



CURSOS DE VERÃO 2017
Instituto Oswaldo Cruz

Citometria de Fluxo: Fundamentos e Aplicações na Pesquisa Científica

Autores: Alessandro Marins dos Santos

Clarissa Ferreira Cunha

Jessica Ribeiro Lima

Raquel Ferraz

Thaize Quiroga Chometon Pedro

Coordenador: Alvaro Luiz Bertho

AUTORES

ALESSANDRO MARINS DOS SANTOS, M.Sc.: Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Veiga de Almeida (Rio de Janeiro - RJ). Especialista em Biotecnologia pela FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Mestre em Patologia pelo Curso de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense - UFF (Niterói - RJ). Trabalhou como apoio técnico-especializado na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (2013 - 2016). Atualmente, é Doutorando no Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, no qual é bolsista CNPq, desenvolve a Tese intitulada “Análise de precursores de linfócitos T na medula óssea: Correlação com a atrofia do timo durante a infecção oral aguda pelo *Trypanosoma cruzi*” no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sob a orientação do Dra. Juliana de Meis e do Dr. Désio Aurélio de Oliveira Farias. Trabalha com Citometria de Fluxo desde 2009.

CLARISSA FERREIRA CUNHA, M.Sc.: Biomédica formada pela Universidade Severino Sombra (Vassouras - RJ); mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Atualmente é doutoranda pelo mesmo programa de Pós-graduação, no qual é bolsista CNPq e atua na área de Imunologia e Patogenia, desenvolvendo a tese intitulada "Perfis citotóxicos dos linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT na resposta imune de pacientes de leishmaniose tegumentar Americana, da fase ativa até longo período pós-cura; e em episódios de recidiva da doença" no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Alvaro Luiz Bertho e Dra. Alda Maria da Cruz.

JÉSSICA RIBEIRO DE LIMA: Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal Fluminense (UFF - Rio de Janeiro- RJ). Atualmente é mestranda pelo programa de Pós-graduação stricto-sensu em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e atua na área de Imunologia e Patogenia, desenvolvendo a dissertação intitulada "Fatores imunológicos associados à falha terapêutica em pacientes com leishmaniose tegumentar Americana causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis*" no Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, sob a orientação do Dra. Alda Maria da Cruz.



RAQUEL FERRAZ, PhD: Graduada em Biomedicina pela Universidade Severino Sombra (Vassouras - RJ). Mestre em Ciências pelo Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ), área de concentração: Imunologia e Patogenia. Doutora em Ciências pelo Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Supervisora Científica na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (2006-2016). Trabalha com Citometria de Fluxo desde 2006. Atualmente é assessora científica, especialista em citometria de fluxo na empresa Beckman Coulter (2016 – atual).

THAIZE QUIROGA CHOMETON PEDRO, MSc: Biomédica formada pela Universidade Federal Fluminense (UFF); especialista em gestão da qualidade em saúde pelo Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein; mestre em Vigilância Sanitária pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS/FIOCRUZ, área de concentração: Imunologia e Patogenia. Atualmente trabalha como apoio técnico-especializado na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ (2016 – atual).

COORDENADOR

ALVARO LUIZ BERTHO, PhD: Bacharelado em Biomedicina pela Universidade do Rio de Janeiro - UNI-RIO (Rio de Janeiro - RJ). Doutor em Ciências, Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ), área de concentração: Imunoparasitologia. Pesquisador Titular e Chefe Substituto do Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Coordenador da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Ex-Consultor Científico no Setor de Imunologia do Laboratório Dr. Sérgio Franco (1996 a 2003). Ex-Professor Adjunto de Imunologia Clínica na Universidade Severino Sombra (Vassouras, RJ - 2005 a 2012). Expertise nas áreas de Imunologia, Citometria de Fluxo, Imunoparasitologia e Imunogenética. Membro da International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) e da Sociedade Brasileira de Imunologia. Pioneiro na Citometria de Fluxo no Brasil desde 1988.

APOIO



PREFÁCIO

A Citometria de Fluxo é uma tecnologia que tem sido utilizada mundialmente em diversas instituições de pesquisas e em laboratórios de análises clínicas, tornando-se fundamental em uma variedade de estudos, principalmente nas áreas da Imunologia, Hematologia, Imunogenética, Microbiologia, Biologia Marinha e mais recentemente em avaliações de nanopartículas. A evolução e modernização da Citometria de Fluxo vêm acompanhando o progresso do desenvolvimento tecnológico e da ciência mundial. No Brasil, esta ciência teve início em 1989, com a aquisição do primeiro citômetro de fluxo pelo Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sendo aplicada em diversos projetos de pesquisa científicos, dissertações de mestrado e/ou teses de doutorado. Enquanto os cursos de graduação abordam os aspectos teóricos envolvidos no estudo das respostas imunes, o Curso de Férias do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, juntamente com esta Apostila, tem como objetivo apresentar alguns conceitos básicos da imunologia e da Citometria de Fluxo. Serão abordadas as aplicações potenciais desta técnica com ênfase na identificação de populações celulares e dos perfis funcionais associados à ativação, proliferação e papel das células envolvidas na resposta imune relacionadas à algumas doenças infecto-parasitárias. Este material deve ser utilizado como ferramenta de estudo, despertando no aluno de graduação interesse e novas idéias que possam ser abordadas em estudos posteriores que envolvam a Citometria de Fluxo.

Alvaro Luiz Bertho

SUMÁRIO

Capítulo 1. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA	08
1.1 Introdução	08
1.2 Processo de formação, maturação e ativação dos linfócitos	09
1.3 Imunidade Inata	13
1.4 Imunidade Adaptativa	18
1.5 Produção de Anticorpos Monoclonais	27
Capítulo 2. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO	28
2.1 Conceitos Básicos	29
2.2 Fluorocromos e LASERs	30
2.3 Sistema Ótico	34
2.3.1 Tipos de filtro	36
2.4 Sistema eletrônico	36
2.5 <i>Software</i>	37
2.6 Princípios de Funcionamento	41
2.7 Compensação de cores	45
2.8 Histórico da Citometria de Fluxo	47
Capítulo 3. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO	61
3.1 Distinção de populações celulares	61
3.2 Imunofenotipagem	62
3.3 Avaliação do conteúdo de DNA	68
3.4 Morte Celular – Apoptose	72
3.5 Proliferação celular	74
3.6 Ensaios funcionais	75
3.7 Bead-based immunoassays	76
3.8 Análise de micropartículas	78
3.8 Análise de microorganismos	81
3.9 Interação parasito-célula hospedeira	81
3.10 Microbiologia marinha	82

Capítulo 4. CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA AO ESTUDO DAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS.....	83
4.1 Infecção pelo HIV e a depleção de células T CD4 ⁺	83
4.2 Tuberculose	86
4.3 Leishmaniose Tegumentar Americana	88
4.4 Zika	93
Capítulo 5. CELL SORTING POR CITOMETRIA DE FLUXO – PRINCIPIOS E APLICAÇÕES.....	95
5.1 Princípios.....	95
5.2 Aplicações do <i>cell sorting</i>	100
5.2.1 Sexagem de semem.....	100
5.2.2 Single Cell Sorting – clonagem.....	103
REFERÊNCIAS.....	104

CAPÍTULO 1. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA

Alessandro Marins dos Santos

1.1 Introdução

A imunologia é a ciência que estuda os mecanismos de defesa do organismo em resposta a um estímulo antigênico. A resposta imunológica é crucial para o controle de infecções, uma vez que sem tal resposta, certas intervenções terapêuticas específicas contra determinados agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e protozoários) não são capazes de controlar a infecção e produzir seus efeitos esperados. Em geral, a eficiência da resposta imunológica para promover o controle e a proteção contra microrganismos é dependente da sinergia entre células das linhagens mielóides e linfóides, as quais integram, respectivamente, de um modo geral, a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

A resposta imune inata é uma resposta inicial, imediata, capaz de detectar padrões moleculares comuns a uma grande variedade de microrganismos e atuar num curto período, sendo efetiva até horas após o contato com o antígeno. O mecanismo de resposta funcional das populações celulares envolvidas na resposta inata envolve principalmente a ingestão de microrganismos através da fagocitose, liberação de enzimas de degradação e/ou liberação de substâncias antimicrobianas. Ainda que a resposta fornecida pela imunidade inata não seja diretamente eficaz na destruição ou controle do patógeno, esta pode fornecer um arcabouço essencial para a resposta imune adaptativa eficaz, uma vez que pode atuar na apresentação de antígenos, liberação de mediadores que estimulam o recrutamento e a diferenciação fenotípica e funcional de células da linhagem linfóide. Assim, a resposta imune adaptativa é subsidiada e desenvolvida posteriormente à resposta imune inata e ocorre mais tardiamente, sendo mantida ao longo da vida de um indivíduo como uma adaptação à infecção por um determinado patógeno. A especificidade da resposta imune adaptativa a uma determinada molécula antigênica e/ou sequência peptídica, permite que ocorra um fenômeno identificado como memória imunológica, que confere uma imunidade protetora duradoura, que pode ser extremamente eficaz diante de um desafio secundário com o mesmo antígeno. O perfil fenotípico e funcional de células de memória pode variar, mas em geral estas desempenham resposta efetora e proteção através do aumento de moléculas co-estimulatórias e de adesão em sua membrana celular; ativação de vias de sinalização e transdução gênica que induzem proliferação celular, secreção de citocinas e anticorpos; liberação de fatores quimiotáticos e de crescimento.

1.2 Processo de formação, maturação e ativação dos linfócitos

Ambas as respostas imunes, inata e adaptativa, são constituídas por populações celulares originadas, desenvolvidas e amadurecidas durante o processo de hematopoiese. Durante tal processo, células-tronco hematopoiéticas pluripotentes, localizadas na medula óssea, geram células precursoras, progenitores comuns relacionados às diferentes populações celulares e que originam todos os elementos celulares do sangue, incluindo hemácias, plaquetas e células das linhagens linfóide e mielóide do sistema imune (Figura 1.1). O progenitor mielóide comum é o precursor de monócitos/macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mastócitos e células dendríticas do sistema imune inato, e também de megacariócitos e células sanguíneas vermelhas. Por outro lado, o progenitor linfóide comum na medula óssea é o precursor de linfócitos antígeno-específicos do sistema imune adaptativo, como os linfócitos T e B, e também das células *natural killers* (NK), que não são antígeno-específicas e, portanto, são consideradas como parte do sistema imune inato.

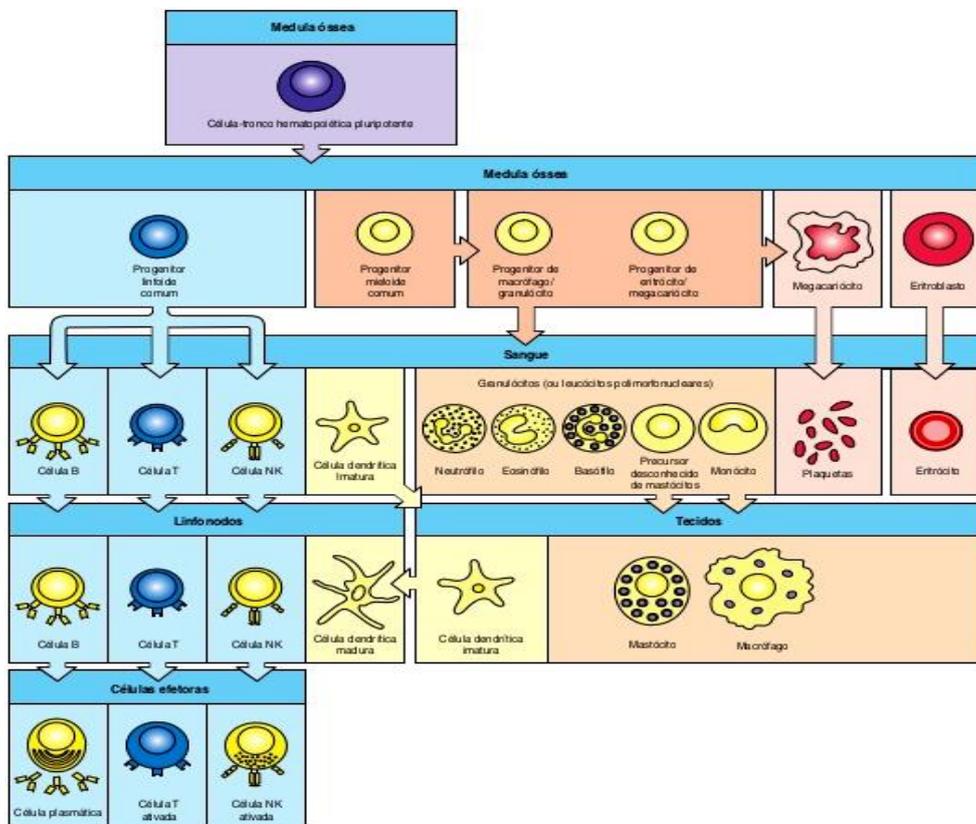


Figura 1.1. Hematopoiese. Adaptado de Janeway, Travers & Walport (2010).

Os linfócitos circulam pelo sangue e pela linfa e também são encontrados em grande número nos tecidos linfóides ou órgãos linfóides, onde se organizam e formam aglomerados evidentes dentro da arquitetura original do tecido constituído por células não linfóides. É comum a divisão dos órgãos linfóides em centrais ou primários, onde ocorre a maturação dos precursores linfóides e a produção de linfócitos (medula óssea e o timo), e em órgãos linfóides secundários ou periféricos (baço, linfonodos, tecido linfoide associado a mucosas) que são locais onde os linfócitos virgens (*naïve*) maduros são mantidos e a resposta imune adaptativa é iniciada. Todavia, antes de desempenhar seu potencial funcional na resposta imune adaptativa nos órgãos linfóides secundários, precursores linfóides situados na medula óssea e no timo passam por uma série de eventos oriundos de um programa altamente regulado de expressão sequencial de genes. Tal programa leva a um repertório diversificado, mudanças no fenótipo celular, aquisição de competência funcional e potencial para migrar para os órgãos linfóides secundários. Esse processo de desenvolvimento e diferenciação é chamado de maturação de linfócitos (Figura 1.2)

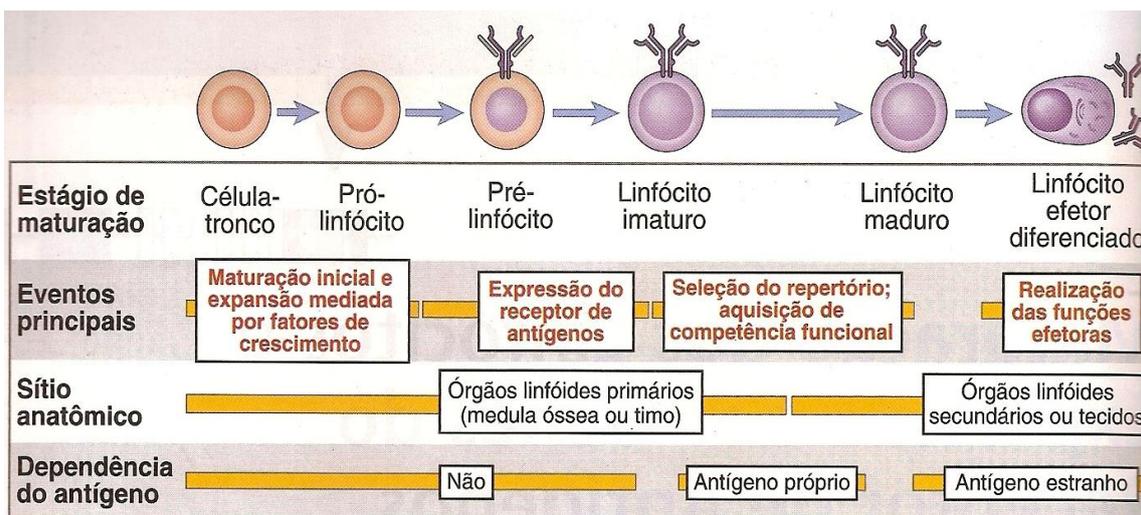


Figura 1.2: Maturação de linfócitos T. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

O processo de maturação dos linfócitos B e T ocorre, respectivamente, na medula óssea e no timo, e envolve, principalmente, a proliferação de suas linhagens precursoras, a expressão de genes para o receptor de antígeno e a seleção do repertório de linfócitos maduros. A alta atividade mitótica destas linhagens precursoras durante o processo de maturação é estimulada principalmente pela interleucina 7 (IL-7), produzida pelas células do estroma da medula óssea e do timo, e ocorre para aumentar a variedade do repertório de linfócitos antígeno-específicos. O aumento da variabilidade do repertório de linfócitos é um evento extremamente importante para garantir a grande diversidade de clones de linfócitos com receptor (*T cell receptor-TCR* ou *B cell receptor-BCR*) específico para um determinado

antígeno. Cada indivíduo apresenta, aproximadamente, 10^7 ou mais variedades de clones, que constituem os repertórios de linfócitos T e B, com TCR ou BCR diferentes, capazes de reconhecer, de modo específico, uma ampla diversidade de epítomos antigênicos. Os receptores de antígenos de linfócitos T e B são essenciais para a sobrevivência, proliferação e maturação dessas células. Na ausência de expressão do receptor de antígenos, durante seu desenvolvimento nos órgãos linfóides primários, os linfócitos são induzidos à morte programada ou apoptose. Mesmo nos estágios intermediários da maturação, as células pré-B ou pré-T apresentam uma forma imatura do receptor (a cadeia pesada da Imunoglobulina (Ig) nas células pré-B, ou a cadeia variável β ($V\beta$) do TCR nas células pré-T, associadas a cadeias glicoproteicas provisórias). Na ausência de expressão dessas estruturas temporárias, as células sofrem apoptose. A expressão dos receptores dos pré-linfócitos permite um estágio de verificação intermediário que assegura o sucesso da primeira recombinação genética, pois os sinais por eles induzidos resgatam os linfócitos em desenvolvimento e impedem a morte por apoptose e ou por negligência. Nos linfócitos em estágio mais avançado de maturação, o receptor de antígeno definitivo é expresso, gerando sinais que promovem a sobrevivência, proliferação, bem como a continuação do processo de maturação dessas células. Aproximadamente 90 a 95% das células T e B imaturas não expressam receptores adequados e morrem por apoptose. O fenômeno de preservação das especificidades úteis no timo é conhecido como seleção positiva e assegura a maturação das células T nas quais os receptores se ligam com baixa avidéz às moléculas próprias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Por outro lado, células T nas quais os receptores se ligam com alta afinidade aos auto-antígenos apresentados pelas células epiteliais tímicas, cabe a seleção negativa eliminar o clone autorreativo, induzindo-o à morte por apoptose. A seleção negativa é um mecanismo fisiológico importante para a manutenção da tolerância aos antígenos próprios. Esse mecanismo é conhecido como tolerância central. Para os linfócitos B, processos semelhantes são responsáveis pela geração do repertório. É importante salientar que o processo natural de diversidade do repertório de linfócitos que ocorre nos órgãos linfóides primários não está ligado à resposta imune adaptativa após um estímulo antigênico.

Uma vez completada a maturação dos linfócitos B na medula óssea e dos linfócitos T no timo, os dois tipos de linfócitos deixam esses órgãos, através da corrente sanguínea, seguem para os órgãos linfóides periféricos e recirculam continuamente entre esses órgãos e o sangue. A disposição anatômica dos órgãos linfóides secundários permite que durante o processo de circulação e recirculação linfocitária, possíveis sítios de inflamação sejam inspecionados. Desta forma, os linfonodos ou gânglios linfáticos recebem células apresentadoras de antígenos dos sítios de entrada nos tecidos, o baço as recebe do sangue

e outros tecidos linfóides, como as amígdalas e placas de Peyer, as recebem das mucosas do sistema digestório. Os linfócitos *naïves* do sangue e oriundos dos linfóides primários, migram seletivamente para o estroma do linfonodo através da vênula especializada de endotélio alto (HEVs) (Figura 1.3A). O processo de migração desses linfócitos para o linfonodo e dos linfócitos ativados para o sítio de inflamação é dependente de receptores de *homing*, que garantem o endereçamento linfocitário para um determinado local e das adresinas, que são ligantes de adesão vascular presentes no endotélio. Alguns receptores de quimiocinas (CCR7 para linfócitos T e CXCR5 para linfócitos B), integrinas (LFA-1 e VLA-4), L-selectinas (CD62L) e moléculas de adesão vascular são cruciais para o processo de migração celular e de diapedese para o sítio de inflamação (Figura 1.3B).

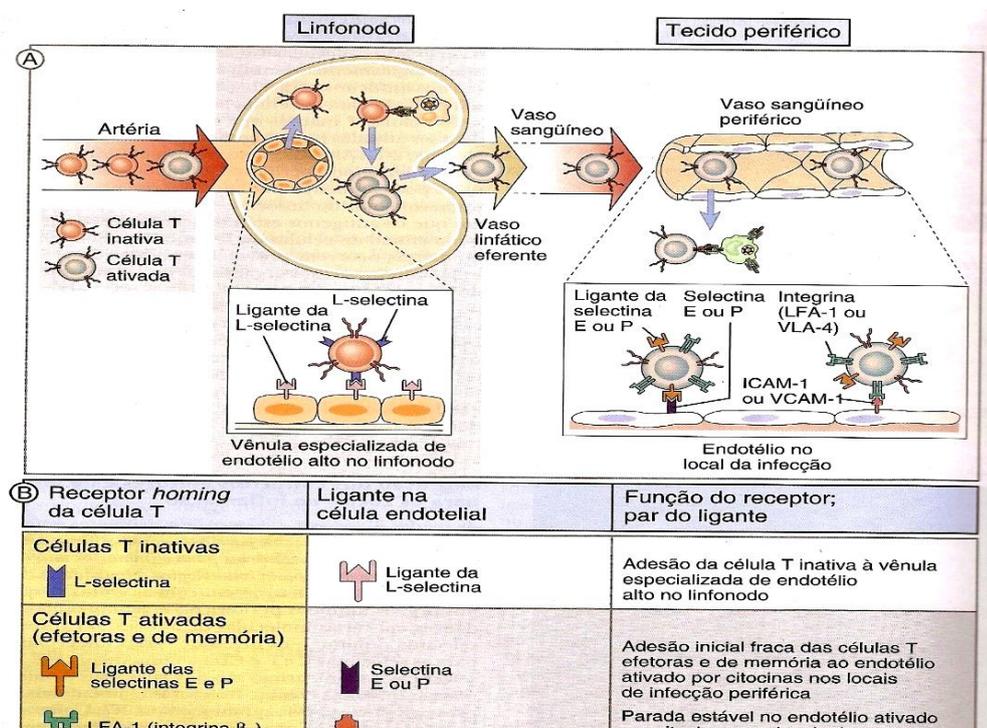


Figura 1.3: Migração de linfócitos T inativos e efetores. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

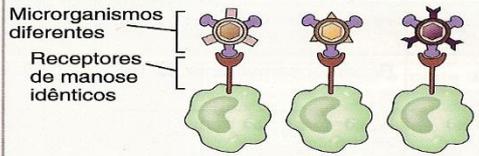
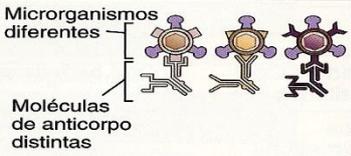
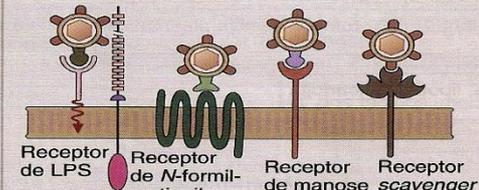
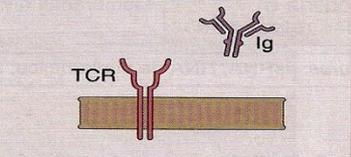
A resposta imune adaptativa que ocorre nos órgãos linfóides secundários é dependente tanto da circulação e recirculação linfocitária como da apresentação antigênica desempenhada pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), macrófagos e células dendríticas especializadas. Após as APCs fagocitarem antígenos no sítio de inflamação, estas migram para o órgão linfóide secundário mais próximo, processam o antígeno no vacúolo digestivo e apresentam os epítomos via MHC para os linfócitos. O processo de apresentação antigênica, então, prima e ativa os clones de linfócitos inativos *naïves*

específicos para o antígeno, para que essas células possam exercer suas funções efetoras e recirculem dos compartimentos linfóides para o sítio de inflamação.

