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. Optimization of a flow cytometry protocol for detection and viability assessment of *Giardia lamblia*. *Travel Med Infect Dis.* 2008 Jul;6(4):234-9.

Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Netto M, Costa JM, et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1987 Jul;9(4):487-97.

Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry.* 1999 Mar 1;35(3):181-95.

Bertho AL, Cysne L, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of the interaction between murine macrophages and the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *J Parasitol.* 1992 Aug;78(4):666-71.

Bertho AL, Santiago, MA, Coutinho SG. Flow Cytometry in the study of cell death. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000 Jun;95(3):401-2.

Bertho AL, Santiago, MA, Da-Cruz, AM, Coutinho, SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2000 Mar;33(3):317-25.

Bruchhaus I, Roeder T, Rennenberg A, Heussler VT. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol.* 2007 Aug;23(8):376-83.

Cameron PU, Hunter SD, Jolley D, Sonza S, Mijch A, Crowe SM. Specificity of binding of HIV-1 anti-p24 antibodies to CD4+ lymphocytes from HIV-infected subjects. *Cytometry.* 1998 Sep 1;33(1):83-8.

Carbone J, Pena JM, Gil J, Benito JM, Fernandez-Cruz E. [Immunophenotype of progression to AIDS: deficiency, activation and dysfunction of CD4 and CD8 T-cells]. *Rev Clin Esp.* 2006 Apr;206(4):172-7.

Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine.* 2005 Jun 21;30(6):359-65.

Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet.* 1993 May 15;341(8855):1251-4.

Carvalho-Neta AV, Rocha RDR, Gontijo CMF, Reis AB, et al. Citometria de fluxo no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2006 58(4):480-488.

Choi HJ, Smithgall TE. HIV-1 Nef promotes survival of TF-1 macrophages by inducing Bcl-XL expression in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner. *J Biol Chem.* 2004 Dec 3;279(49):51688-96.

Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 2005 Sep;153(3):537-43.

Darcy F, Torpier G, Kusnierz JP, Rizvi FS, Santoro F. *Leishmania chagasi*: in vitro differentiation of promastigotes monitored by flow cytometry. *Exp Parasitol.* 1987 Dec;64(3):376-84.

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Feb;1762(2):191-201.

De Stefano JA, Sleight RG, Babcock GF, Sramkoski RM, Walzer PD. Isolation of *Pneumocystis carinii* cysts by flow cytometry. *Parasitol Res.* 1992;78(3):179-82.

Di Giorgio C, Ridoux O, Delmas F, Azas N, Gasquet M, Timon-David P. Flow cytometric detection of Leishmania parasites in human monocyte-derived macrophages: application to antileishmanial-drug testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Nov;44(11):3074-8.

Dvorak JA. Analysis of the DNA of parasitic protozoa by flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 1993;21:191-204.

Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol*. 1995 May 1;154(9):4294-301.

Feig C, Peter ME. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol*. 2007 Nov;37 Suppl 1:S61-70.

Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog*. 2008 May;4(5):e1000018.

Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2004;263:1-32.

Goncalves R, Vieira ER, Melo MN, Gollob KJ, Mosser DM, Tafuri WL. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infect Dis*. 2005;5(1):39.

Gougeon ML, Piacentini M. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):501-8.

Gross A. BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB Life*. 2001 Sep-Nov;52(3-5):231-6.

Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol*. 2003 Jan;22(1):15-20.

Herault O, Colombat P, Domenech J, Degenne M, Bremond JL, Sensebe L, et al. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. *Br J Haematol*. 1999 Mar;104(3):530-7.

Hiasa Y, Takahashi H, Shimizu M, Nuriya H, Tsukiyama-Kohara K, Tanaka T, et al. Major histocompatibility complex class-I presentation impaired in transgenic mice expressing hepatitis C virus structural proteins during dendritic cell maturation. *J Med Virol*. 2004 Oct;74(2):253-61.

Hilleman MR. Strategies and mechanisms for host and pathogen survival in acute and persistent viral infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14560-6.

Ho J, Moir S, Malaspina A, Howell ML, Wang W, DiPoto AC, et al. Two overrepresented B cell populations in HIV-infected individuals undergo apoptosis by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 19;103(51):19436-41.

Hulett HR, Bonner WA, Barrett J, Herzenberg LA. *Cell Sorting*: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*. 1969 Nov 7;166(906):747-9.

Humphreys MJ, Allman R, Lloyd D. Determination of the viability of *Trichomonas vaginalis* using flow cytometry. *Cytometry*. 1994 Apr 1;15(4):343-8.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *The Immune System in Health and Disease*. Immunobiology, 5th edition. Garland Science, 2001

Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*. 1999 Feb;11(1):37-53.

Kamau SW, Nunez R, Grimm F. Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacol*. 2001;1:1.

Kram D, Thale C, Kolodziej H, Kiderlen AF. Intracellular parasite kill: flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *J Immunol Methods*. 2008 Apr 20;333(1-2):79-88.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of leishmania results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem*. 2009 Jun 5;284(23):15496-504.

Lecoeur H, de Oliveira-Pinto LM, Gougeon ML. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods*. 2002 Jul 1;265(1-2):81-96.

Lecoeur H, Melki MT, Saidi H, Gougeon ML. Analysis of apoptotic pathways by multiparametric flow cytometry: application to HIV infection. *Methods Enzymol*. 2008;442:51-82.