1.3 Imunidade Inata

A resposta imune inata ou imunidade inata atua como uma primeira linha de defesa contra os microrganismos invasores. Ao contrário da resposta imune adaptativa, a resposta imune inata não é antígeno-específica, porém possui potencial para reconhecer grandes classes de moléculas antigênicas não próprias. Em alguns casos, a imunidade inata pode eliminar certos agentes infecciosos através da resposta inflamatória, além de subsidiar a imunidade adaptativa, através da apresentação de antígenos para linfócitos e liberação de quimiocinas e interleucinas. As classes de moléculas antigênicas não próprias, reconhecidas pelos receptores de células da imunidade inata, são estruturas que incluem ácidos nucleicos que são únicos de microrganismos; RNA de dupla hélice encontrado nos vírus em replicação ou sequencias CpG de DNA não metilado de bactéria; proteínas típicas de bactérias como as iniciadas por *N*-formilmetionina; lipopolissacarídeos sintetizados por bactérias Gram-negativas e ácidos teicóicos sintetizados por bactérias Gram-positivas; bem como oligossacarídeos ricos em manose, encontrados em glicoproteínas microbianas, mas não em mamíferos (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Especificidade da Imunidade Inata e Adaptativa, adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

<p>Especificidade</p>	<p>Para estruturas compartilhadas por classes de microrganismos (“padrões moleculares”)</p>  <p>Microrganismos diferentes Receptores de manose idênticos</p>	<p>Para detalhes estruturais de moléculas microbianas (antígenos); pode reconhecer antígenos não-microbianos</p>  <p>Microrganismos diferentes Moléculas de anticorpo distintas</p>
<p>Receptores</p>	<p>Codificados na linhagem germinativa; diversidade limitada</p>  <p>Receptor de LPS Receptor de <i>N</i>-formil-metionil Receptor de manose Receptor scavenger</p>	<p>Codificados por genes produzidos por recombinação somática de segmentos gênicos; maior diversidade</p>  <p>TCR Ig</p>
<p>Distribuição dos receptores</p>	<p>Não-clonal: receptores idênticos em todas as células de uma mesma linhagem</p>	<p>Clonal: clones de linfócitos com especificidades distintas expressam receptores diferentes</p>
<p>Discriminação entre “próprio” e “não-próprio”</p>	<p>Sim; células do hospedeiro não são reconhecidas ou podem expressar moléculas que evitam as reações da imunidade inata</p>	<p>Sim; baseada na seleção contra linfócitos auto-reativos; pode ser imperfeita (dando origem à auto-imunidade)</p>

Essas moléculas constituem os padrões moleculares associados a patógenos, os PAMPs, reconhecidos de forma eficaz pelas células da imunidade inata, através de seus chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). As classes antigênicas estruturais que funcionam como PAMPs apresentam maior conservação em relação aos epítomos antigênicos que são reconhecidos especificamente por receptores de antígenos da imunidade adaptativa, uma vez que estes são mais passíveis a alterações peptídicas devido a mutações gênicas.

O sistema imune inato é composto por barreiras naturais do organismo, tais como, as superfícies epiteliais que produzem peptídeos com função de antibiótico natural; células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) capazes de identificar, ingerir e destruir microrganismos; células NK com atividade citotóxica, além de proteínas do sangue, incluindo o sistema complemento e citocinas que regulam várias atividades das células do sistema imune inato (Tabela 1.2).

Tabela 1.2: Componentes da Imunidade Inata, adaptado Abbas & Lichtman (2005).

Componentes	Funções principais
Barreiras	
Camadas epiteliais	Impedem a entrada de microrganismos
Defensinas	Morte microbiana
Linfócitos intra-epiteliais	Morte microbiana
Células efectoras circulantes	
Neutrófilos	Fagocitose inicial e morte de microrganismos
Macrófagos	Fagocitose eficiente e morte de microrganismos, secreção de citocinas que estimulam a inflamação
Células NK	Lise de células infectadas, ativação de macrófagos
Proteínas efectoras circulantes	
Complemento	Morte de microrganismos, opsonização de microrganismos, ativação de leucócitos
Lectina de ligação à manose (colectina)	Opsonização de microrganismos, ativação do complemento (via da lectina)
Proteína C-reativa (pentaxina)	Opsonização de microrganismos, ativação do complemento
Fatores da coagulação	“Bloqueio” dos tecidos infectados
Citocinas	
TNF, IL-1, quimiocinas	Inflamação
IFN- α , - β	Resistência à infecção viral
IFN- γ	Ativação de macrófagos
IL-12	Produção de IFN- γ pelas células NK e pelas células T
IL-15	Proliferação de células NK
IL-10, TGF- β	Controle da inflamação

A proteção mediada pelas células epiteliais envolve a secreção de substâncias antibióticas naturais, como as defensinas e criptocidinas. Estas moléculas funcionam como antibióticos de amplo espectro de ação, capazes de destruir uma grande variedade de bactérias e fungos, tendo as criptocinas a capacidade até de esterilizar o lúmen localmente. Os epitélios das barreiras e as cavidades serosas, como a pele e o epitélio das mucosas, contêm respectivamente, linfócitos T intra-epiteliais e a subpopulação B-1 de células B, que parecem atuar como sentinelas em locais comuns de invasão microbiana.

Os fagócitos, incluindo os neutrófilos e os macrófagos, são células cuja função primária é identificar, ingerir e destruir microrganismos. A população de neutrófilos é a mais abundante dentre as populações envolvidas na resposta imune inata, e sua produção e diferenciação terminal é estimulada pelo fator estimulante de colônias de granulócitos, na medula óssea. Os neutrófilos são células polimorfonucleares presentes no sistema sanguíneo, apesar dos neutrófilos serem células de vida curta, possuem um alto potencial migratório e microbicida através da fagocitose, pois seu citoplasma apresenta grânulos líticos compostos por lisozima, colagenase, elastase, lisossomos e outras substâncias microbicidas que podem destruir os antígenos presentes no fagolisossomo. Outro mecanismo de destruição de microrganismos desempenhado por neutrófilos é a formação de armadilhas extracelulares (NETs), estas consistem num mecanismo pós-morte onde os neutrófilos projetam uma rede constituída por material nuclear e grânulos intracitoplasmáticos os quais possuem alto potencial inflamatório capazes de capturar microrganismos. Devido a sua capacidade de migração e atividade microbicida, esses possuem alto potencial de resposta, entretanto, caso não seja recrutado para um local de inflamação, os neutrófilos circulam no sangue por apenas seis horas e após este período, morrem por apoptose e são fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou no baço. Os macrófagos são células residentes nos tecidos, geradas a partir da diferenciação de monócitos sanguíneos, que se transformam em macrófagos ao entrar no tecido. Os macrófagos são células apresentadoras de antígeno profissionais efetoras dominantes nos estágios tardios da imunidade inata, e ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos são residentes em tecidos, podem proliferar num sítio inflamatório e possuem vida longa. Inclusive, os macrófagos podem ser encontrados em processos inflamatórios crônicos, granulomas, formando células gigantes multinucleadas ao redor de antígenos grandes que não podem ser fagocitados. Os macrófagos são residentes em locais estratégicos, como no tecido conjuntivo subepitelial, no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos. Nestes locais desempenha funções efetoras que atuam no recrutamento ativo de células para o local de infecção após o reconhecimento dos PAMPs, fagocitose e destruição dos

microrganismos ingeridos, bem como, produzem citocinas que atuam na resposta imune inata e adaptativa (Figura 1.4).

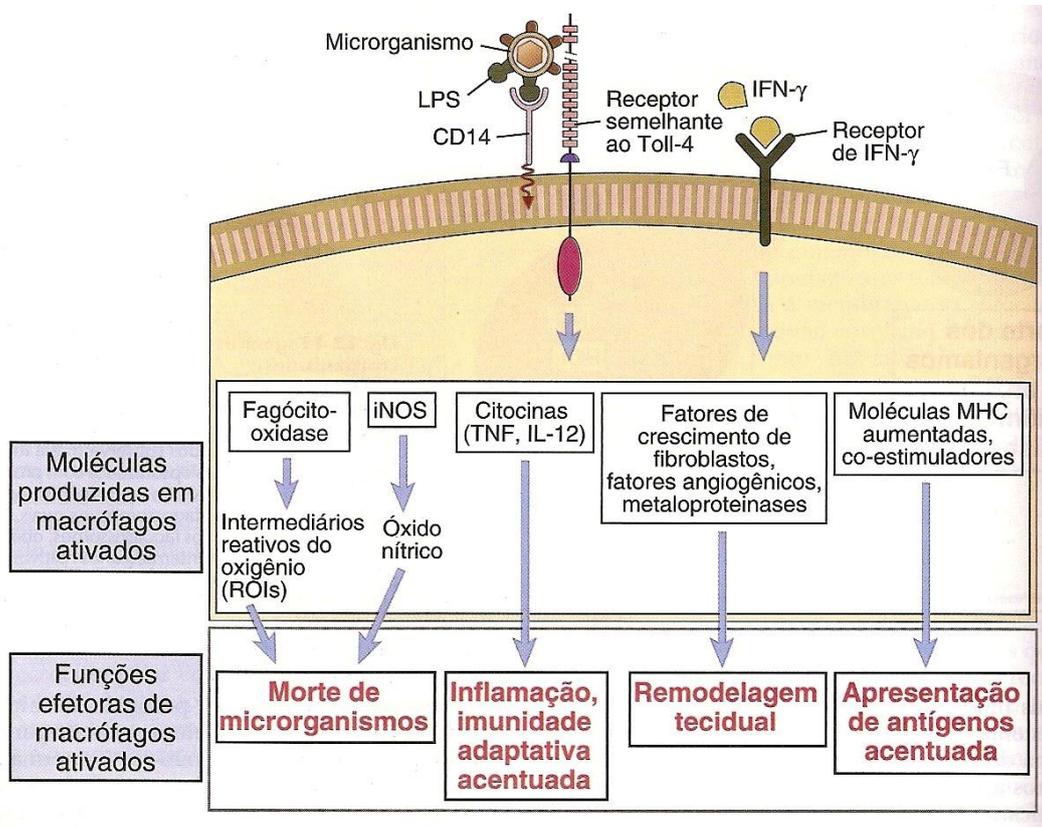


Figura 1.4: Funções efetoras dos macrófagos, Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As células *Natural Killer* (NK) constituem uma subpopulação linfocitária que não expressa receptores rearranjados somaticamente e distribuídos clonalmente, nem necessita de ativação adicional para destruir células-alvo, como ocorre nas outras subpopulações linfocitárias. A ativação de células NK é gerada a partir de receptores de ativação presentes na superfície celular e que possuem moléculas de sinalização com motivos de ativação baseados em tirosina (ITAMs) em suas caudas citoplasmáticas, entretanto, a ativação é regulada pelo balanço entre os sinais gerados pelo receptor de ativação e os receptores de sinais inibitórios gerados por moléculas de sinalização com motivos inibição baseados em tirosina (ITIMs). Os receptores de inibição de células NK se ligam a moléculas de MHC de classe I próprias, as quais são expressas em células normais. Mesmo que ambos os receptores estejam ligados, há dominância da transdução de sinais pelos ITIMs em relação aos ITAMs. Caso não ocorra sinalização pelos ITIMs e a consequente desfosforilação dos ITAMs os sinais de ativação ocorrem gerando o recrutamento e ativação de tirosina-cinases

e proteínas adaptadoras e a ativação da transcrição gênica e reorganização do citoesqueleto (Figura 1.5). O conceito de balanço entre sinais inibitórios e de ativação para a regulação das respostas das células NK é extremamente simplista, uma vez que os sinais negativos de receptores de inibição tendem a ser dominantes e o desfecho funcional do engajamento de receptores de ativação e de inibição está inclinado em favor da inibição.

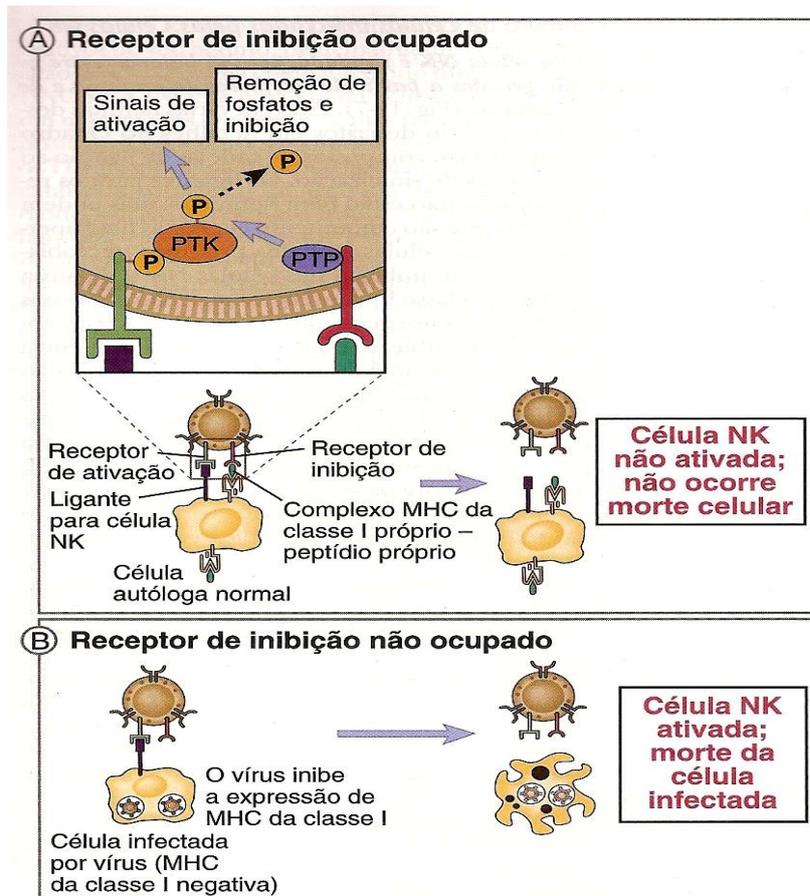


Figura 1.5: Receptores de ativação e de inibição de das células NK. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

A expansão, produção de citocinas e atividade citolítica de células NK também podem ser estimuladas por citocinas, tais como IL-15, IL-12, IL-18 e interferons (IFNs), as quais são produzidas por células tanto da imunidade inata como da adaptativa. Os mecanismos efetores de células NK que induzem a destruição de células-alvo envolve, principalmente, a abertura de poros através da ação da perforina e da ação da granzima, que penetra pelos poros e induz a apoptose ou através da secreção de IFN- γ , que induz atividade microbicida em macrófagos.

Outras proteínas plasmáticas ligadas à resposta imune inata compreendem a proteína C-reativa (PCR) que pertence à família das pentraxinas e que se liga tipicamente a fosfolipídios bacterianos, como a fosforilcolina e atua como opsonina; os fatores de coagulação, que evitam a hemorragia através da formação de trombos que podem delimitar infecções e evitar a difusão de microrganismos; e as citocinas, que recrutam e ativam leucócitos, além de produzirem alterações sistêmicas, incluindo o aumento na síntese de células efectoras e proteínas que potencializam as respostas antimicrobianas.

1.4 Imunidade Adaptativa

A imunidade adaptativa ocorre através de mecanismos efetores desempenhados pelas populações linfocitárias envolvidas na resposta imune humoral, os linfócitos B e pelas populações linfocitárias envolvidas na resposta imune celular, os linfócitos T. Ambas as populações são capazes de reconhecer especificamente epítomos antigênicos diversificados, entretanto, os linfócitos T são capazes de reconhecer apenas antígenos num contexto de apresentação antigênica, associados a moléculas de MHC, enquanto que os linfócitos B são capazes de reconhecer especificamente antígenos na superfície celular e secretar anticorpos capazes de reconhecer antígenos solúveis.

Os anticorpos são conceituados como glicoproteínas globulares com função imunitária e pertencem à superfamília das imunoglobulinas. A ação dos anticorpos desencadeia vários mecanismos na fase efetora da resposta imune que, frequentemente, resultam em anular a ação de microrganismos, por meio da ativação do sistema complemento, opsonização dos antígenos para fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em que os anticorpos marcam os microrganismos para serem destruídos pelas células do sistema imune inato e reações de hipersensibilidades (Figura 1.6).

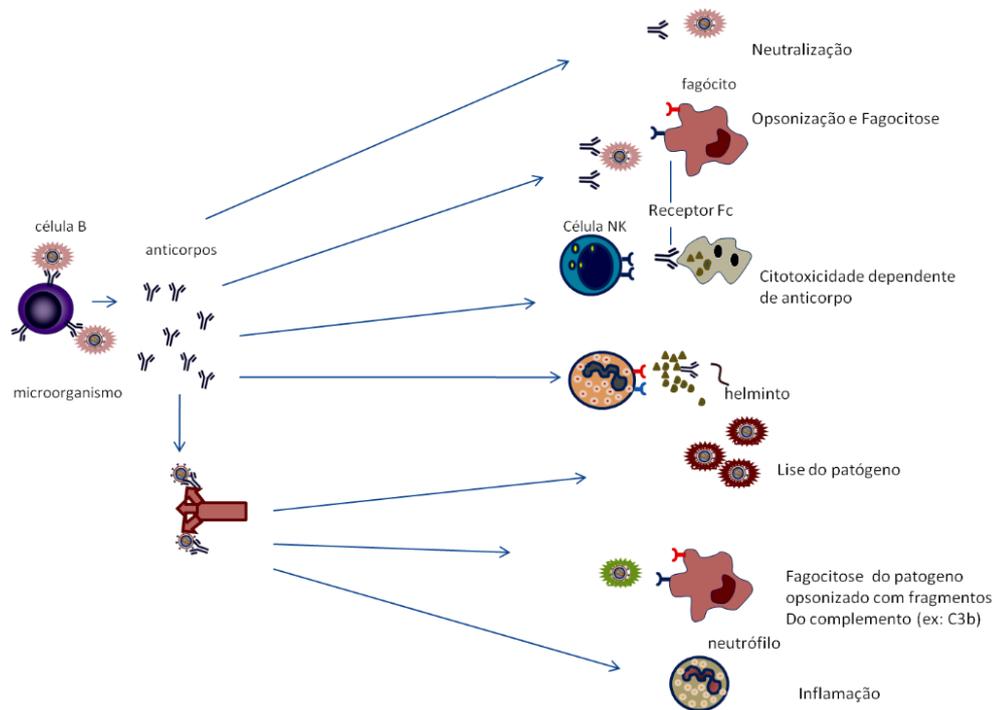


Figura 1.6: Mecanismos da Resposta Humoral Efetora. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

Os anticorpos são estruturalmente divididos em regiões, as quais desempenham uma determinada função. A região de ligação ao antígeno varia amplamente, sendo conhecida como região variável ou região Fab. A região molecular que participa da função efetora é conhecida como região constante ou região Fc e não varia do mesmo modo, embora apresente cinco formas principais que se especializaram na ativação de diferentes mecanismos. Estruturalmente, a imunoglobulina é formada por duas cadeias leves (L - *light*), idênticas, e de duas cadeias pesadas (H - *heavy*), também idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por pontes dissulfídicas. O número exato e as posições destas pontes entre as cadeias diferem entre as classes e subclasses de Imunoglobulinas. Além disso, ambas as cadeias, leves e pesadas, possuem uma região variável e outra constante. Portanto, a imunoglobulina possui na cadeia leve uma região constante (CL) e uma variável (VL). O mesmo na cadeia pesada, uma região constante (CH) e uma variável (VH) (Figura 1.7).

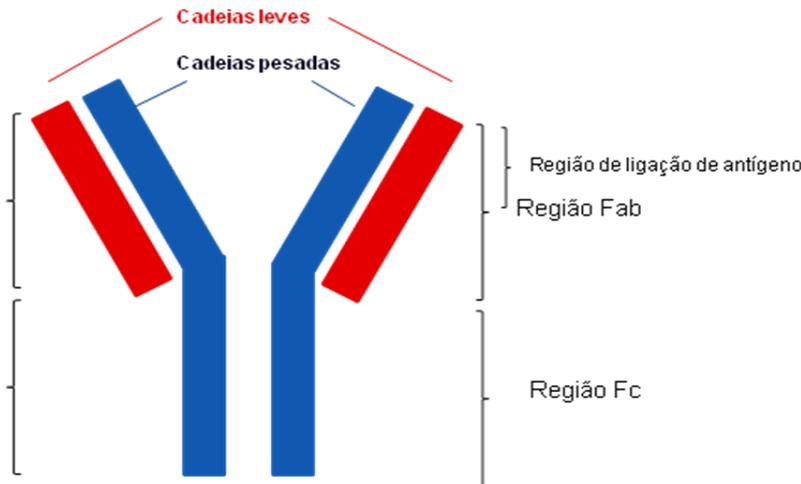


Figura 1.7: Estrutura da Imunoglobulina.

Os anticorpos são distribuídos por difusão através de mecanismos especiais, para levá-los, por exemplo, para os pulmões e o intestino. Conforme a disposição de suas imunoglobulinas os anticorpos são classificados em 5 classes ou isotipos (Figura 1.8).

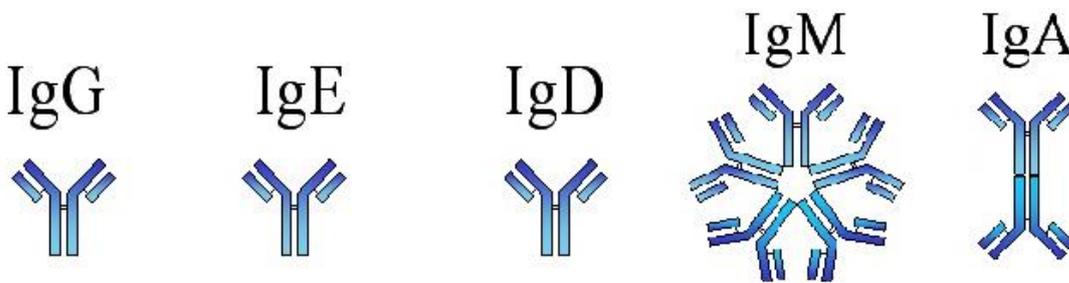


Figura 1.8: Estrutura das classes de Imunoglobulina. Adaptado de http://vigiar.blogspot.com.br/2012_01_01_archive.html, 12/01/2014.

Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune humoral são sempre da classe IgM. Estes são produzidos antes que a célula B tenha sofrido ativação por células T para sofrer hipermutação somática e troca de isotipo. Essas moléculas formam pentâmeros cujos 10 sítios de ligação com o antígeno podem se acoplar simultaneamente a antígenos multivalentes, tais como os polissacarídeos de parede celular bacteriana. Esta estrutura pentamérica também torna a IgM capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, o que contribui para o controle mais eficiente de uma infecção. Quanto à IgD, não se conhece muito bem a sua função, mas parece exercer um papel na diferenciação dos linfócitos B induzida pelo antígeno. O principal isotipo de imunoglobulina no sangue e nos

fluidos extracelulares é a IgG, considerando todas as subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). A IgG tem propriedades diversas, dentre as quais, confere proteção ao feto, pois é a única classe de imunoglobulina humana que pode ser transportada através da placenta diretamente para a corrente sanguínea do feto. A IgG também atua na neutralização de toxinas, imobilização de bactérias, sensibilização para NK, ativação do complemento e opsonização. A IgA é a principal imunoglobulina presente em secreções externas, como saliva, muco, suor, suco gástrico e lágrimas. Além disso, é a principal imunoglobulina contida no colostro e no leite e deve ser no neonato a principal fonte de proteção contra patógenos no intestino. A IgA se divide em duas subclasses, IgA1 e IgA2. A IgA presente no plasma é encontrada na forma monomérica e em pequenas concentrações, enquanto a forma dimérica é encontrada em grandes concentrações nas regiões mucosas do organismo. Estas previnem a invasão de bactérias ou a penetração de toxinas nas células epiteliais. A IgE está difundida de maneira moderada nos espaços extravasculares e tem como principal propriedade a sensibilização de mastócitos e basófilos, promovendo reação inflamatória, através da liberação de mediadores químicos como a histamina, que, por sua vez, promove vasodilatação, permitindo a passagem de anticorpos do vaso para a área lesada, e fatores quimioatraentes que recrutam fagócitos para o local de infecção. Além disso, podem estar envolvidas em processos alérgicos e na ajuda para eliminação de helmintos, quando sensibilizam eosinófilos.

A ativação das células T *naïve* (virgens) e a diferenciação em células efetoras capazes de eliminar os antígenos e adquirir memória imunológica é dependente do processo de reconhecimento antigênico e de sinais co-estimulatórios capazes de induzir a expansão clonal. A diferenciação das células T *naïve* em células efetoras ou de memória é caracterizada pelo aumento e ou perda da expressão de moléculas-chaves para as funções que serão desempenhadas dentro dos compartimentos linfóides secundários ou no sítio de inflamação (Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Características dos linfócitos inativo, efetores e de memória. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

	Linfócitos inativos	Linfócitos ativados ou efetores	Linfócitos de memória
Linfócitos T			
Migração	Preferencialmente para os linfonodos periféricos	Preferencialmente para tecidos inflamados	Preferencialmente para tecidos inflamados, mucosas
Frequência das células que respondem a um determinado antígeno	Muito baixa	Alta	Baixa
Funções efetoras	Nenhuma	Secreção de citocinas; atividade citolítica	Nenhuma
Ciclo celular	Não	Sim	+/-
Expressão da proteína de superfície	Baixa	Alta	Baixa
Receptor IL-2 de alta afinidade	Alto	Baixo	Baixo ou variável
Receptor de <i>homing</i> do linfonodo periférico (L-selectina, CD62L)			
Moléculas de adesão: integrinas, CD44	Baixa	Alta	Alta
Receptor de quimiocina: CCR7	Alto	Baixo	Variável
Isoforma principal do CD45 (somente nos seres humanos)	CD45RA	CD45RO	CD45RO; variável
Morfologia	Pequeno; citoplasma escasso	Grande; mais citoplasma	Pequeno
Linfócitos B			
Isótipo da imunoglobulina (Ig) da membrana	IgM e IgD	Freqüentemente IgG, IgA, IgE	Freqüentemente IgG, IgA, IgE
Afinidade da Ig produzida	Relativamente baixa	Aumenta durante as respostas imunológicas	Relativamente alta
Função efetora	Nenhuma	Secreção de anticorpos	Nenhuma
Morfologia	Pequeno; citoplasma escasso	Grande; mais citoplasma; plasmócito	Pequeno
Receptor de quimiocina: CXCR5	Alto	Baixo	?

Dentre as subpopulações de linfócitos T, as subpopulações que possuem melhor caracterização são as células T CD4⁺ auxiliaadoras (*helper*) e células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs). As células T CD4⁺ *helper* são assim denominadas devido ao perfil funcional que desenvolvem após a sua ativação, este inclui principalmente a secreção de citocinas que estimulam a proliferação e a diferenciação de células T, células B, macrófagos e outros leucócitos, sua função principal é amplificar a reação em cascata que medeia a resposta imune adaptativa. Outro fator importante quanto a resposta por células T CD4⁺ e CTLs, é que as primeiras reconhecem antígenos que possuem ciclo biológico extracelular e que em geral são apresentados via MHC de classe II após o processo de fagocitose e degradação no fagolisossomo, enquanto que os CTLs reconhecem antígenos que possuem ciclo biológico intracelular e que em geral são apresentados via MHC de classe I. Não obstante, é comum definir a resposta efetora de linfócitos T CD4⁺ em células T_{H1} (*T helper 1*) ou T_{H2} (*T helper 2*), tais populações são assim definidas com base nas citocinas que produzem, apesar da expressão de citocinas ser mista em certos casos e passível de variações de acordo com estado de ativação celular, o padrão de citocinas T_{H1} ou T_{H2} predomina em

reações imunes crônicas e a subpopulação que será induzida possui características funcionais e consequências patológicas específicas que podem determinar uma resposta inflamatória eficaz ou a evasão do microrganismo. O padrão de citocinas produzido por essas subpopulações de linfócitos T também participa do desenvolvimento e expansão de tais subpopulações, por exemplo, o IFN- γ secretado por células T_H1 promove a expansão de células T_H1 e inibe células T_H2 , contrariamente, a citocina IL-4 e IL-10 secretada por células T_H2 promove a expansão de células T_H2 e inibe T_H1 , assim, essa dinâmica de regulação cruzada faz com que a resposta iniciada seja polarizada e amplificada numa determinada direção.

A via de diferenciação T_H1 é estimulada pela resposta a microrganismos que infectam e ativam macrófagos e células NK produtoras de IL-12 ou IFN- γ . A IL-12 se liga aos seus receptores presentes na superfície de células T CD4 estimuladas pelo antígeno e ativa a transcrição do fator STAT-4, o qual promove a diferenciação das células T em T_H1 , a via de diferenciação T_H1 que envolve IFN- γ ocorre pela ativação do fator de transcrição chamado T-bet (Figura 1.9). A via de diferenciação T_H2 é a resposta a helmintos e alérgenos, os quais causam a estimulação crônica de células T é dependente de IL-4, tal citocina atua mediante a ativação de STAT-6 e GATA-3 ativando a transcrição dos genes das citocinas T_H2 (Figura 1.9). As citocinas e os fatores de transcrição envolvidos na polarização de ambas as respostas, T_H1 e T_H2 , ativam a transcrição gênica de citocinas que atuam de forma autócrina e parácrina nas subpopulações acima e assim amplificam sua resposta efetora.

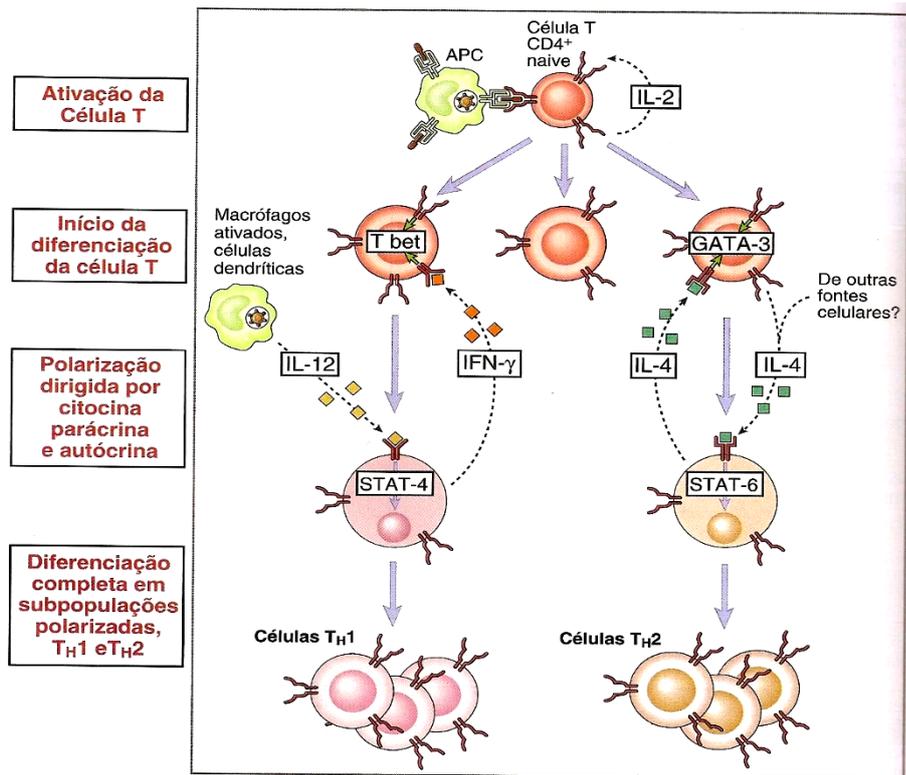


Figura 1.9: Desenvolvimento das subpopulações TH1 e TH2. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

A principal função efetora de células TH2 é a destruição de microrganismos grandes, como os helmintos, que não são capazes de serem fagocitados e são mais resistentes a atividade microbicida de macrófagos. O mecanismo efetor desempenhado pelas células T CD4 auxiliar da linhagem TH2 ocorre através da secreção de IL-4 e IL-13 que estimulam a produção de anticorpos IgE helminto-específicos que opsonizam os helmintos e através da secreção de IL-5 que ativa os eosinófilos, os quais se ligam aos antígenos recobertos por IgE por meio dos receptores Fc específicos para a cadeia pesada ε. Os eosinófilos ativados liberam proteínas líticas capazes de destruir até o firme tegumento dos helmintos (Figura 1.10). Os mastócitos também expressam receptores Fc-ε e reagem aos antígenos associados a IgE mediante degranulação, liberando aminas vasoativas e citocinas que induzem a inflamação local.

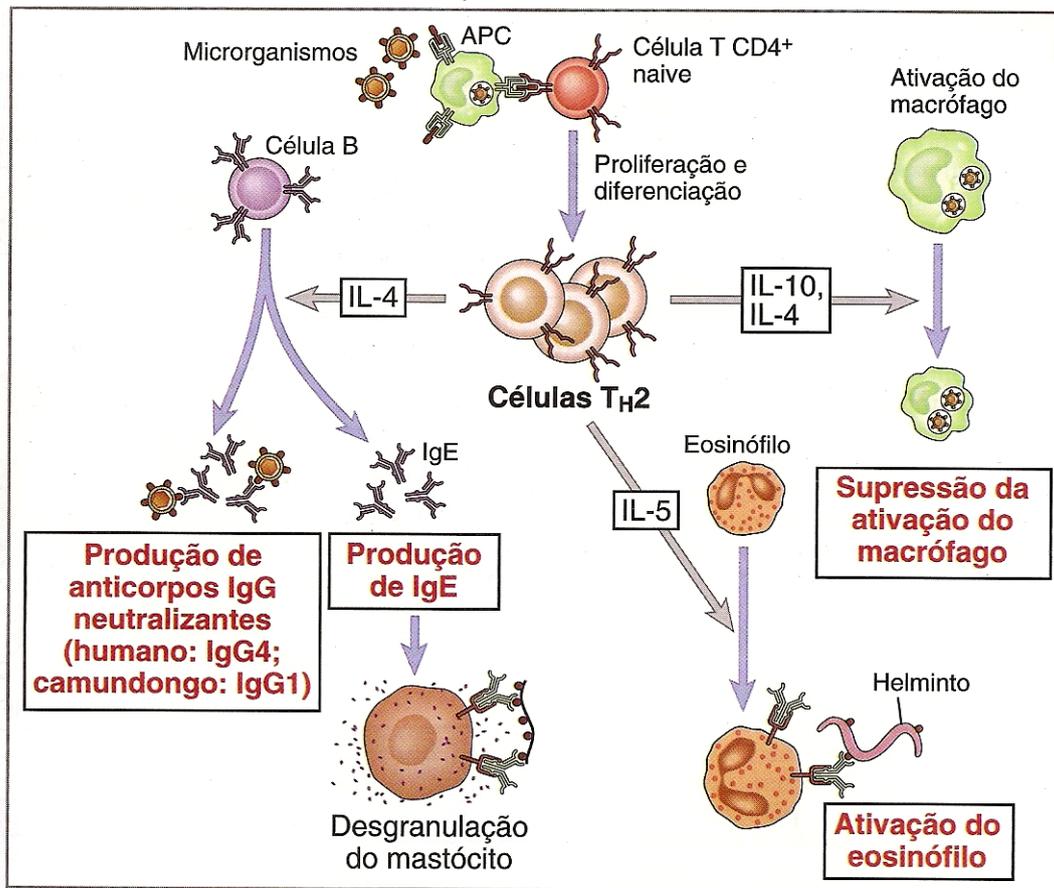


Figura 1.10: Funções efetoras das células TH2. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As CTLs se diferenciam de células T CD8 *naíve* após o reconhecimento antigênico, sinais co-estimulatórios e mediadores produzidos por células T CD4+ *helper*. A resposta funcional de CTLs envolve mecanismos de eliminação da infecção através da destruição da célula alvo via apoptose e indução da atividade microbicida em APCs através da estimulação com IFN- γ . A perforina é uma proteína de reação catalítica presente nos grânulos de CTLs e células NK, após ser secretada a perforina entra em contato com o cálcio extracelular e polimeriza-se na bicamada lipídica da membrana citoplasmática da célula alvo formando um canal aquoso, por este entram enzimas do grânulo, as granzimas, que são serina proteases que ativam caspases (Figura 1.11A), as quais clivam vários substratos e induzem apoptose da célula alvo. Uma outra via de morte por apoptose promovida por CTLs ocorre através da interação de uma molécula de membrana, o ligante de Fas (FasL) que se liga ao Fas da célula alvo e ativa uma família de proteases denominada caspases (Figura 1.11B). Em geral a atividade das caspases é relacionada a morte da célula alvo pelo fato de sua ação não ser dirigida, pois seu mecanismo de ação envolve a clivagem de muitos substratos, incluindo nucleoproteínas, e ativam enzimas que

degradam DNA sem distinção entre proteínas do hospedeiro (célula-alvo) e proteínas microbianas.

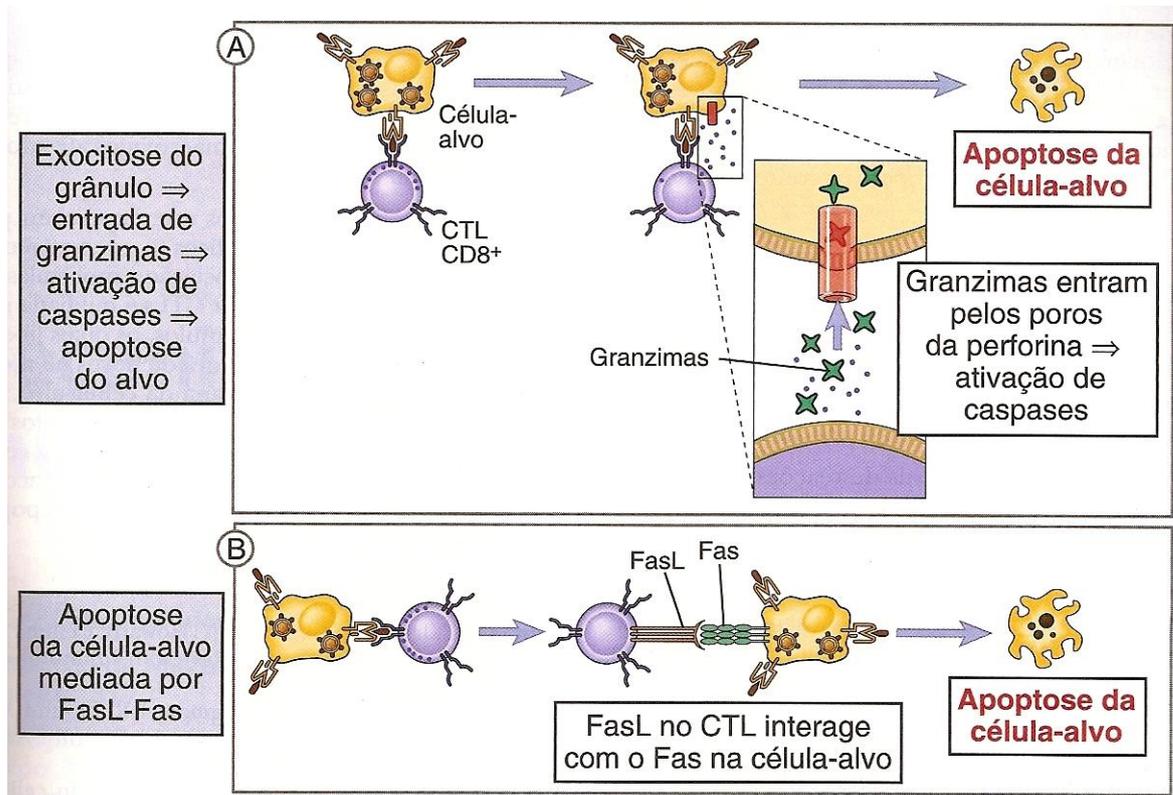


Figura 1.11: Mecanismos da lise das células-alvo mediados por CTL. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As CTLs são uma importante fonte de IFN- γ em resposta a agentes virais e parasitos intracelulares em geral, o IFN- γ age em APCs como os macrófagos e nestes induzem mecanismos microbicidas tais como o aumento de enzimas lisossomais, a liberação de intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico, além de estimular a secreção de citocinas, quimiocinas, aumento da ubiquitinação, expressão de MHC e moléculas co-estimuladoras pelos macrófagos ativados (Figura 1.12).

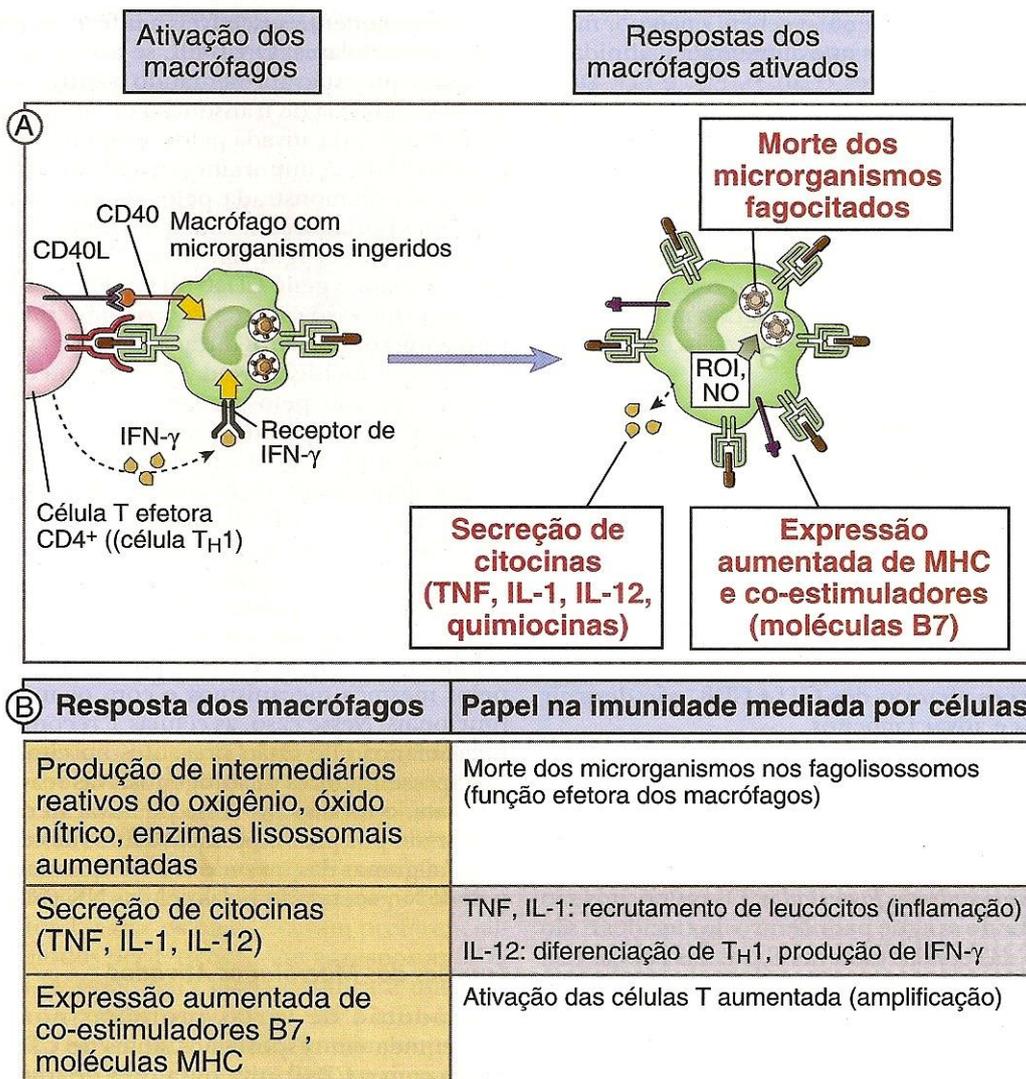


Figura 1.12: Ativação e função de macrófagos ativados pela imunidade mediada por células. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

1.5 Produção de Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos, de maneira geral, são produzidos no organismo em resposta a um determinado antígeno. Assim, são produzidos diversos clones de células B, que se diferenciam em plasmócitos e que expressam e secretam vários anticorpos, cada um com uma especificidade diferente e capaz de reagir a um determinado epítipo antigênico contido no antígeno. Estes são denominados anticorpos policlonais. Já os anticorpos que são produzidos a partir de um único clone como, por exemplo, em um tumor de plasmócitos (mieloma), são todos iguais entre si e são chamados de anticorpos monoclonais, que se ligam somente a um determinante antigênico específico.