Lemasters JJ. Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):351-60.

Li X, Breukers C, Ymeti A, Pattanapanyasat K, Sukapirom K, Terstappen LW, et al. Clinical evaluation of a simple image cytometer for CD4 enumeration on HIV-infected patients. *Cytometry B Clin Cytom*. Jan;78(1):31-6.

Limjindaporn T, Netsawang J, Noisakran S, Thiemmecca S, Wongwiwat W, Sudsaward S, et al. Sensitization to Fas-mediated apoptosis by dengue virus capsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Oct 19;362(2):334-9.

Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*. 2000 Apr 10;256(1):19-26.

Maniati E, Potter P, Rogers NJ, Morley BJ. Control of apoptosis in autoimmunity. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):190-8.

Marti GE, Stetler-Stevenson M, Bleesing JJ, Fleisher TA. Introduction to flow cytometry. *Semin Hematol*. 2001 Apr;38(2):93-9.

McSharry JJ. Uses of flow cytometry in virology. *Clin Microbiol Rev*. 1994 Oct;7(4):576-604.

McSharry JJ. Analysis of virus-infected cells by flow cytometry. *Methods*. 2000 Jul;21(3):249-57.

Melki MT, Saidi H, Dufour A, Olivo-Marin JC, Gougeon ML. Escape of HIV-1-infected dendritic cells from TRAIL-mediated NK cell cytotoxicity during NK-DC cross-talk--a pivotal role of HMGB1. *PLoS Pathog*.6(4):e1000862.

Merchant SH, Gonchoroff NJ, Hutchison RE. Apoptotic index by Annexin V flow cytometry: adjunct to morphologic and cytogenetic diagnosis of myelodysplastic syndromes. *Cytometry*. 2001 Feb 15;46(1):28-32.

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998 Feb;8(2):177-87.

Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. *J Infect Dis*. 2006 Sep 1;194(5):600-7.

Noble-Wang JA, Zhang S, Price D, Ahearn DG. Viability of amoebae, fungal conidia, and yeasts: rapid assessment by flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2004;268:153-61.

Noviello CM, Pond SL, Lewis MJ, Richman DD, Pillai SK, Yang OO, et al. Maintenance of Nef-mediated modulation of major histocompatibility complex class I and CD4 after sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2007 May;81(9):4776-86.

Nunez R. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr Issues Mol Biol*. 2001 Apr;3(2):39-45.

Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jul;9(7):532-42.

Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):107-24.

Peng L, Jiang H, Bradley C. [Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on lymphoma cells undergoing apoptosis]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2001 Dec;32(4):602-4, 20.

Petrovas C, Mueller YM, Dimitriou ID, Bojczuk PM, Mounzer KC, Witek J, et al. HIV-specific CD8+ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4444-53.

Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol.* 1990 Nov 1;145(9):3100-4.

Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007 Dec;29(12):671-8.

Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis.* 2007 May;12(5):869-76.

Scott-Algara D, Rouzioux C, Blanche S, Burgard M, Didier C, Riviere Y, et al. In untreated HIV-1-infected children, PBMC-associated HIV DNA levels and cell-free HIV RNA levels are correlated to distinct T-lymphocyte populations. *J Acquir Immune Defic Syndr.* Apr;53(5):553-63.

Shapiro, HM. Microbial analysis at the single-cell level: Tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods.* 2000 Sep; 42(1):3-16.

Shapiro HM. The evolution of cytometers. *Cytometry A.* 2004 Mar;58(1):13-20.

Shubar HM, Mayer JP, Hopfenmuller W, Liesenfeld O. A new combined flow-cytometry-based assay reveals excellent activity against *Toxoplasma gondii* and low toxicity of new bisphosphonates in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):1110-9.

Teixeira, Patrícia Monteiro de Freitas. Associações entre aspectos clínico-laboratoriais e parâmetros fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa na leishmaniose tegumentar americana. Belo Horizonte, 2005. Tese de doutorado (Doutora em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2005

Thomson BJ. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol.* 2001 Apr;82(2):65-76.

Torrentes-Carvalho, Amanda. Estudo da interação de monócitos humanos e vírus dengue sorotipo 2: vias de ativação e mecanismos de apoptose. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciências-Imunologia Viral)-Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008

Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Dec;104(8):1091-9.

Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, et al. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med.* 2007 Sep;27(3):453-68, v.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994 Mar 11;76(5):777-9.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Jul 17;184(1):39-51.

Vindelov, L. Flow cytometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchows arch. B. Cell pathol.* 1977 Sep; 24(1):227-242

Wu NP, Li D, Bader A, Hoxtermann S, Brockmeyer N. [Effect of HIV-1 infection on apoptosis of CD4+ T lymphocytes mediated by Fas]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2003 Apr;32(2):90-3.

Ymeti A, Li X, Lunter B, Breukers C, Tibbe AG, Terstappen LW, et al. A single platform image cytometer for resource-poor settings to monitor disease progression in HIV infection. *Cytometry A.* 2007 Mar;71(3):132-42.

Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jan;9(1):47-59.

Zuo J, Church J, Belzer M, Kitchen C, Ank B, Schmid I, et al. Short communication: enhanced CD8+ T cell apoptosis in HIV-infected adolescents with virologic failure on protease inhibitor-based therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* Jun;26(6):681-4.