A utilização de anticorpos na terapia de doenças e na pesquisa foi revolucionada com a descoberta, em 1975, dos anticorpos monoclonais, por Köhler e Milstein, que

descreveram a técnica de produção dos anticorpos monoclonais através da fusão de células e carcinoma e linfócitos B. Esta descoberta lhes concedeu o prêmio Nobel, juntamente com Niels K. Jerne, em 1984, pelas teorias sobre a especificidade no desenvolvimento e controle do sistema imunológico, e a descoberta do princípio para a produção de anticorpos monoclonais. Esta técnica, denominada hibridoma, consiste na produção de anticorpos que reconhece apenas um epítipo antigênico e, por isso, chamado anticorpo monoclonal, que é produzido e secretado por um único clone de linfócito B. Para a produção destes anticorpos comercialmente, utilizam-se células B de camundongos estimulados com um antígeno de interesse. Os anticorpos formados são chamados murinos, devido à sua origem em camundongos. Estes anticorpos quando usados continuamente em terapias para humanos, podem gerar uma reação imune contra o próprio anticorpo. Em função desta problemática, técnicas modernas de engenharia genética foram desenvolvidas, as quais permitem a humanização destes anticorpos, isto é, que os genes responsáveis por estas proteínas sejam modificados de forma a evitar essa reação imunológica no organismo humano. Assim são gerados os chamados anticorpos monoclonais humanizados. O processo de humanização não deve alterar a afinidade do anticorpo com o respectivo antígeno, mas sim sua porção isotípica, possibilitando, assim, o seu emprego continuado em procedimentos terapêuticos.

Nos ensaios para a produção destes anticorpos monoclonais, os camundongos estimulados com um antígeno X produzem células B esplênicas, que são retiradas e cultivadas em presença de células de mieloma, em meio HAT, contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (Figura 1.13). Este meio bloqueia as vias normais de biossíntese de nucleotídeos e, desta forma, as células normais utilizam a via alternativa e as células tumorais, que não possuem esta via, morrem. Desta forma, somente as células tumorais fundidas às células B que reagem ao antígeno específico conseguem sobreviver e crescer neste meio de cultura. Os sobrenadantes contendo hibridomas são colhidos e submetidos a ensaios de imunodeteção de anticorpos. As células que reagem ao antígeno X utilizado são clonadas, e estes clones expandidos em escala industrial para produção de anticorpos monoclonais específicos. Estes anticorpos são utilizados na pesquisa básica e em aplicações terapêuticas como a identificação de marcadores fenotípicos únicos para determinados tipos celulares e, também, na definição de moléculas típicas de cada célula; na análise funcional de superfícies celulares e moléculas secretadas. Outras aplicações são em diagnósticos de doenças infecciosas e degenerativas, através da circulação de anticorpos específicos e diagnóstico de tumores, onde anticorpos monoclonais específicos para cada tumor são utilizados para sua detecção.

Desta forma a utilização dos anticorpos monoclonais tem-se mostrado cada vez mais diversificada, evidenciando a grande importância desta descoberta para a ciência de forma geral, lembrando sempre a sua associação com a citometria de fluxo é que permite a visualização do resultado da utilização destes anticorpos monoclonais.

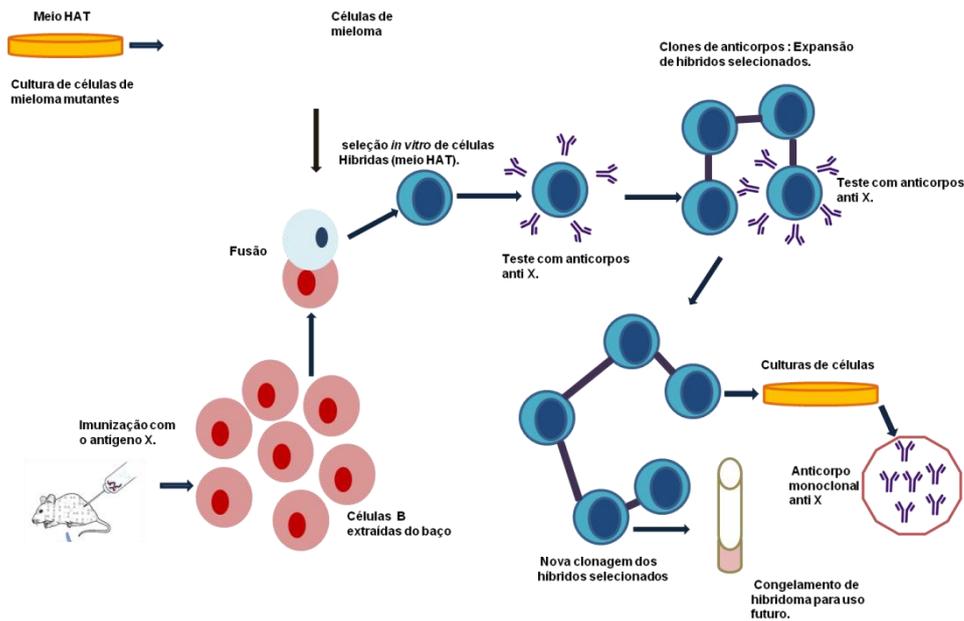


Figura 1.13: Produção de anticorpos monoclonais, a partir de culturas de hibridomas, constituídas por linfócitos B antígeno-específicas e células tumorais. Retirado de Apostila de Curso de Verão do IOC: Citometria de Fluxo: Imunofenotipagem e Avaliação da Produção de Citocinas. Rio de Janeiro. 2012.

CAPÍTULO 2. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Clarissa Cunha, Raquel Ferraz

2.1 A Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo morfológico, fenotípico e funcional de células através da detecção da dispersão da fluorescência emitida por substâncias/moléculas fluorescentes - chamadas fluorocromos. Devido à sua capacidade ímpar de analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula, a Citometria de Fluxo se tornou a técnica de escolha para análises multiparamétricas em células, sendo utilizada principalmente na imunologia, imunogenética, biologia celular, microbiologia, estudos de avaliação funcional e diferenciação de populações celulares; conteúdo de DNA e RNA; atividades enzimáticas; apoptose; produção de íons; citotoxicidade; modulação de receptores; distribuição populacional; produção de citocinas, entre outros.

Uma grande aplicação da Citometria de Fluxo é o sorteamento ou purificação de uma determinada população celular, a partir de uma suspensão heterogênea de células – processo denominado de *cell sorting*. Assim, dois tipos de citômetros de fluxo são produzidos – citômetros de fluxo analisadores (*bench-top analyzers*) e citômetros de fluxo separadores/purificadores de células (*Cell Sorters*).

A expressão de uma molécula ou uma função biológica a ser avaliada é feita através da marcação com anticorpos monoclonais (AcMo) acoplados a fluorocromos; ou da marcação diretamente com uma substância fluorescente. Assim, quando as amostras marcadas são adquiridas no citômetro de fluxo, estes fluorocromos são excitados especificamente por uma fonte luminosa (*laser*), que intercepta cada célula, e então emitem um comprimento de onda (cor) característica de cada fluorocromo, que é detectado por um sensor, chamado de tubo fotomultiplicador (*photomultiplier tubes* - PMTs). Quanto maior o número de sensores em um citômetro, maior o número de cores (e de moléculas de interesse) que se pode avaliar. Estes sensores são capazes de converter a luz captada em sinais eletrônicos, os quais são enviados ao computador, possibilitando assim, através de *software* específico, uma análise multiparamétrica dos resultados. Esta análise é realizada através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respectivas características morfológicas das células, como tamanho e granularidade.

Os citômetros de fluxo são resultado do desenvolvimento de uma variedade de ferramentas e a aplicação de técnicas desenvolvidas na área da computação; da biotecnologia (produção de anticorpos monoclonais e de fluorocromos); da tecnologia dos

raios *laser*; e da eletrônica, possibilitando a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (humano, modelos animais, protozoários, fungos, bactérias). Os equipamentos são compostos por uma ou mais fontes de *laser* (fonte de luz)^a, que excitam os fluorocromos; um sistema contínuo de fluxo hidrodinâmico de solução salina^b que transporta as células da amostra; uma câmara de fluxo (*flow cell*)^c, cuja estrutura força as células a passarem individualmente uma atrás da outra, permitindo que sejam interceptada pelo *laser* no foco hidrodinâmico^d individualmente; um sistema óptico constituído por filtros^e; e fotossensores^f que captam a luz dispersada pelo *laser* e pelo(s) fluorocromo(s), os quais são convertidos em pulsos eletrônicos^g e enviados a um computador^h, onde os resultados são analisados (Figura 2.1).

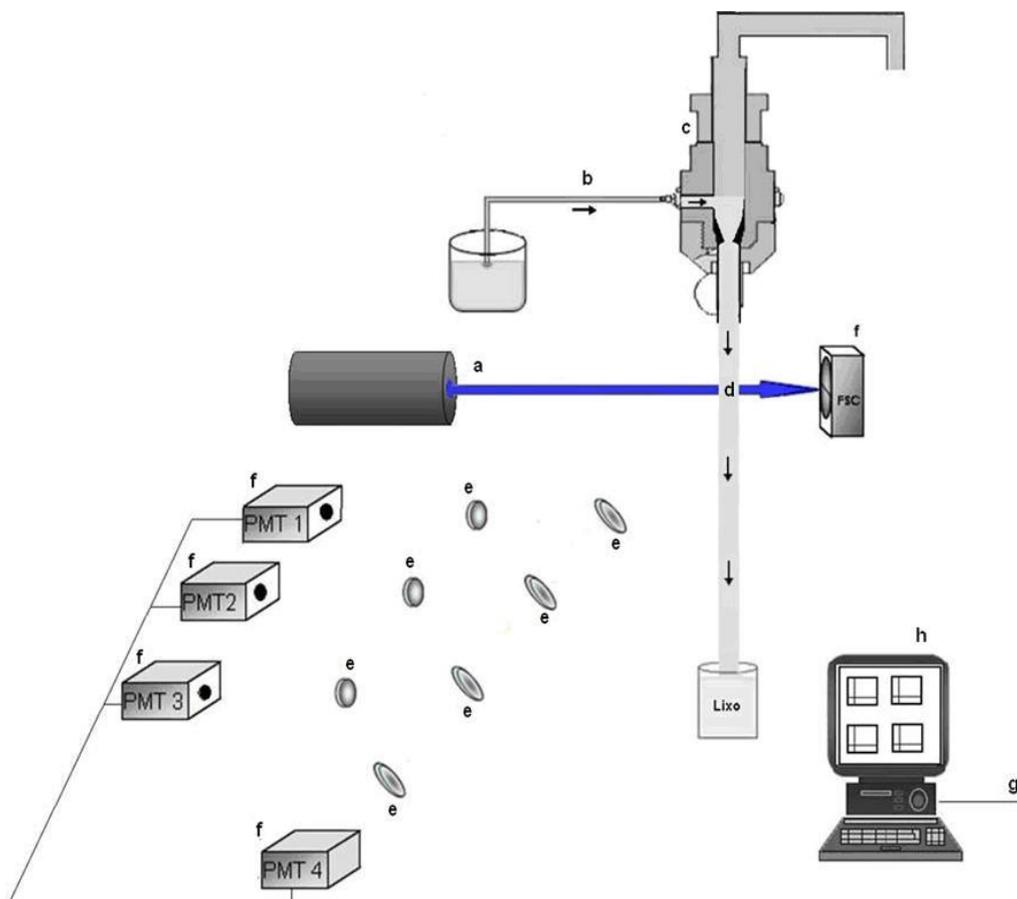


Figura 2.1 Representação gráfica da estrutura de um citômetro de fluxo. (a) *laser* azul (488nm); (b) solução salina, responsável pelo fluxo hidrodinâmico; (c) *flow cell* (câmara de fluxo); (d) foco hidrodinâmico; (e) filtros para captação da luz emitida; (f) fotomultiplicadores; (g) sinais eletrônicos enviados ao (h) computador. Imagem: Raquel Ferraz.

2.2 Fluorocromos e LASERS

A base para os protocolos citofluorimétricos é a identificação de moléculas na superfície ou no interior das células, através da utilização de AcMo conjugados à fluorocromos ou substâncias fluorescentes, que são capazes de emitir cor quando excitados por uma fonte luminosa (*laser*). Os fluorocromos são moléculas fluorescentes, inicialmente em repouso, que emitem uma luz de comprimento de onda (cor) característico quando excitados especificamente por uma determinada fonte luminosa (*laser*) (Figura 2.2). Atualmente, a maioria dos citômetros de fluxo possui um ou mais *lasers* como fonte de luz para mensuração de células e excitação de fluorocromos. Os *lasers* são preferidos por produzirem um feixe de luz monocromático pontual e de alta intensidade. Este é um fator importante uma vez que a luz precisa ser focada de modo a englobar cada célula individualmente e minimizar a probabilidade de haver mais de uma célula passando no feixe de *laser*. Há uma grande variedade de *lasers*, sendo que os mais usados em Citometria de Fluxo são: iônicos refrigerados a ar ou de estado-sólido. O *laser* mais comum e ainda usado como fonte primária em alguns citômetros mais antigos é o *laser* iônico de argônio, refrigerado a ar, que produz uma luz azul de 488 nm. Outros *lasers* iônicos incluem o Hélio-Cádmio (He-Cd), que pode emitir na luz azul (441,6 nm) e na UV (325 nm); Argônio (verde), que emite em 514 nm; Hélio-Neônio (He-Ne), que emite em vermelho (633 nm), em verde (543 nm), em amarelo (594 nm) e em laranja-vermelho (612 nm). Atualmente, os *lasers* iônicos estão sendo substituídos por *lasers* de estado-sólido (solid-state laser) com emissão de luz em comprimentos de onda variados, apresentando um leque para a excitação de todos os fluorocromos disponíveis no mercado.

A maioria dos fluorocromos é excitada pelo *laser* azul (Argônio, comprimento de onda de 488 nm), presente em **todos** os citômetros de fluxo. Outros fluorocromos são excitados por *laser* com outro comprimento de onda. Por este motivo, alguns citômetros são configurados com mais de um *laser*, p.ex.:

- *Laser* Ultravioleta – 355 nm
- *Laser* Violeta – 405 nm
- *Laser* Amarelo – 560nm
- *Laser* Laranja – 592nm
- *Laser* Vermelho – 635 ou 640 nm

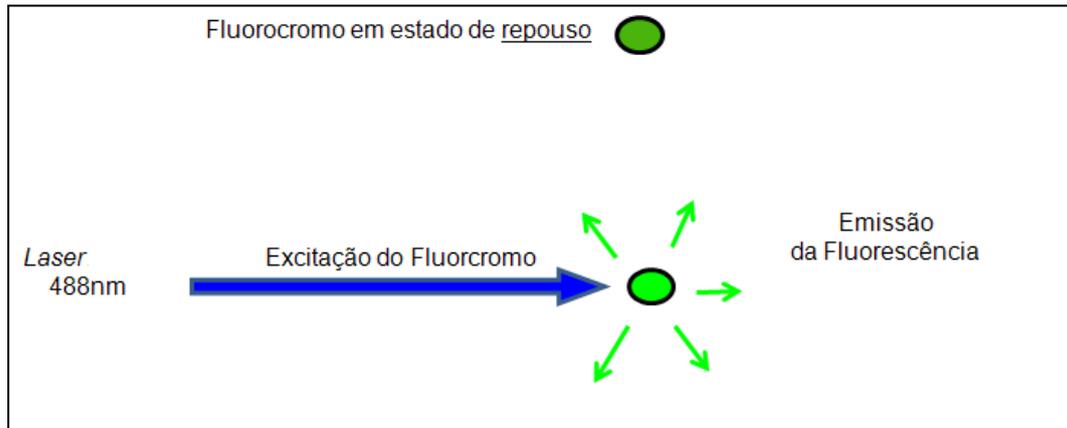


Figura 2.2 Fluorocromo em estado de repouso e emitindo fluorescência após ser excitado pela luz do *laser*.
Imagem: Raquel Ferraz.

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. O *cluster* (agrupamento) de diferenciação, abreviado como CD, é uma nomenclatura mundialmente utilizada para a identificação de moléculas na membrana ou no interior das células, sendo expressas em diversos tipos e funções celulares. Nos leucócitos, por exemplo, é responsável pela definição de uma determinada população ou subpopulação, qual o estágio de diferenciação ela se encontra e a função que ela executa. Por exemplo, a expressão de CD3 caracteriza a célula como linfócito T. A expressão concomitante de CD3 e CD4 caracteriza a subpopulação de linfócito T *helper* (linfócito T CD4⁺). A expressão concomitante de CD3 e CD8 caracteriza outra subpopulação linfocítica: os linfócitos T supressores ou citotóxicos (linfócito T CD8⁺). A expressão de CD19 caracteriza os linfócitos B. Expressão de CD14 e CD16 pode ser observada em monócitos, macrófagos e células dendríticas; células *Natural Killer* (NK) expressam CD56; expressão de CD69 representa característica funcional de ativação; e assim a combinação de expressão dos CDs identificam diversas populações e estados funcionais (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Exemplos de algumas moléculas de CDs e suas respectivas características.

CD	Principais células que expressam	Nomes comuns/Funções conhecidas ou propostas
CD3	Linfócitos T, tímocitos	Associada ao TCR. Requerida para a expressão celular e transdução do sinal pelo TCR
CD4	Linfócitos T restritos ao MHC da classe II, subconjunto de tímocitos, monócitos e macrófagos	Correceptor para a molécula de MHC de classe II; desenvolvimento dos linfócitos; receptor primário para o HIV
CD8	Linfócitos T restritos ao MHC da classe I, subconjunto de tímocitos	Correceptor para a molécula de MHC de classe I; desenvolvimento dos linfócitos
CD11a	Leucócitos	LFA-1/Adesão celular. Liga-se a ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) e ICAM-3 (CD50)
CD11b	Granulócitos, monócitos, macrófagos, células NK	Adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio (ligação a CD54) e proteínas da matriz extracelular; fagocitose de partículas cobertas por iC3b
CD11c	Monócitos, macrófagos, células NK	Funções similares ao CD11b; principal integrina CD11CD18 nos macrófagos
CD14	Granulócitos, monócitos, macrófagos, forma solúvel no soro	Liga-se ao complexo de LPS e a proteína de ligação ao LPS (LBP); necessária para a ativação de macrófagos induzida por LPS
CD16	Células NK, macrófagos e neutrófilos	FcγRIIIB/Adesão celular induzida por imunocomplexos; citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CD18	Leucócitos	Associado com CD11a, b, c
CD19	Maioria dos linfócitos B	Ativação do linfócito B, forma um complexo com CD21 e CD81, transmitindo sinais que sinergizam com os sinais do complexo do BCR.
CD25	Linfócitos T e B ativados, macrófagos ativados	IL-2Rα/Cadeia α do receptor de IL-2
CD27	Maioria dos linfócitos T, células NK, alguns linfócitos B, tímocitos medulares	Ligação a CD70; medeia sinais coestimulatórios no processo de ativação de linfócitos T e B
CD28	Subpopulação de linfócitos T	Ativação de células T naive; liga-se a CD80 e CD86
CD34	Precursoras de células hematopoiéticas, células endoteliais em vênulas altas	Adesão célula-célula; ligação ao CD62L (L-selectina)
CD44	Leucócitos, eritrócitos	Liga-se ao ácido hialurônico, medeia adesão de leucócitos a células endoteliais
CD45	Células hematopoiéticas	Tirosina fosfatase importante no processo de sinalização mediada pelo receptor de antígenos de linfócitos T e B
CD45RA	Linfócitos T naive, linfócitos B, monócitos	Isoforma de CD45.
CD45RO	Linfócitos T de memória, subconjunto de linfócitos B, monócitos e macrófagos	Isoforma de CD45.
CD55	Células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas	DAF/Regulação da ativação do complemento; liga-se a C3b, C4b
CD56	Células NK, subconjunto de linfócitos T e B	Adesão homotípica
CD59	Ampla expressão	Adesão leucocitária; coestimulação de linfócitos T; liga-se a CD2
CD62L	Linfócitos B e T, monócitos, granulócitos, algumas células NK	L-selectina/Molécula de adesão leucocitária; liga CD34; medeia interações com endotélio no processo de rolamento de leucócitos
CD69	Linfócitos T e B ativados, células NK e macrófagos ativados	Sinalização celular em diferentes tipos de células
CD70	Linfócitos T e B ativados, macrófagos	Liga-se a CD27; tem papel na coestimulação para ativação de linfócitos T e B
CD80	Células dentríticas, linfócitos B ativados e macrófagos	B7-1/Liga-se a CD28 e CD152 (CTLA-4); molécula coestimuladora para ativação de linfócitos T

Estes CDs foram definidos através da criação de anticorpos monoclonais específicos para cada molécula. Estes AcMo, uma vez acoplados a fluorocromos e avaliados pelo citômetro de fluxo, permitem caracterizar e definir os estados funcionais de cada população celular e microorganismos. Por exemplo, o receptor de superfície CD3 é expresso constitutivamente na membrana de todos os linfócitos T. Ao utilizarmos um anticorpo monoclonal anti-CD3 acoplado a um fluorocromo, como, por exemplo, o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (488 nm de excitação - *laser* azul; e 525 nm de emissão - verde), este se ligará a todos os receptores CD3 na membrana dos linfócitos T da amostra avaliada (Figura 2.3); e, ao ser interceptado pelo *laser*, o fluorocromo (FITC) acoplado a este AcMo será excitado e a emissão da sua fluorescência (525nm – cor verde) será captada por um PMT determinado de acordo com o posicionamento de um filtro que capte o comprimento de onda de interesse, enviando a informação ao computador para análise.

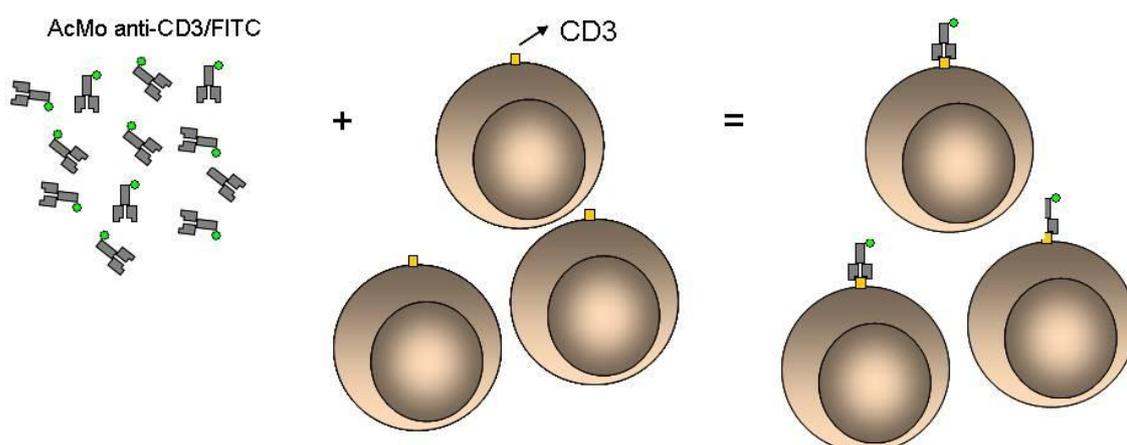


Figura 2.3 Esquema representativo da marcação de linfócitos T com AcMo (anticorpo monoclonal) anti-CD3 acoplado com o fluorocromo FITC. Imagem: Raquel Ferraz.

Vários AcMo acoplados a diversos fluorocromos estão comercialmente disponíveis por empresas especializadas como, a Beckman Coulter, Becton & Dickinson (BD), entre outras. A combinação AcMo-fluorocromo deve ser escolhida de acordo com as moléculas que se deseja avaliar e a cor que o fluorocromo vai emitir. É importante ressaltar que para uma escolha correta dos fluorocromos é fundamental inicialmente conhecer a configuração do citômetro a ser utilizado, em relação aos tipos de *lasers*, filtros e número de PMTs. Os fluorocromos utilizados na citometria de fluxo podem ser simples ou compostos (*Tandem Dyes*) e alguns destes estão descritos na Tabela 2.2 com seus respectivos, pico de excitação, pico máximo de emissão e *laser* de excitação.

Tabela 2.2 Alguns fluorocromos disponíveis no mercado, seus respectivos picos de emissão; e *laser* de excitação.

Format	(Emission max)	Laser
Brilliant Violet 421™	(421 nm)	405nm Violet
Pacific Blue™	(452 nm)	
Brilliant Violet 510™	(510 nm)	
Brilliant Violet 570™	(570 nm)	
Brilliant Violet 605™	(605 nm)	
Brilliant Violet 650™	(650 nm)	
Brilliant Violet 711™	(711 nm)	
Brilliant Violet 785™	(785 nm)	
Alexa Fluor® 488	(519 nm)	488nm Blue
FITC	(519 nm)	
PerCP	(678 nm)	
PerCP/Cy5.5	(695 nm)	
PE	(578 nm)	532nm Green
PE/Dazzle™ 594	(610 nm)	
PE/Cy5	(667 nm)	561nm Yellow-Green
PE/Cy7	(785 nm)	
APC	(660 nm)	633nm Red
Alexa Fluor® 647	(668 nm)	
Alexa Fluor® 700	(719 nm)	
APC/Cy7	(785 nm)	
APC/Fire™ 750	(787 nm)	

<http://www.biologend.com/>

Conhecendo as propriedades de excitação e de emissão de cada fluorocromo, o comprimento de onda de cada *laser* e as características óticas (filtros) dos citômetros, 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: AcMos anti-CD4/FITC, anti-CD8/PE, anti-CD3/PerCP em um citômetro que tenha 3 PMTs capazes de captar (dependendo da propriedade dos filtros) comprimentos de onda de 525 nm, 578 nm, 667 nm, respectivamente.

IMPORTANTE: No caso da marcação com mais de um anticorpo monoclonal, deve-se tomar cuidado para não escolher fluorocromos cujos comprimentos de onda se sobreponham, como FITC e Alexa Fluor® 488.

2.3 Sistema Ótico

Para que as informações de emissão de luz, que neste caso representam uma determinada propriedade biológica da célula, sejam determinadas é preciso que esta luz atinja um PMT. Para isto, é necessário que a luz emitida pelo fluorocromo e a própria luz refletada pelo *laser* ao interceptar a célula passem por filtros com propriedades específicas de permitir a passagem de determinado comprimento de onda (cor) e de refletir outros, direcionando assim cada comprimento de onda para um dos PMTs. Sendo assim, o sistema ótico, composto por filtros e espelhos, tem a função de direcionar a luz (fótons). O grande número de fluorocromos disponíveis no mercado levou ao aumento do número de filtros e PMTs, possibilitando que um maior número de parâmetros seja avaliado na mesma amostra.

A propriedade dos filtros óticos em filtrar um determinado comprimento de onda permite que fluorescências de cores diferentes sejam direcionadas para um PMT. A disposição dos diferentes tipos de filtros (Figura 2.4) determina a configuração ótica do equipamento.

- Filtros Dicroicos: são 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). Isto é, um filtro dicroico *long pass* 525, reflete o comprimento de onda de 525nm (verde) (\pm variação em nm) e deixa passar (atravessar o filtro) os comprimentos de onda maiores que 525nm (amarelo, laranja, vermelho, roxo, etc).

- 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 filters*.

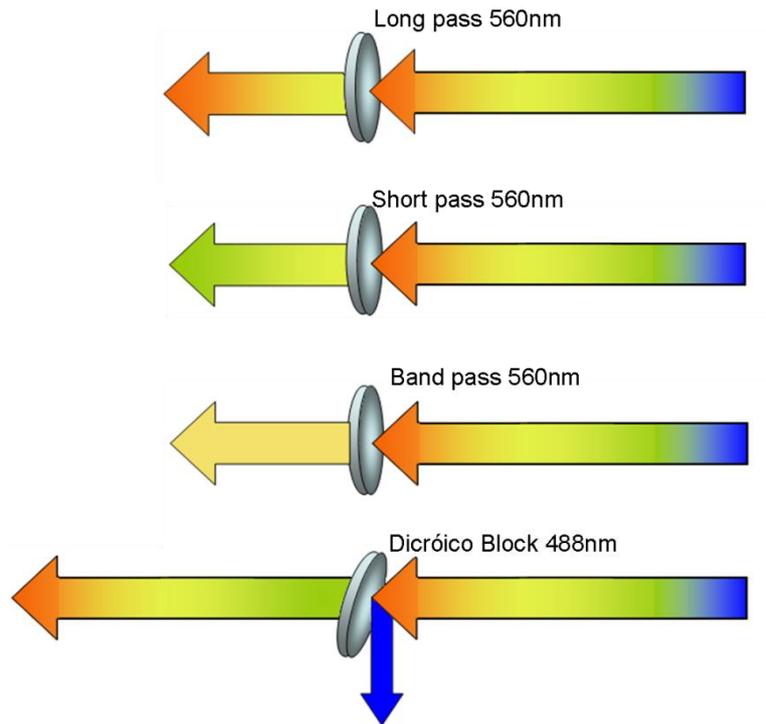


Figura 2.4 Tipos de filtros utilizados nos citômetros de fluxo. Filtros dicróicos - *Long pass*; *short pass*; de interferência (*band pass*); e filtro de bloqueio (*block*). Imagem: Raquel Ferraz.

2.4 Sistema Eletrônico

O sistema eletrônico de um citômetro de fluxo tem a função de monitorar e controlar o funcionamento do equipamento, detectar cada evento à medida que cada célula é interceptada pelo *laser*; converter em pulsos elétricos os fótons captados pelos PMTs, os quais são enviados para o computador. O pulso elétrico é proporcional às características de tamanho, granularidade e fluorescência de cada célula interceptada pelo *laser*, sendo convertidos digitalmente e representados em *software* específico. A medição de cada fotossensor é chamada de parâmetro, como *forward scatter*, *side scatter* e fluorescências.

2.5 Programas Computacionais - Softwares

Em segundos, milhares de células passam uma a uma pelo *laser* e toda a informação quanto à refração desta luz e à intensidade de fluorescência dos fluorocromos é detectada e convertida em sinal eletrônico. As informações morfológicas, como tamanho e granularidade, fenotípicas e ou funcionais são obtidas simultaneamente à aquisição, através de *software* específico, no qual é possível montar histogramas e gráficos necessários de acordo com a análise que se deseja realizar. É importante destacar que cada citômetro de fluxo possui um *software* específico para aquisição das amostras, e que além disto existem também *softwares* específicos para análises, dos quais destacamos: KALUZA e Summit (Beckman Coulter), FlowJo (FlowJo, LLC) e DIVA (BD Biosciences), que podem ser utilizados em computadores pessoais.

Antes de começar a aquisição de amostras, deve-se conectar o citômetro ao computador que contém o *software* e nele montar um protocolo com gráficos mono e biparamétricos específicos para análise dos diferentes parâmetros que se deseja avaliar, como tamanho, granularidade e fluorescência(s).

Toda análise se baseia, primeiro, na identificação das populações quanto às propriedades físicas, isto é, tamanho e granularidade. Deve-se então montar um gráfico biparamétrico, selecionando para o eixo x e y, a fluorescência correspondente ao fotomultiplicador que detecta o FSC e o SSC, em escala linear (Figura 2.5).

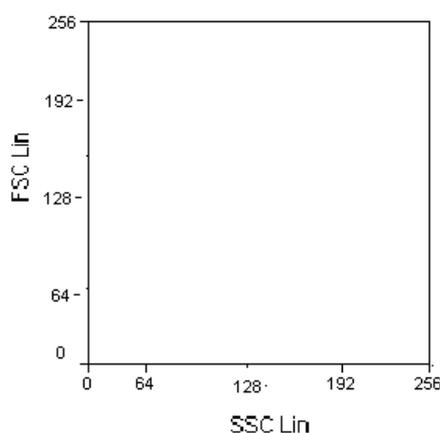


Figura 2.5 Dot plot de tamanho vs. granularidade. FSC – *forward scatter* (tamanho); SSC – *side scatter* (granularidade); Lin – escala linear.

A seguir, devem-se montar os gráficos para a avaliação de intensidade de fluorescência dos respectivos fluorocromos utilizados na amostra. Esta análise pode ser realizada através de gráficos monoparamétricos (histogramas), nos quais se avalia a intensidade de uma única fluorescência (Figura 2.6); ou biparamétricos, onde se avalia a intensidade de duas fluorescências. Estes gráficos biparamétricos, chamados *dot plots*, podem ser divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4), geralmente utilizando a escala logarítmica. A intensidade de fluorescência representada no Q1 é referente às 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 2.7).

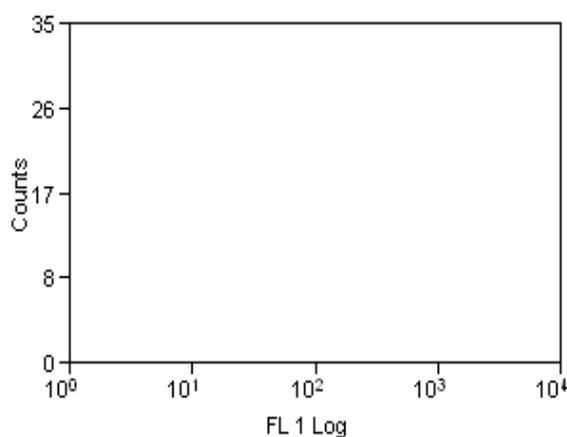


Figura 2.6 Histograma. Gráfico monoparamétrico para a avaliação de uma única fluorescência (vs número de células). *Counts* – número de células; FL1 – fluorescência 1; Log – escala logarítmica.

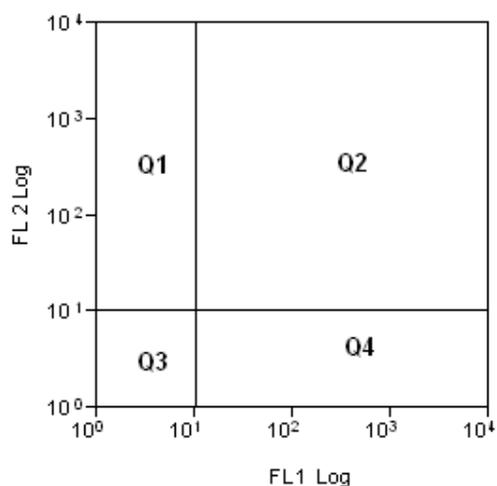


Figura 2.7 *Dot plot*. Gráfico biparamétrico: fluorescência 1 (FL1) vs. fluorescência 2 (FL2). Q – quadrante; Log - escala logarítmica.

É possível montar um protocolo com a variedade e combinação 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. As análises podem ser feitas através do percentual de células e/ou da média de intensidade de fluorescência.

Os *softwares* permitem a seleção de regiões, denominadas *gates*, para delimitar as populações celulares que se deseja avaliar (Figura 2.8). Pode-se então criar gráficos avaliando uma população específica, delimitada pelo *gate*. Assim, é possível determinar o percentual de células em cada quadrante ou *gate*, 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.

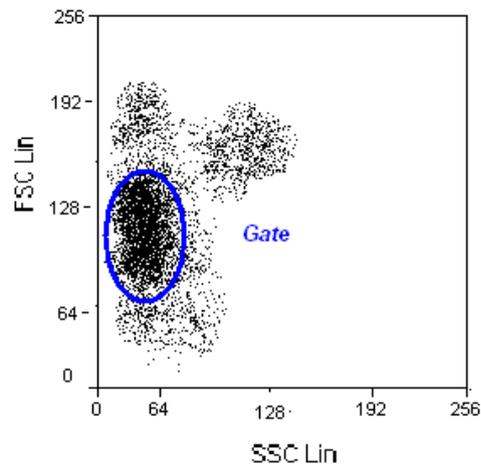


Figura 2.8 Gate (região em azul) nos linfócitos, selecionando-os de acordo com características de tamanho e granularidade.

2.6 Princípios de Funcionamento

Para utilizar a citometria de fluxo como ferramenta de estudo, as amostras devem estar em uma suspensão e dois protocolos principais devem ser seguidos: um protocolo de obtenção de células (por exemplo: gradiente de sedimentação – Ficoll Hypaque; lise de hemácias – Optylise; técnicas de maceração de tecido); e outro protocolo de marcação citofluorimétrica. Seja esta amostra de sangue periférico, de cultura celular, de medula óssea, de tecido, ou de líquido, as células devem ser dissociadas de forma a evitar a formação de grumos na suspensão. Para o protocolo de marcação deve-se, primeiramente, escolher a(s) partícula(s) e ou molécula(s) celular(es) de interesse que irão receber a marcação específica com anticorpos monoclonais (AcMo) e/ou com algum fluorocromo. Por exemplo, se em uma amostra de sangue periférico, submetida primeiramente à lise de hemácias ou ao gradiente de sedimentação, se deseja avaliar o percentual de monócitos e de linfócitos T CD8⁺, deve-se utilizar uma combinação de AcMo anti- CD14 (que se liga à monócitos), AcMo anti-CD3 (específico para linfócitos T) e AcMo anti-CD8 (que se liga aos linfócitos T CD8⁺). Cada um destes três tipos de AcMo deve estar acoplado a um fluorocromo de cor diferente, como por exemplo o FITC, o PE e o PE-Cy5. Para a escolha dos fluorocromos é necessário saber quais são as cores que podem ser 'lidas' no citômetro a ser utilizado, isto é, qual o(s) *laser*(s) que o equipamento possui e qual a configuração ótica do citômetro.

Após a preparação da amostra (marcação das células com anticorpos monoclonais), o tubo contendo a suspensão de células¹ é acoplado ao citômetro de fluxo e as células são,

aos poucos, aspiradas por um sistema de pressão e levadas à câmara de fluxo². Além de ser preenchida pela solução salina (*sheat fluid*), esta câmara recebe então a suspensão de células³, as quais, por conta do formato cônico da câmara, seguem uma atrás da outra até o foco hidrodinâmico⁴, onde cada uma delas é interceptada pelo *laser*. Este encontro resulta na refração da luz do *laser*⁵ e na emissão de fluorescência(s)⁶ de acordo com o(s) fluorocromo(s) acoplado(s) aos AcMo, ligado em cada célula. A emissão de fluorescências de diferentes comprimentos de onda (cores) é direcionada para um PMT de acordo com uma combinação e disposição de filtros⁷. Após a captação das fluorescências, as mesmas são convertidas em sinal eletrônico, e a informação obtida de cada célula que é interceptada pelo *laser* é representada, através de *software* específico, em histogramas e/ou gráficos de pontos⁸ (*dot plot*) (Figura 2.9).

Todas as células que passam na frente do *laser* geram uma informação eletrônica, que é avaliada graficamente. Sendo assim, as informações a respeito das células que são marcadas com os AcMo, e também daquelas que não foram marcadas, ou seja, que não possuem afinidade (receptor) para os AcMo utilizados, são analisadas através de gráficos monoparamétricos (Figura 2.10a) e/ou biparamétricos, os quais são divididos em quatro quadrantes (Figura 2.10b).

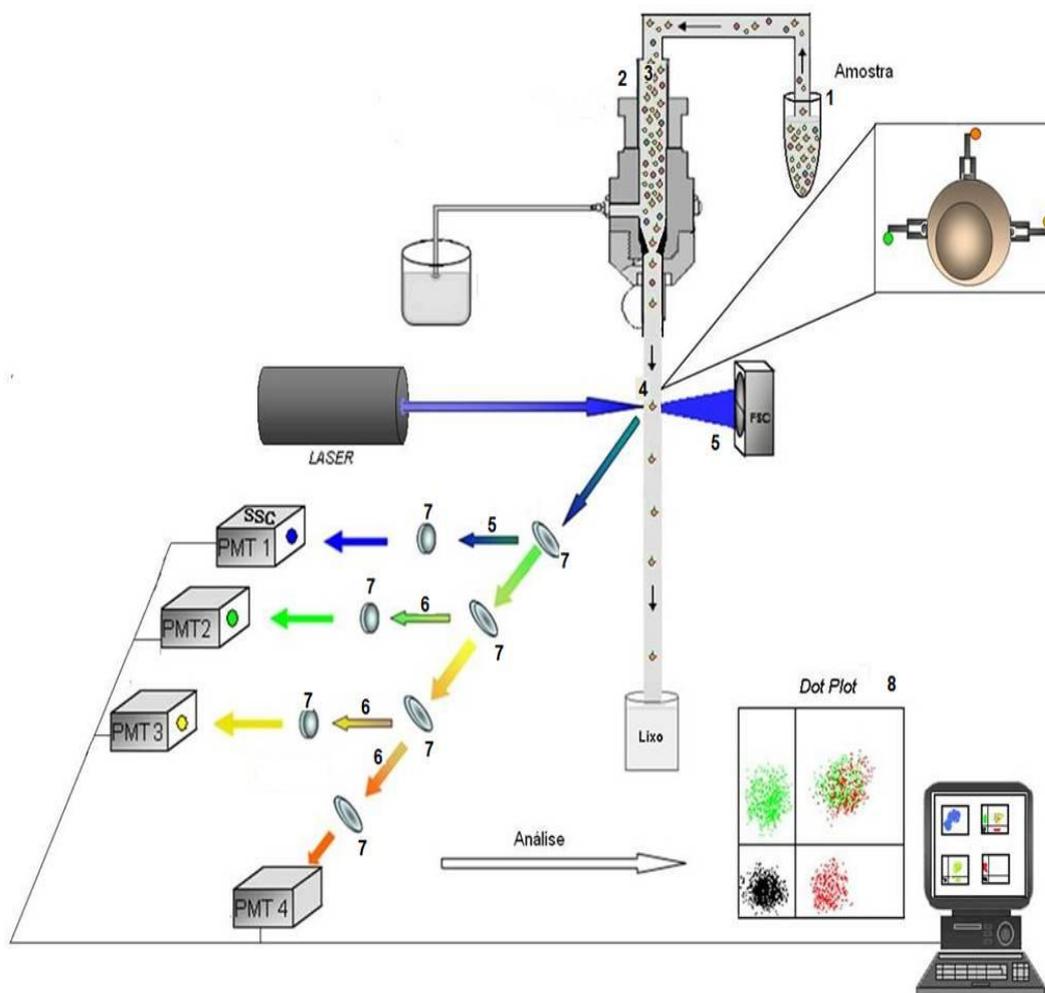


Figura 2.9 Esquema representativo do funcionamento do citômetro de fluxo. *Flow cell* – câmara de fluxo; *Sheat* – solução salina; FSC – *forward scatter* (dispersão frontal); SSC – *side scatter* (dispersão lateral); PMT – *photomultiplier* (fotomultiplicador); *dot plot* – gráfico de pontos. Imagem: Raquel Ferraz.

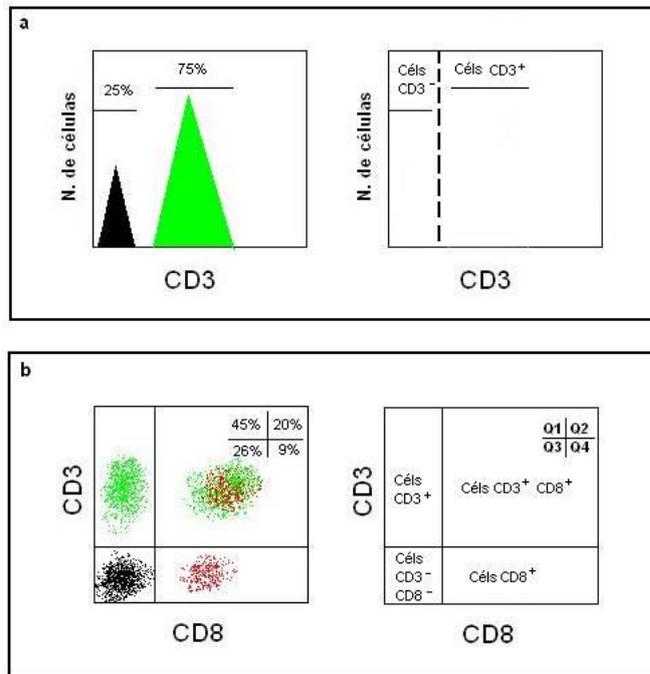


Figura 2.10 Gráficos de análise de resultados obtidos por citometria de fluxo. **(a)** gráfico monoparamétrico (CD3) com respectivo pico das células negativas para a marcação com os AcMo anti-CD3 (25%) e pico das células positivas para esta marcação (75% - linfócitos T); **(b)** gráfico biparamétrico (CD3 x CD8) dividido em quatro quadrantes (Q), nos quais se avalia o percentual das células positivas somente para o CD3 (Q1), células negativas para a marcação de CD3 e de CD8 (Q2 - duplo-negativas), células positivas para a marcação de CD3 e de CD8 (Q3 – duplo positivas), e células positivas somente para o CD8 (Q4). Imagem: Raquel Ferraz.

Além de excitar os fluorocromos, a luz do *laser* azul, 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* - FSC) permite analisar o tamanho celular. Quanto maior for a partícula, maior será o ângulo de incidência da luz do *laser*, dispersada pela partícula, que atinge o fotossensor (Figura 2.11). Simultaneamente, a luz do *laser* refratada devido à granularidade celular é captada por lentes que as direcionam lateralmente (90⁰) para um PMT, assim como a luz emitida pelos fluorocromos, de acordo com a configuração ótica (filtros) do citômetro (Figura 2.12).

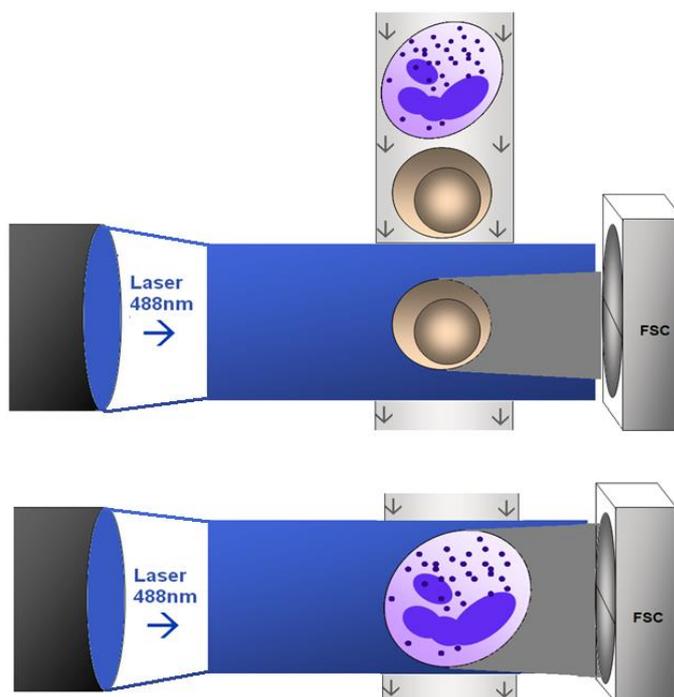


Figura 2.11 Avaliação do tamanho celular de acordo com a luz do *laser* refratada. Luz do *laser* interceptando as células que passam através da solução salina formando um ângulo de refração que é detectado pelo fotossensor. FSC - *forward scatter*. Imagem: Raquel Ferraz.

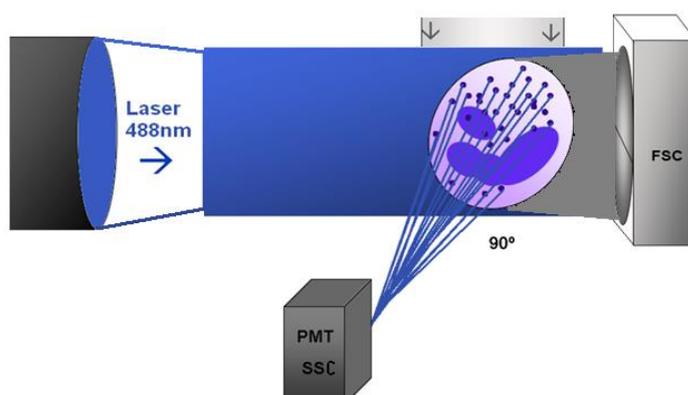


Figura 2.12 Avaliação da granularidade celular de acordo com a luz do *laser* refratada a 90°. Luz do *laser* sendo refratada de acordo com a granularidade celular e sendo direcionada através de espelhos e filtros para o fotossensor. SSC - *side scatter*). Imagem: Ferraz, R.

Assim, um filtro dicróico *long pass* 488nm deixa passar todos os comprimentos de onda acima de 488nm (cores emitidas pelos fluorocromos excitados pelo *laser* 488) e reflete a luz do *laser* azul refratada pela célula que é então direcionada para um filtro de interferência (*band pass*), o qual, por sua vez, deixa passar o comprimento de onda de 488nm até o PMT. Finalmente chegando ao PMT, a luz detectada determina o que chamamos de *side scatter* (SSC) ou granularidade celular. Ao mesmo tempo, as fluorescências que passam pelo filtro dicróico *long pass* 488nm são refletidas por outro(s) filtro(s) dicróico(s) *long pass* de determinado comprimento de onda, e então chegam ao PMT após passar por um filtro de interferência *band pass* específico para cada fluorescência (Figura 2.13).

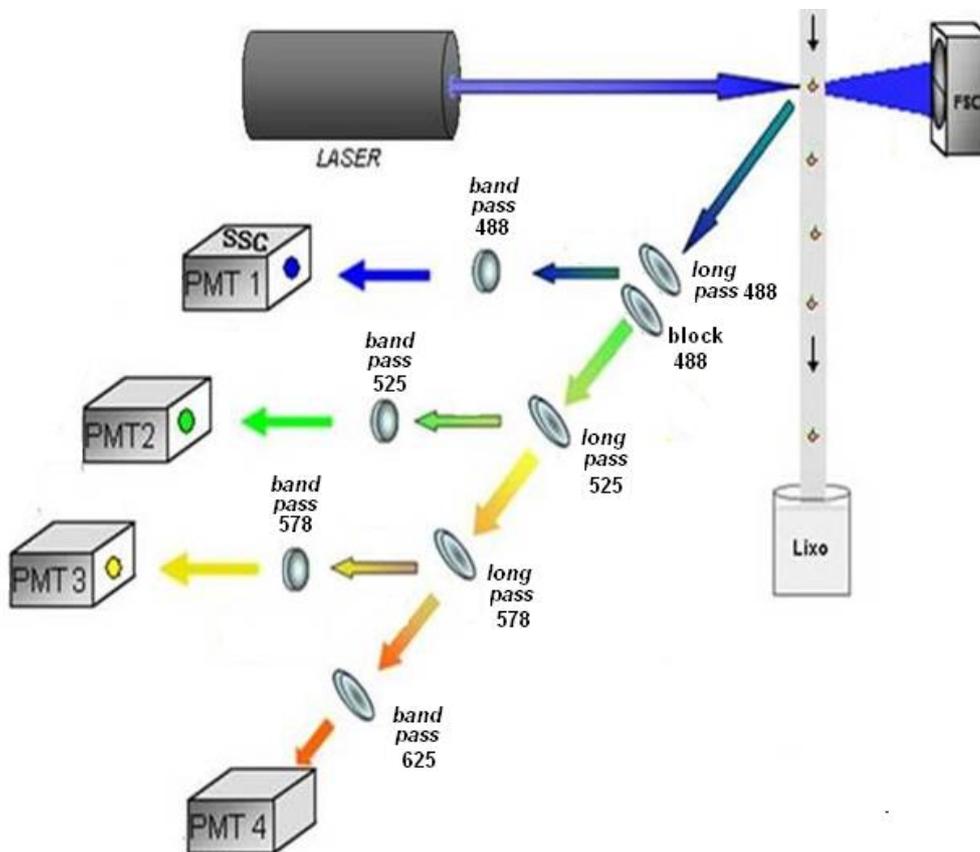


Figura 2.13 Esquema representativo do caminho de cada fluorescência, direcionada pelos filtros até um PMT (fotossensor). Imagem: Raquel Ferraz.

2.7 Compensação de cores

Apesar dos fluorocromos apresentarem um pico máximo de emissão, o espectro de emissão de fluorescência é amplo e apresenta variação. A consequência disto é a sobreposição das cores (Figura 2.14A), sendo necessário subtrair, eletronicamente, a fração da fluorescência (por exemplo, PE) que esteja interferindo na outra (ex: FITC) (Figura 2.14B e Figura 2.14D), o que é chamado de compensação de cores (Figura 2.14C e Figura 2.14E).

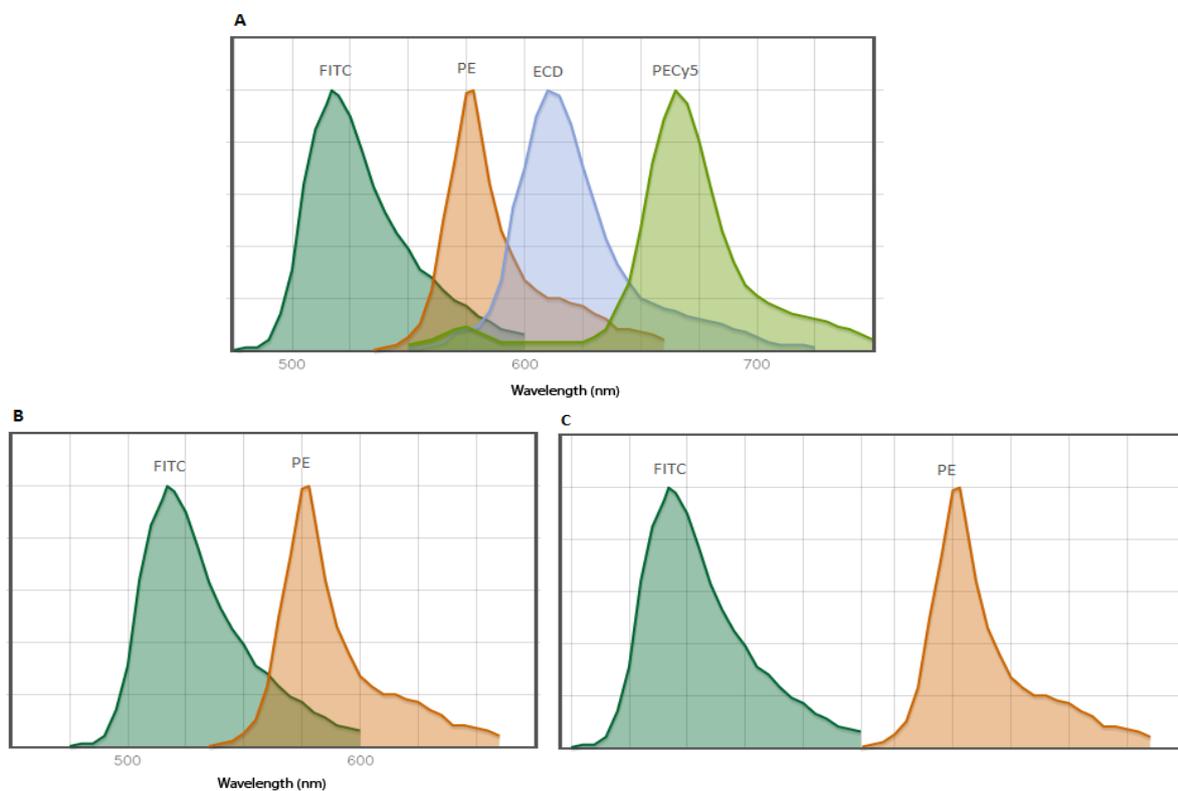


Figura 2.14 Compensação de cores. (A) Espectro de emissão dos fluorocromos FITC, PE, ECD e PC5 e sobreposição do sinal de fluorescência entre os fluorocromos; (B) Sobreposição do sinal de fluorescência do FITC e do PE e (C) sinais compensados.

Para realizar uma compensação de cores eficiente é recomendada a utilização de amostras marcadas individualmente com cada fluorocromo a ser utilizado no protocolo citofluorimétrico (Figura 2.15). Estas amostras devem ser adquiridas antes da amostra marcada com múltiplos fluorocromos. Através das marcações simples é possível ajustar o percentual de marcação somente para uma determinada fluorescência, traçando uma linha imaginária na mediana dos eventos negativos e positivos, de forma que os mesmos devem

estar alinhados, o que em números é representado pela semelhança entre a média de intensidade de fluorescência destes eventos. Após a compensação de cada fluorescência, a amostra é então adquirida e analisada neste protocolo previamente ajustado (Figura 2.15C).

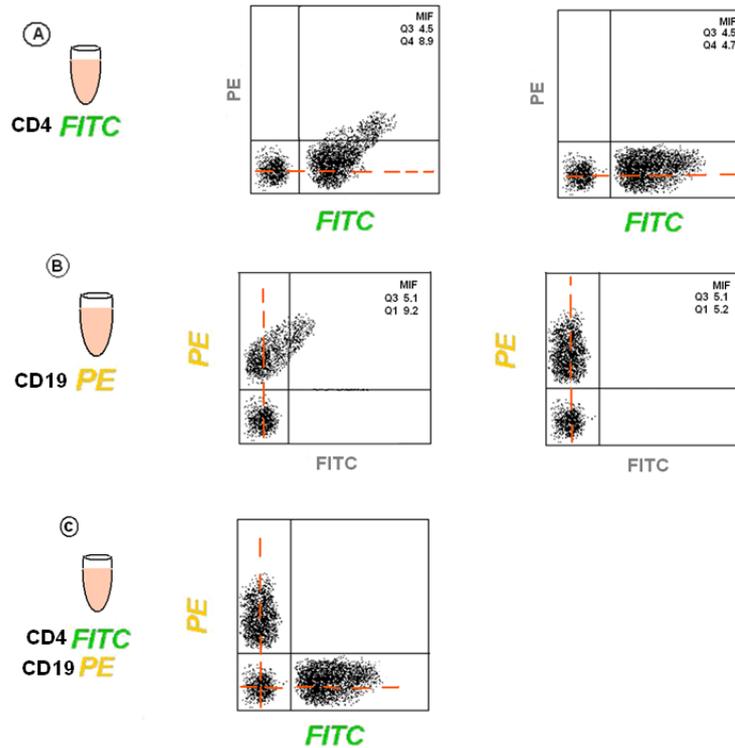


Figura 2.15 Marcação simples para compensação de cores. Aquisição de uma amostra marcada somente com CD4/FITC (A) e outra somente com CD19/PE (B), seguida da compensação de cores através do ajuste da média de intensidade de fluorescência dos eventos negativos (Q3) e dos eventos positivos (Q4 – A; Q1 – B), de acordo com uma linha imaginária tracejada entre estes eventos (em laranja). Em seguida a amostra marcada com os dois fluorocromos é adquirida conforme compensação previamente realizada (C). Imagem: Raquel Ferraz.

2.8 Histórico da Citometria de Fluxo

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. Porém, a partir da construção do primeiro Citômetro de Fluxo *Cell Sorter*, por Mack Fulwyler (1965), baseado no princípio dos contadores celulares desenvolvidos por Wallace Coulter (1956) e a descoberta da técnica para produção de anticorpos monoclonais, por Köhler e Milstein (1975), é que a Citometria de Fluxo tomou um impulso expressivo dentro de diversas áreas de conhecimento. Ainda, a associação de anticorpos monoclonais à

substâncias fluorescentes possibilitou uma maior especificidade na identificação dos componentes celulares, com conseqüente classificação mais detalhada das células. Posteriormente, o surgimento de vários tipos de *laser*, o desenvolvimento eletrônico e da informática computacional foram fundamentais para a evolução dos citômetros de fluxo.

Devido ao constante aprimoramento destes equipamentos, atualmente podemos encontrar no mercado citômetros de fluxo equipados com até sete *lasers*; com cada vez mais fotossensores (PMTs), capazes de detectar até 25 comprimentos de onda (25 cores); e Citômetros de Fluxo *Cell Sorters*, capazes de separar até 6 populações celulares diferentes, permitindo um maior detalhamento das características fenotípicas e funcionais das células, assim como a purificação das mesmas.

Ao longo dos anos pôde-se perceber a evolução das máquinas, cujas características e particularidades se resumem no número de *lasers*, número de fotossensores (e de parâmetros analisados - cores), *software* de análise e capacidade de realizar *cell sorting*. Tal evolução possui um caráter comercial cuja disputa no mercado se deve principalmente a duas grandes empresas: a Beckman Coulter (antiga Coulter Electronics, Inc.) e a Becton & Dickinson (BD), associadas a dois grandes citometristas: Wallace Coulter e Leonard Herzenberg, respectivamente.

No Brasil, a história da Citometria de Fluxo pode ser contada a partir de 1988, quando o primeiro citômetro de fluxo a ser importado para o país – o EPICS 751 da Coulter Electronics, Inc. (Figura 2.16), foi instalado no então Departamento de Protozoologia, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.



Figura 2.16 EPICS 751 *Cell Sorter* da então Coulter Electronics, Inc. Primeiro citômetro de fluxo instalado no Brasil, em 1988 – 2 lasers, 4 cores, *sorting* em duas vias. Dept. de Protozoologia, IOC, FIOCRUZ, de 1989 a 1999. Foto-cortesia: Alvaro Luiz Bertho.

Desde então a citometria de fluxo, devido a suas diversas aplicações nas ciências biológicas, 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 aquisição destes equipamentos.

Na medicina diagnóstica, a utilização destes equipamentos aumentou significativamente a partir de 1992, quando, por determinação do Ministério da Saúde, todo laboratório clínico que participasse da rede CD4/HIV deveria possuir um citômetro de fluxo para determinar as taxas da relação entre linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes HIV positivos. Além disso, os laboratórios que se prestam a realizar exames diagnósticos para desordens hematopoiéticas, como leucemias e linfomas, passaram a utilizar estes equipamentos como ferramenta indispensável na confirmação clínica destas enfermidades. Na pesquisa científica, o caráter multiaplicativo da Citometria de Fluxo tornou-a a ciência de escolha nas avaliações fenotípicas e funcionais em contextos imunoparasitológicos e de biologia celular. Surgiu então a necessidade de ampliação do parque instrumental de diversas instituições brasileiras, criando-se, em muitos casos, Plataformas Multiusuários de Citometria de Fluxo, nas quais se concentram alguns equipamentos de modo a oferecer essa tecnologia para a comunidade científica intra e inter-institucional.

Pensando desta maneira, a FIOCRUZ investiu ao longo destes 25 anos no aprimoramento tecnológico com aquisição de alguns citômetros de fluxo (FACSCalibur

(Figura 2.17), Cyan ADP Analyzer (Figura 2.18), EPICS XL-MCL Analyzer (Figura 2.19), MoFlo ASTRIOS Cell Sorter (Figura 2.20), Cytoflex (Figura 2.21), FACSAria Cell Sorter (Figura 2.22), EPICS ALTRA Cell Sorter (Figura 2.23), Accuri C6 Analyzer (Figura 2.24), FACSCanto (Figura 2.25), Gallios (Figura 2.26).

Atualmente a FIOCRUZ do Rio de Janeiro possui três Plataformas de Citometria de Fluxo:

Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC (Instituto Oswaldo Cruz) – subdividida em dois Núcleos:

- **Núcleo de Análise Celular:** com dois citômetros de fluxo – FACS Calibur (BD) (Figura 2.17) e Cyan ADP (Beckman Coulter) (Figura 2.18);
- **Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*):** onde se encontram três citômetros de fluxo - EPICS XL-MCL Analyzer (Beckman Coulter) (Figura 2.19); MoFlo ASTRIOS *Cell Sorter* (Beckman Coulter) (Figura 2.20); e Cytoflex (Beckman Coulter) (Figura 2.21).



Figura 2.17. FACS Calibur Analyzer (BD). 2 lasers, 4 cores. Software: Cell Quest. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto-cortesia: Raquel Ferraz.



Figura 2.18. Cyan ADP Analyzer (Beckman Coulter). 2 *lasers*, 7 cores. *Software*: Summit 4.3. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto-cortesia: Raquel Ferraz.



Figura 2.19. EPICS XL-MCL Analyzer (Beckman Coulter). 1 *laser*, 4 cores. *Software*: Expo 32. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto-cortesia: Alvaro Luiz Bertho.



Figura 2.20. MoFlo Astrios *Cell Sorter* (Beckman Coulter). 3 *lasers*, 11 cores, *sorting* em 6 vias; *Software*: Summit 6.1. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto-cortesia: Alvaro Luiz Bertho.



Figura 2.21. CytoFLEX (Beckman Coulter). 3 *lasers*, 9 cores. *Software*: CytExpert. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto: Beckman Coulter.

Plataforma de Citometria de Fluxo do PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico e Insumo em Saúde) – onde se encontra o FACS Aria *Cell Sorter* (BD) (Figura 2.22).



Figura 2.22. FACS Aria II *Cell sorter* (BD). 2 lasers 11 cores; Software: Diva. Plataforma PDTIS, FIOCRUZ. Foto-cortesia: Raquel Ferraz.

Plataforma de Citometria de Fluxo do INI (Instituto Nacional de Infectologia) – onde se encontra o citômetro de fluxo analisador Gallios *Analyzer* (Beckman Coulter) (Figura 2.23).



Figura 2.23. Gallios (Beckman Coulter). 2 lasers, 8 cores; Kaluza software. Foto: Beckman Coulter.

Além dos equipamentos das plataformas, A FIOCRUZ ainda possui no seu parque tecnológico outros citômetros de fluxo, como: Accuri C6 *Analyzer* (Figura 2.24) e FACS Canto (Figura 2.25), instalados em laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz.



Figura 2.24. Accuri C6 *Analyzer* (BD). 2 lasers, 6 cores. Software CFlow. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto-cortesia: BD.



Figura 2.25. FACS Canto *Analyzer* (BD). 2 lasers, 8 cores. Software. DIVA. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Foto-cortesia: BD.

Além dos citômetros de fluxo apresentados acima, existem hoje no mercado outros, como: MoFlo XDP (Beckman Coulter) (Figuras 2.26); Influx (BD) (Figura 2.27); FACSVerse (BD) (Figura 2.28); LSRFortessa (BD); FACS Jazz (BD); FACS Aria Fusion (BD); entre outros.



Figura 2.26. MoFlo XDP *Cell Sorter* (Beckman Coulter). 3 *lasers*, 11 *cores*. *Software*: Summit 5.0.
Foto-cortesia: Alvaro Luiz Bertho.



Figura 2.27. Influx *Cell Sorter* (BD). 3 *lasers*, 11 *cores*, *sorting em 6 vias*; *Software*: BD FACS.
Foto: <https://facs.stanford.edu/>



Figura 2.28. FACS Verse Analyser (BD). 3 lasers, 10 parâmetros. Software: BD FACSuite.
Foto-cortesia: BD BioScience.

Atualmente, outras empresas vêm entrando no mercado da citometria de fluxo, com a comercialização de citômetros cada vez mais avançados, como a Sony Biotechnology (Figura 2.29: SH800Z *Cell Sorter*) e a Merck-Millipore (Figura 2.30: Guava *easyCyte*). Com as novas tecnologias, uma nova abordagem da citometria de fluxo vêm sendo explorada: a citometria de fluxo com imagem. Esta abordagem agrega recursos de análise de imagem por microscopia de fluorescência às técnicas de citometria de fluxo. A Merck-Millipore foi pioneira nesta área e comercializa os *Amnis Imaging Flow Cytometers* (Figura 2.31) (ImageStream®X e o FlowSight®), que são os primeiros instrumentos a combinar citometria de fluxo e microscopia, produzindo novos *insights* sobre a biologia celular.



Figura 2.29. SH800Z *Cell Sorter* (Sony Biotechnology). Capacidade para 4 lasers.



Figura 2.30. Guava® easyCyte (Merck-Millipore). Capacidade para até 5 lasers.
Foto: Merck-Millipore.



Figura 2.31. Amnis® Imaging Flow Cytometer (Merck-Millipore). 12 canais para cada célula.
Foto: Merck-Millipore.

CAPÍTULO 3. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO

**Alessandro Marins dos Santos, Clarissa Cunha, Jessica Lima e Thaize Quiroga
Chometon**

A capacidade de mensurar simultaneamente múltiplos parâmetros em uma única célula é, provavelmente, o aspecto mais poderoso da citometria de fluxo. A identificação de moléculas na superfície e interior das células torna a citometria de fluxo uma importante ferramenta com aplicações em uma grande variedade de investigações.

Atualmente, a citometria de fluxo tem sido muito utilizada tanto na pesquisa quanto na clínica, permitindo a análise de amostras diversificadas, como sangue, medula óssea, fluidos das cavidades serosas, líquido cefalorraquidiano, urina e até tecidos sólidos. Sendo utilizada para a definição de populações celulares e suas características, como tamanho, complexidade citoplasmática, conteúdo de DNA e RNA; e na investigação de uma grande variedade de receptores e proteínas intracelulares ou ligadas à membrana, além de moléculas liberadas pelas células como citocinas e micropartículas. Essa técnica também permite a identificação de parasitas e outros microorganismos como bactérias e vírus. Neste capítulo, trataremos de forma breve, as aplicações mais frequentes da citometria de fluxo.

3.1 Distinção de populações celulares

Para identificar e diferenciar diferentes tipos celulares, utiliza-se parâmetros morfológicos e/ou fenotípicos. Os parâmetros morfológicos, tamanho e granulosidade celular, são avaliados pela citometria de fluxo através dos parâmetros de dispersão frontal do laser (FSC) e lateral (SSC) – já discutidos anteriormente. Já o fenótipo celular, mais conhecido como imunofenotipagem, é avaliado pela presença de diferentes antígenos presentes em diversos compartimentos celulares com membrana citoplasmática (receptores de superfície), citoplasma e núcleo.

A distinção de populações por imunofenotipagem será discutida em uma seção a parte devido a sua maior complexidade (seção 3.2), nessa seção discutiremos a distinção características morfológicas.

Somente com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), já é possível a diferenciar algumas populações celulares. Um exemplo de distinção de populações celulares por características morfológicas muito utilizado é o caso da diferença entre

linfócitos, monócitos e granulócitos em sangue periférico humano (figura 3.1). Essa distinção é vantajosa por não precisar utilizar nenhum reagente, como anticorpos monoclonais, entretanto apenas com esses parâmetros não é possível diferenciar subpopulações com características morfológicas semelhantes como é o caso de linfócitos B, T CD4⁺ e TCD8⁺, devido a esse fato muitas vezes a identificação morfológica é feita em conjunto com a imunofenotipagem.

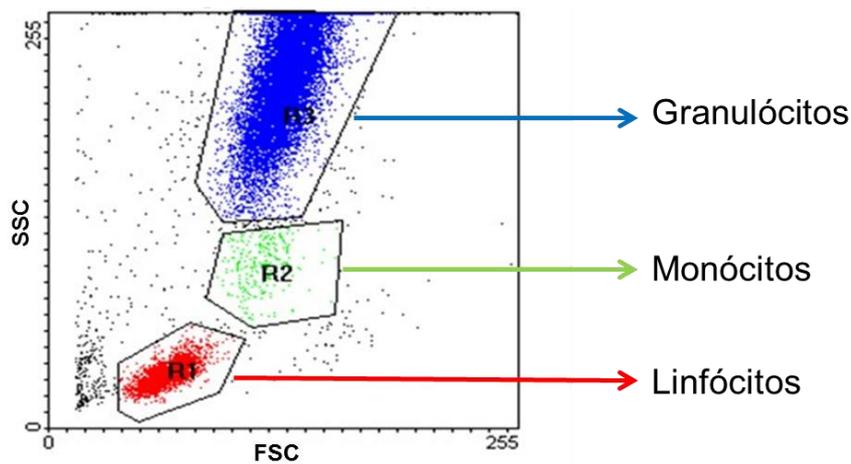


Figura 3.1: *Forward scatter* (FSC) – tamanho e *Side scatter* (SSC) - granulosidade de sangue periférico humano após a lise de hemácias (*Lysis solution*), onde se observa que as células presentes nesse tipo amostra possuem características morfológicas distintas.

3.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Atualmente, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma das ferramentas multiparamétricas mais poderosas para se definir a frequência de subpopulações celulares dentro de um conjunto amostral heterogêneo, e principalmente, analisar o perfil de expressão molecular estabelecendo o fenótipo individual de cada célula através da imunomarcção de antígenos de superfície celular ou intracitoplasmáticos. A imunofenotipagem auxilia fortemente a execução de diagnósticos clínicos, determinação de progressão de doença, monitoramento da resposta ou eficácia de tratamento; separação de células com determinado fenótipo para ensaios celulares funcionas *in vitro*, transferência celular autóloga ou adotiva para animais isogênicos ou imunodeficientes e análises de expressão genica, proteica e metabólica de uma subpopulação celular específica. Vale salientar que a grande expansão das metodologias em citometria de fluxo é relacionada diretamente à introdução da técnica de produção de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas (Figura 3.2). Com a conjugação de fluorocromos a anticorpos monoclonais teve início a imunofenotipagem, principal aplicação da citometria de fluxo até os dias atuais.

Desde então, a citometria vem crescendo no cenário mundial e uma grande variedade de aplicações vem sendo introduzida, tanto no âmbito da pesquisa quanto da medicina diagnóstica (Figura 3.3).

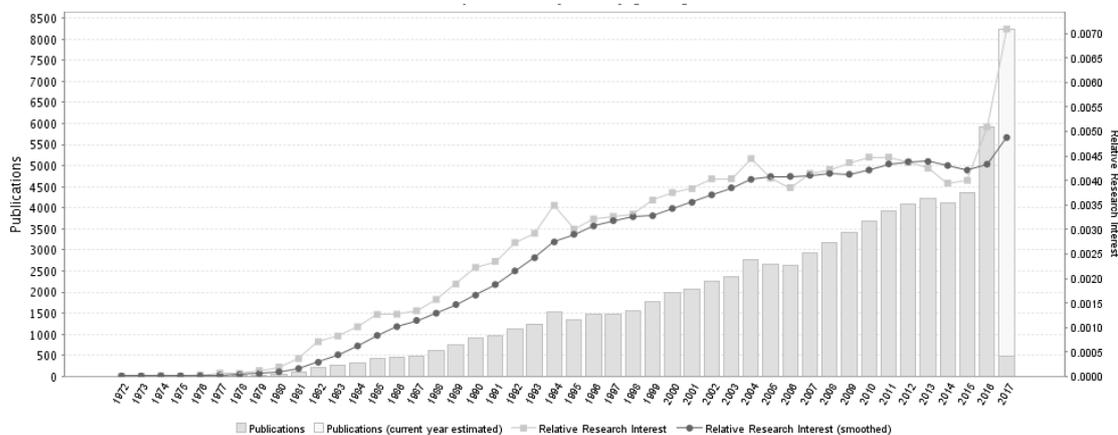


Figura 3.2. Gráfico mostrando o número de artigos publicados utilizando a citometria de fluxo por ano, desde 1976 até 2016.

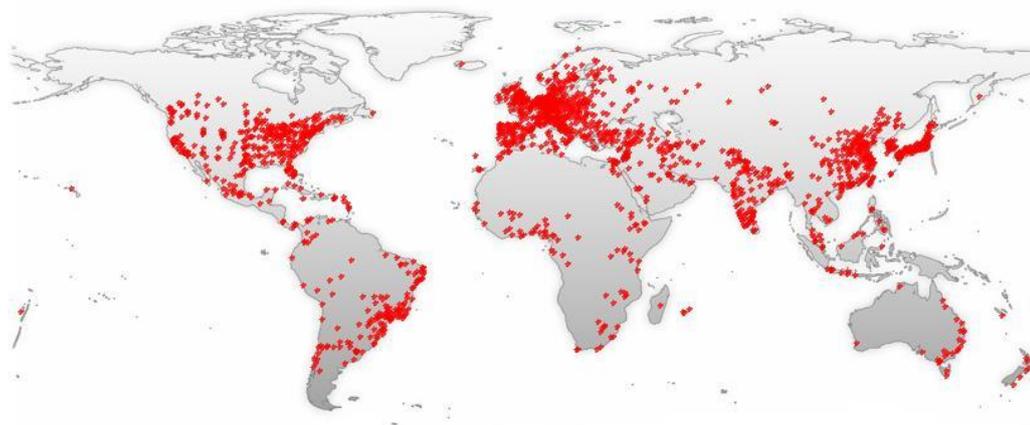


Figura 3.3. Distribuição mundial atual (dados de 2017) da utilização da citometria de fluxo.

Retirado de <http://www.gpubmed.com>

Na medicina diagnóstica são utilizados painéis de anticorpos monoclonais para identificar diversas subpopulações celulares que são sugestivas ou diagnosticam várias enfermidades. Diversas formas de leucemias e linfomas podem ser identificadas e classificadas de acordo com a modulação positiva ou negativa de determinadas moléculas (CDs) na superfície de células no sangue periférico ou em material de biópsia. Nas últimas décadas a citometria de fluxo foi também reconhecida como uma técnica quantitativa, já que a intensidade do sinal fluorescente é proporcional à quantidade de anticorpo ligado por célula, o que pode ser relacionado ao número de receptores expressos na superfície celular.

Nas leucemias e linfomas ocorre uma desregulação no desenvolvimento celular, o que pode permitir a migração de células imaturas em grande número para a periferia; ou resultam em uma rápida expansão de clones normais de células maduras, que passam, então, a ser o tipo celular predominante na circulação; ou ainda, as células passam a expressar uma combinação anormal de marcadores de superfície. As combinações de marcadores expressos definem as leucemias e linfomas, o que torna a citometria de fluxo a técnica mais apropriada para o diagnóstico e prognóstico destas doenças, apesar de as análises serem bastante complexas, devido ao grande número de parâmetros avaliados simultaneamente. Doenças mieloproliferativas crônicas, como a trombocitemia essencial, policitemia vera e mielofibrose primária também são diagnosticadas e classificadas através da citometria de fluxo. Nestas doenças, a citometria é indispensável na definição da linhagem e estágio de maturação dos blastos.

O monitoramento imunológico dos pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) por citometria de fluxo é preconizado pelo Ministério da Saúde. Ao longo da infecção, o HIV destrói os linfócitos T CD4⁺, de modo contínuo e progressivo, permitindo, assim, o acompanhamento das taxas destas células nos pacientes e o restabelecimento das mesmas durante o tratamento específico com antirretrovirais. A quantidade destas células na circulação é obtida através da combinação dos anticorpos monoclonais anti-CD45/CD3/CD4/CD8. Paralelamente, é feita a quantificação da carga viral como um teste complementar no monitoramento da AIDS e esta é inversamente proporcional à taxa de linfócitos T CD4⁺.

Células-tronco hematopoiéticas podem ser detectadas por citometria de fluxo devido à sua expressão de CD34 e CD90 e ausência de CD38. Estas células estão presentes na medula óssea em quantidade reduzida, e quase insignificante na circulação periférica (0,1% a 0,5% das células mononucleares). No entanto, a mobilização destas células na medula óssea pode ser estimulada, o que permite a coleta destas na periferia e na medula. Estas

células podem ser, então, utilizadas para recuperar uma medula debilitada, por exemplo, após altas doses de quimioterapia.

Nos casos de transplante de órgãos, a citometria de fluxo tem sido muito utilizada para monitoramento pós-operatório e *crossmatch*. Os pacientes receptores de transplante podem possuir anticorpos reativos às células transplantadas. Estes anticorpos citotóxicos já existem no momento do transplante e são responsáveis por uma crise imediata e aguda de rejeição, destruindo o órgão enxertado e colocando em risco a vida do receptor. Por este motivo, antes do transplante, o soro do receptor potencial é submetido, juntamente com os linfócitos do doador, a um ensaio conhecido como *crossmatch*. Porém, nos últimos anos, surgiram questionamentos acerca da sensibilidade deste *crossmatch* padrão, evidenciando que alguns casos de rejeição mais lenta podem resultar em níveis de anticorpos pré-formados tão baixos que não são detectáveis por este ensaio. Assim, o *crossmatch* por citometria de fluxo se mostrou sensível o bastante para detectar baixos níveis de anticorpos, além de permitir a distinção entre subtipos e subclasses de imunoglobulinas e entre os subtipos de linfócitos reativos. Após o transplante de órgãos, a análise dos linfócitos no sangue periférico pode auxiliar a detectar uma rejeição precoce durante a terapia com imunossuppressores e ajudar na diferenciação de infecções e rejeição. Uma variedade de marcadores de superfície celular e antígenos de ativação podem ser utilizados, dependendo da condição clínica e do órgão transplantado.

A citometria de fluxo é utilizada como teste complementar para o diagnóstico das diversas imunodeficiências. Estes distúrbios, que envolvem uma desregulação do sistema imune e suas respostas, resultam em infecções recorrentes e graves, doenças autoimunes ou malignidades. O diagnóstico é feito de acordo com o segmento do sistema imune que está alterado, que podem ser deficiências no sistema complemento, nas células da imunidade inata, da imunidade adquirida celular e humoral. Nos casos de imunodeficiências da imunidade humoral, que são a maioria, se faz a análise das células B, geralmente através da marcação de CD19 e CD20, e de imunoglobulinas. Estas imunoglobulinas, se livres no soro, podem ser detectadas pela citometria de fluxo, mas necessitam da utilização de *beads* para tal avaliação.

Os eritrócitos também são tipos celulares passíveis de análise por citometria de fluxo. Nos casos de eritroblastose fetal, por exemplo, pode-se detectar, avaliar e quantificar os eritrócitos fetais presentes no sangue materno. Para tal, são utilizados anticorpos anti-Rh (antígeno D) e anti-hemoglobina F. Com a permeabilização dos eritrócitos, os anticorpos se ligam à cadeia γ da hemoglobina humana, o que permite a distinção entre as células maternas com hemoglobina F e as células fetais. Ainda, como um número muito pequeno de

células fetais Rh⁺ (cerca de 0,1%) é suficiente para sensibilizar a mãe, se faz necessária a aquisição de muitas células para a obtenção de um resultado seguro. Assim, a citometria vem se mostrando muito mais acurada, objetiva e sensível do que o teste tradicional para investigação da eritroblastose fetal. A hemoglobínúria paroxística noturna (PNH), uma doença relacionada a células-tronco clonais, também pode ser diagnosticada através da citometria de fluxo, pela detecção de redução ou ausência de CD55 e CD59. PNH é causada pela biossíntese deficiente de um glicosilfosfatidilinositol, que ancora várias proteínas imunoregulatórias, e do complemento na superfície de eritrócitos e de outras células sanguíneas (como monócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas). Esta deficiência resulta em uma susceptibilidade dos eritrócitos à lise mediada pelo complemento, gerando uma hemólise intravascular crônica, que pode se tornar uma anemia aplásica e seguida de uma leucemia aguda.

Nos bancos de sangue a citometria de fluxo pode ser utilizada como teste complementar ou em substituição aos testes imunológicos. Tem sido aplicada principalmente para determinar o tipo sanguíneo (através do fenótipo dos eritrócitos) em pacientes multiplamente transfundidos e para avaliar a contaminação leucocitária dos produtos filtrados nestes bancos.

O estudo das plaquetas por citometria de fluxo tem se tornado cada vez mais frequente nos laboratórios clínicos. Ensaios de imunoglobulinas associadas a plaquetas são aplicados em várias doenças, como na púrpura trombocitopênica autoimune, por exemplo, na qual a maioria dos anticorpos secretados se encontra ligados a plaquetas. Muitos marcadores de ativação plaquetária também têm sido avaliados e são de importância clínica, como nos casos de infarto de miocárdio e eventos trombóticos e na avaliação dos componentes do sangue durante procedimentos de circulação extracorpórea e diálise renal.

Estudos baseados em marcadores de superfície não têm sido útil apenas para caracterizar fenótipos celulares sugestivos de doenças, mas também para aprofundar o conhecimento acerca do desenvolvimento do sistema imune em geral, já que as células do sistema perdem e adquirem várias proteínas de superfície ao longo de seu amadurecimento. Na pesquisa biomédica, a imunofenotipagem vem permitindo o estudo detalhado das células do sistema imune durante as diversas enfermidades existentes e, juntamente com estudos funcionais, fornece informações sobre o comportamento dos organismos em diversas condições. A imunofenotipagem fornece informações acerca da diferenciação e caracterização de populações celulares, seu estado de ativação ou repouso, migração celular.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo também é uma ferramenta valiosa na área de biologia do desenvolvimento, considerando seu alto potencial e acurácia para estabelecer a caracterização e isolamento de subpopulações celulares para estudos funcionais. Recentemente, estudos de grande impacto científico na área de reprogramação celular tem utilizado a imunofenotipagem por citometria de fluxo como uma metodologia essencial para a obtenção de subpopulações específicas e caracterização de células reprogramadas. Grande parte dos estudos na área de reprogramação celular utilizam fibroblastos humanos de pele, por exemplo. Tais fibroblastos são desdiferenciados até um determinado estágio de pluripotência, e posteriormente diferenciados artificialmente *in vitro*, nestes diferentes estágios torna-se essencial caracterizar o perfil celular e neste sentido, muitos estudos utilizam a imunofenotipagem através de citometria de fluxo. Nesta etapa geralmente são imunomarcados fatores de transcrição determinísticos de pluripotência e não diferenciação (DMNT3B, HTERT, NANOG, OCT4, REX1, e SOX2 por exemplo) e de diferenciação em corpos embriônicos (AFP, FLK1, GATA2, GATA4, NCAM, e PAX6 por exemplo). Num segundo momento nestes estudos, a imunofenotipagem também é utilizada para caracterizar o estado biológico e fisiológico dessas células após ensaios de transferência celular adotiva para camundongos humanizados (camundongos imunodeficientes que possuem menor rejeição transplante), por exemplo. Entretanto, nessa etapa estas células geradas a partir de células pluripotentes induzidas são imunomarcadas com anticorpos direcionados a antígenos celulares humanos para a caracterização fenotípica de biomarcadores importantes para a manutenção das atividades biológicas e fisiológicas da célula. Nesta etapa essas células também podem ser isoladas através de separação por citometria de fluxo e analisadas quanto a expressão global de genes que permitem comparações destas com células de mesma especialização, porém genuínas do organismo onde os fibroblastos foram obtidos, ou seja, não geradas a partir de células pluripotentes induzidas.

Em suma, imunofenotipagem e análise do conteúdo de DNA ocupam a grande maioria das aplicações da citometria de fluxo. Entretanto, a cada dia outras aplicações vêm sendo desenvolvidas em diversas áreas de estudo. A seguir, serão abordadas algumas destas outras aplicações.

Tabela 3.1. Exemplos de aplicações clínicas frequentes da citometria de fluxo

Principais Aplicações Clínicas da Citometria de Fluxo		
Área	Aplicação Clínicas	Moléculas Comumente Avaliadas
Imunologia	Histocompatibilidades por <i>cross-match</i>	IgG, IgM
	Rejeição de transplantes	CD3, OKT3 circulante
	Monitoramento de pacientes HIV+	CD45, CD4, CD3, CD8
	Estudos de imunodeficiências	CD4, CD8
Oncologia	Conteúdo de DNA	DNA
	Análise de marcadores de proliferação	PCNA, Ki-67
Hematologia	Fenótipos de leucemias e linfomas	Antígenos leucocitários de superfície
	Contagem de células hematopoiéticas progenitoras	CD34
	Contagem de reticulócitos	RNA
	Enfermidades autoimunes e aloimunes	IgG, IgM, Proteínas do Complemento
Banco de Sangue	Eritroblastose	Hemoglobina F, antígeno D
	Imunohematologia	Antígenos eritrocitários de superfície
	Contaminação leucocitária	Antígenos leucocitários de superfície
Desordens genética	PNH	CD55, CD59
	Deficiência de adesão leucocitária	CD11, complexo CD18

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular; PNH – Hemoglobinúria paroxística noturna.

3.3 Avaliação do conteúdo de DNA

A citometria de fluxo se iniciou na década de 30 com aparelhos capazes de analisar poucos parâmetros e baseados apenas na captação da dispersão de luz branca. Com o avanço no desenvolvimento de corantes e na utilização de *lasers* foi possível o progresso de tal técnica. A primeira grande aplicação foi a análise de DNA celular no final dos anos 60, com a utilização de substâncias fluorescentes, como 4, 6-Diamidino-2-Fenilindol (DAPI), Hoechst, brometo de etídeo e iodeto de propídeo.

A avaliação do conteúdo de DNA celular é uma das principais aplicações da citometria de fluxo ainda nos dias atuais. Esta avaliação permite determinar a distribuição das populações celulares presentes na amostra ao longo das diferentes fases do ciclo celular e, individualmente, a ploidia de cada célula, o que é de particular relevância nos estudos oncológicos. Ainda é possível observar o DNA degradado, fornecendo a informação de morte celular. Este ensaio pode ser realizado com células vivas, utilizando diferentes corantes fluorescentes, que se ligam ao DNA. Geralmente, esta ligação permite uma avaliação quantitativa, ou seja, a quantidade de corante é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula. Os principais corantes utilizados para marcar DNA na citometria de fluxo encontram-se listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Corantes fluorescentes mais utilizados na marcação de DNA.

Fluorocromo	Abreviação	Excitação (LASER)	Emissão
Diamidinofenilindol	DAPI	358 nm (UV; Violeta)	461 nm
bisbenzimidazol	Hoechst 33342	355 nm (UV)	461 nm
	Hoechst 33258	343 nm (UV)	450 nm
iodeto de propídeo	PI	535 nm (488, 535)	617 nm
laranja de acridina	AO	503 nm (488)	525 nm
7-aminoactinomicina-D	7AAD	546 nm (488; 535)	647 nm

O iodeto de propídeo (PI) é um dos corantes mais utilizados para avaliação do conteúdo de DNA, possui a propriedade de se intercalar em pequenas sequências de bases nucleotídicas e fluoresce na faixa do espectro luminoso visível do vermelho (617nm), quando excitado por um *laser* 488 nm (azul). Devido às suas características físico-químicas, o PI tem sido utilizado na citometria de fluxo tanto para avaliação da viabilidade celular e apoptose, quanto para determinação de conteúdo de DNA, dependendo do protocolo de marcação utilizado. Por 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 e as células mortas, que perderam a integridade da membrana plasmática, são positivas para tal marcação (Figura 3.4). Já os protocolos utilizados para identificar as células em diferentes fases do ciclo celular necessitam uma etapa de permeabilização da membrana, através da utilização de detergentes (p.ex. Triton-X100, saponina, NP40) ou alcoóis (metanol e etanol), com o intuito de permitir a entrada do PI na célula. Como o PI também se intercala às bases nucleotídicas do RNA, a utilização de Ribonuclease A é fundamental para especificar a marcação ao DNA nestes protocolos. A análise é baseada na quantificação da incorporação do PI no DNA celular. Assim, após a análise destas células no citômetro de fluxo, pode-se definir as células na fase G0/G1, S e G2/M de acordo com a intensidade de fluorescência, relativa ao aumento do conteúdo de

DNA intracelular. Ainda, as células com uma menor intensidade de fluorescência são as células que apresentam uma fragmentação do DNA, característica do fenômeno de morte celular (apoptose) (Figura 3.4B). É importante salientar que as escalas utilizadas nos histogramas para análise nos protocolos descritos acima devem ser logarítmicas e lineares, respectivamente (Figura 3.4).

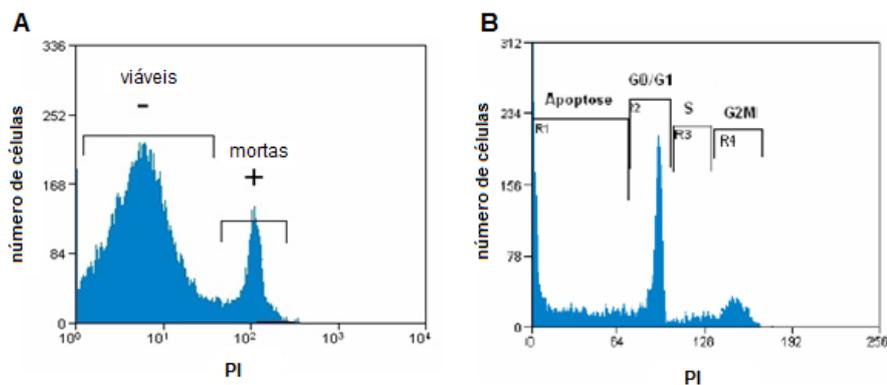


Figura 3.4. Histograma citofluorimétrico de número de células vs. intensidade de fluorescência do PI em diferentes protocolos: para viabilidade celular (A); e para avaliação de ciclo celular (B).

O DAPI possui afinidade pela ligação Adenina-Timina em DNA de dupla fita e emite fluorescência na faixa do azul (461nm) quando excitado pelo *laser* UV ou Violeta. Também pode se intercalar à ligação Adenina-Uracila do RNA, porém, neste caso, emite fluorescência com um pico de emissão diferente da ligação ao DNA (500nm). Outro corante excitado pelo *laser* UV é o Hoechst 33342, que apresenta pico máximo de emissão de 461nm (azul). Geralmente é empregado em substituição ao DAPI devido à sua propriedade lipofílica (não necessitando de permeabilização da membrana) e apresenta ótima aplicabilidade em estudos sobre replicação e divisão celular, assim como apoptose. A grande vantagem dos corantes excitados pelo *laser* UV é que seus picos de emissão não sobrepõem os picos de emissão dos fluorocromos tradicionais e mais frequentemente utilizados (como FITC e PE), sendo preferencialmente utilizados em protocolos multiparamétricos. Porém a grande desvantagem é o alto custo deste *laser*, o que torna difícil a incorporação deste tipo de *laser* nos citômetros de fluxo mais atuais.

A citometria de fluxo fornece também uma maneira mais direta de mensurar a síntese de DNA, através do emprego da bromodeoxiuridina (BrdU), um nucleotídeo sintético análogo à timidina que se incorpora ao DNA sintetizado nas células em proliferação (durante a fase S do ciclo celular). Para avaliação por citometria de fluxo, utiliza-se um anticorpo

específico anti-BrdU conjugado a um fluorocromo diferente da ficoeritrina (PE). Vale ressaltar que o DNA pode ser marcado ao mesmo tempo com PI e BrdU, resultando um *dot plot* biparamétrico da fluorescência do PI vs. a fluorescência do BrdU incorporado (Figura 3.5).

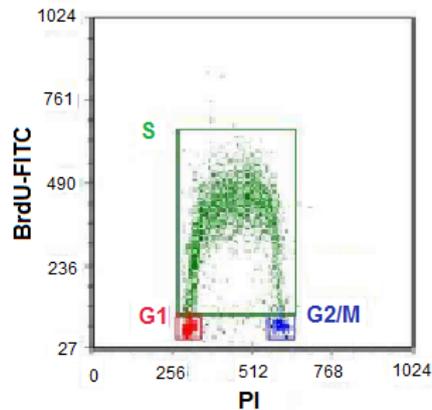


Figura 3.5. Avaliação das fases G1, S, G2/M do ciclo celular através de *dot plot* da fluorescência de FITC (conjugado a BrdU) vs. fluorescência do PI.

Existem outras maneiras de explorar o potencial da citometria de fluxo na avaliação de DNA através da combinação da marcação com dois corantes específicos ou com outros parâmetros. O corante laranja de acridina, por exemplo, possui a propriedade de se ligar ao DNA e ao RNA e emitir fluorescência diferente para cada ligação; isto é, quando se liga ao DNA emite uma fluorescência verde (525nm) e quando intercalado ao RNA emite uma fluorescência vermelha (650nm). Esta diferença ocorre porque a ligação ao DNA é por intercalação enquanto ao RNA a ligação ocorre por atração eletrostática. A análise simultânea dos conteúdos de DNA e RNA fornece dados mais claros acerca da progressão das células durante o ciclo celular.

Outra interessante aplicação é o estudo dos cromossomos através da marcação do DNA com cromomicina A3 e Hoechst 33258. Enquanto a cromomicina A3 é específica para Guanina-Citosina no DNA, o Hoechst 33258 tem afinidade pela interação Adenina-Timina, permitindo assim a análise do cariótipo, já que, mesmo cromossomos que possuem conteúdo similar de DNA, diferem na distribuição dos pares de bases (Figura 3.6).

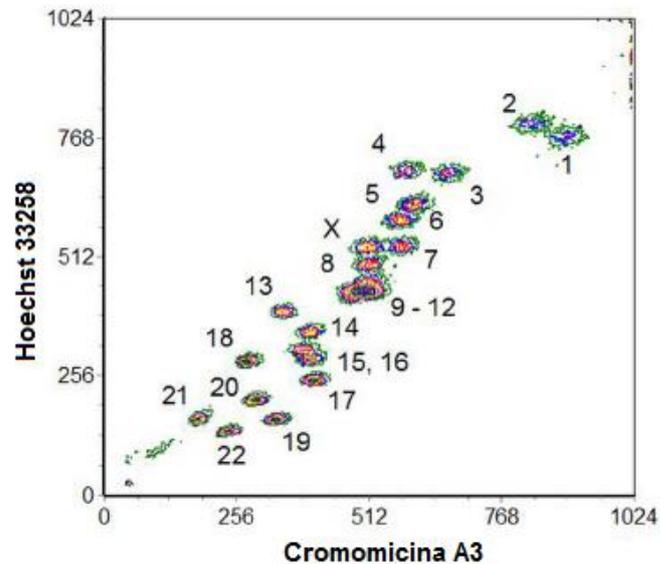


Figura 3.6. Avaliação de cariótipo normal humano através de *dot plot* da marcação de Hoechst 33258 vs. cromomicina A3.

3.4 Morte Celular – Apoptose

Necrose e apoptose são as duas formas de morte celular e podem ser diferenciadas com base nas características morfológicas, bioquímicas e moleculares de cada processo. Enquanto a necrose é um processo desordenado, que ocorre em condições patológicas e se caracteriza pela perda de integridade da membrana plasmática, a apoptose é um evento programado, com a função de manter a homeostase do organismo e se caracteriza por manter a integridade da membrana.

Devido a uma grande diversidade de moléculas que podem ser avaliadas para caracterizar os eventos apoptóticos, a citometria de fluxo é uma ferramenta cada vez mais utilizada no estudo de diversas doenças associadas a este processo. A apoptose pode ser observada apenas pelos parâmetros de tamanho e granularidade (Figura 3.7), sem a necessidade de submeter a amostra a um protocolo de marcação, embora o uso de marcadores para determinar tal processo seja muito mais específico.

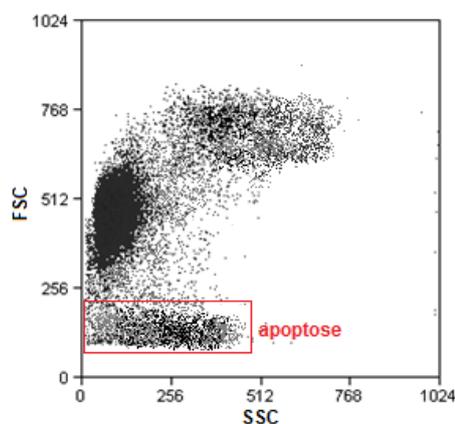


Figura 3.7. *Dot plot* de tamanho (FSC) vs. granularidade (SSC) de uma amostra de células mononucleares de sangue periférico, no qual é possível observar as células que provavelmente se encontram em processo de apoptose, devido à diminuição de tamanho, como resultado do encolhimento celular, e aumento de granularidade, como resultado da condensação da cromatina.

Como já mencionado, através da avaliação da degradação do DNA por diferentes marcadores (PI, DAPI) é possível determinar as células em apoptose. Outros marcadores também podem ser utilizados, como a Anexina-V (proteína com propriedade de se ligar à fosfatidilserina) conjugada a um fluorocromo. No processo inicial de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a superfície externa da membrana celular, permitindo, então, a ligação da Anexina-V.

Diversas proteínas relacionadas com o processo de apoptose podem servir como marcador através da utilização de anticorpos monoclonais específicos, como anti-Fas, anti-Bax, anti-Bid, anti-Bcl-2, anti-caspase-3, anti-p53. Podem ser utilizados para avaliação de apoptose ainda algumas substâncias fluorescentes relacionadas ao potencial de membrana mitocondrial, como Rodamina 123 e DioC₆, e também *kits* comerciais baseados em enzimas de transferência de nucleotídeos (teste TUNEL).

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. A 7-aminoactinomicina D (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 7-AAD, que então se liga no DNA acessível no interior da célula, permitindo assim a diferenciação de apoptose e necrose, pela diferença de intensidade de fluorescência (Figura 3.8A). O uso

combinado de Hoechst 33342 com PI permite também a distinção entre os dois processos de morte, pois ambos os corantes marcam as células em necrose, e a intensidade de fluorescência de Hoechst 33342 é maior nas células apoptóticas (devido à cromatina compactada) em comparação às células viáveis. Outra combinação muito utilizada é de Anexina-V e PI, onde as células necróticas são positivas somente para a marcação com PI, as células em apoptose inicial (ainda com a membrana íntegra) são positivas somente para Anexina-V e as células em apoptose tardia e ou necrose são positivas para as duas marcações (Figura 3.8B).

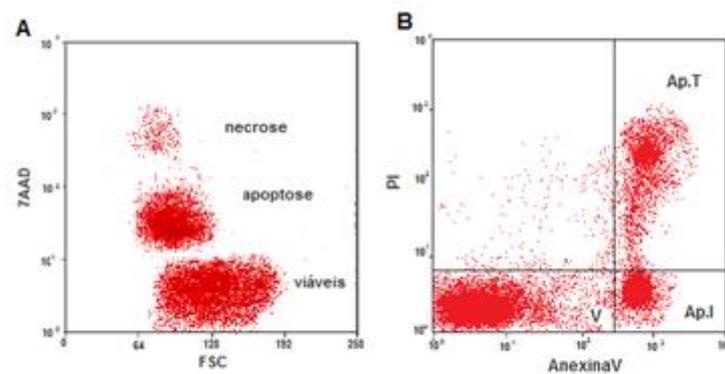


Figura 3.8. **A** – *Dot plot* de tamanho (FSC) vs. a fluorescência de 7-AAD, permitindo a visualização de três populações: células viáveis, células em apoptose e células em necrose; **B** – *Dot plot* da fluorescência do PI vs. a fluorescência da Anexina V, diferenciando as células em necrose (N), em apoptose tardia e/ou necrose (Ap.T), em apoptose inicial (Ap.I) e as viáveis (V).

3.5 Proliferação celular

Existem duas abordagens básicas para se estudar a proliferação celular: uma através da avaliação do ciclo celular (já exposto), e a outra através da avaliação do número de divisões celulares ao longo de um período de tempo. Nesta última, um número maior de divisões celulares pode ser observado, mas não há informações sobre o ciclo celular. As substâncias mais utilizadas para esta finalidade são o CFSE, que se liga a proteínas citosólicas e de membrana, e o PHK26, que é um corante lipofílico com afinidade com membranas celulares. Recentemente, foi disponibilizado comercialmente, um novo corante chamado *Violet Cell Proliferation* com papel similar ao CFSE, mas que é excitado pelo *laser* Violeta (405 nm). O princípio destas substâncias é que elas se ligam a estruturas nas células e, de acordo com a divisão destas, o corante também vai se dividindo entre as células-filhas (Figura 3.9).

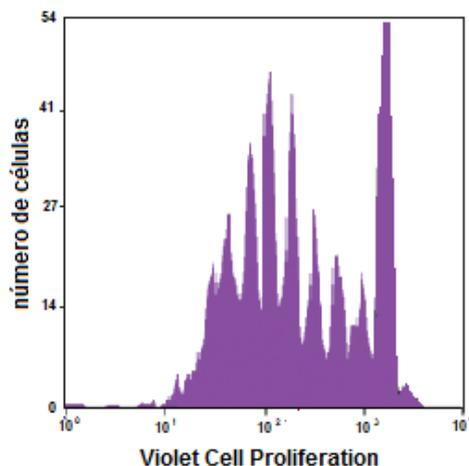


Figura 3.9. Histograma da intensidade de fluorescência do *Violet Cell Proliferation*. Os picos representam sucessivamente, da maior para a menor intensidade, as divisões das células em análise. Adaptado de <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C34557>

3.6 Ensaios funcionais

A citometria de fluxo é atualmente aplicada em diversos ensaios funcionais, e os mais frequentes são relacionados ao estudo da resposta imune, como ensaios de citotoxicidade e de produção de citocinas, cálcio e espécies oxidativas. Os dados funcionais, juntamente com a imunofenotipagem, fornecem informações essenciais no estudo das respostas do organismo.

A citometria de fluxo permite a detecção e quantificação de diversas citocinas simultaneamente, além da definição de quais populações celulares as estão produzindo. Para tal aplicação são utilizados anticorpos monoclonais específicos para cada citocina a ser avaliada. Recentemente, ainda se tornou possível a avaliação das citocinas solúveis por citometria de fluxo, através do princípio de *Cytometric Beads Array* (CBA), melhor detalhado no subtópico a seguir. Estes ensaios multifuncionais permitem um aprofundamento no conhecimento da resposta imune e são de extrema importância em estudos vacinais.

O rápido aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}) é uma das primeiras respostas de muitos tipos celulares aos diversos estímulos externos, podendo resultar na ativação de enzimas responsáveis por mudanças no metabolismo e no desenvolvimento dessas células. Muitos corantes fluorescentes são utilizados para avaliar a concentração intracelular de Ca^{2+} e suas fluorescências são proporcionais a esta concentração. Os corantes mais utilizados são *fluoro-3*, cuja fluorescência aumenta de acordo com a concentração de Ca^{2+} intracelular, o *Fura Red*, cuja fluorescência é inversamente proporcional à quantidade de Ca^{2+} , e o *indo-1*, cuja diferença de fluorescência permite a distinção entre a ligação ao Ca^{2+} quelatado e aos íons

livres. Geralmente, as análises da produção de Ca^{2+} intracelular são feitas em função do tempo, ou seja, em experimentos de cinética.

Ensaio para avaliação da produção de espécies oxidativas são empregados principalmente na avaliação de *burst* oxidativo de neutrófilos, de alterações na concentração de produtos oxidativos durante a apoptose e da produção intracelular de espécies oxidativas sob diferentes estímulos. Os compostos mais utilizados (dihidrorodamina – DHR; dihidroetídio – DHE; e dihidroclorofluoresceína – DCFH) não são fluorescentes na sua forma reduzida, mas passam a fluorescer sob oxidação.

3.7 *Bead-based immunoassay*

O objetivo desta técnica de citometria de fluxo é detectar e quantificar moléculas em fluidos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas sinalizadoras. Por se tratarem de kits mais específicos, hoje são disponibilizados por duas empresas BD Bioscience e Biolegend chamados respectivamente de *Cytometric Beads Array* (CBA) e LEGENDplex.

O princípio de tal metodologia é a utilização de microesferas com fluorocromos incorporados em diferentes proporções, ficando cada grupo de microesferas com uma intensidade de fluorescência única, que é associado a um anticorpo específico para um analito. Quando a amostra é incubada com essas microesferas, cada analito se ligará ao seu anticorpo específico, ligado à respectiva microesfera. Após a incubação, são então adicionados anticorpos secundários (anticorpos de detecção), marcados com fluorescência diferente da usada nas microesferas, que se ligarão aos analitos (Figura 3.10). Assim, quanto maior a concentração do analito, maior a marcação do anticorpo secundário e, conseqüentemente, o deslocamento do grupo de esferas no histograma (Figura 3.11). Após a aquisição dos eventos pelo citômetro de fluxo, a quantificação de cada analito é feita com base nos valores de intensidade de fluorescência da curva padrão.

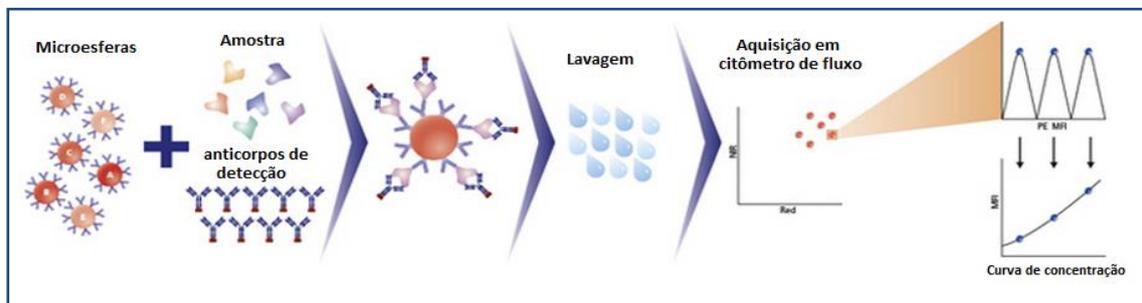


Figura 3.10. Desenho esquemático do princípio da técnica de *Bead-based immunoassay*. Adaptado de http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Brochure_Intl.pdf.

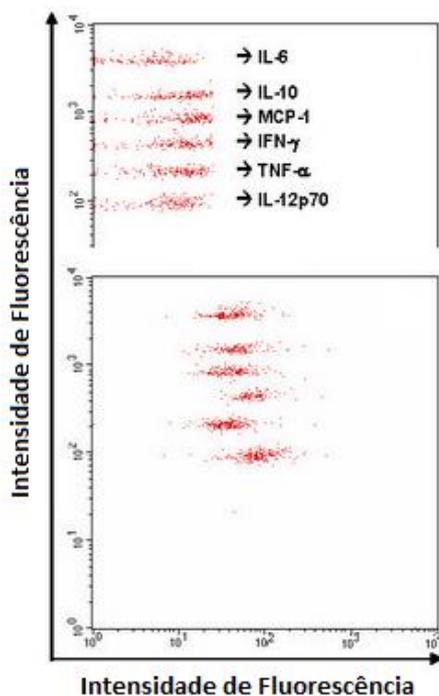


Figura 3.11. Exemplo de *dot plots* de marcações para citocinas por CBA. O eixo X corresponde à intensidade de fluorescência das microesferas; e o eixo Y à intensidade dos anticorpos monoclonais. Adaptado de Hemdan, 2008

3.8 Análise de micropartículas

Micropartículas (MPs) são estruturas liberadas pela membrana de diferentes tipos celulares após ativação ou apoptose, possuindo um tamanho entre 50 nm e 1000 nm. Elas estão presentes tanto no plasma de indivíduos saudáveis (níveis considerados fisiológicos) quanto em portadores de diferentes doenças. Elas contêm material celular, como receptores de membrana, proteínas, mRNA e lipoproteínas, que são fundamentais para a identificação dessas vesículas por diferentes técnicas, como a citometria de fluxo. Todas as células sanguíneas produzem MPs, sendo que as plaquetas liberam a maior quantidade delas, correspondendo a 70%-90% do total de MP no plasma de indivíduos saudáveis.

Muitos estudos têm sugerido uma associação entre micropartículas e diferentes condições patológicas, como câncer, doença cardiológicas e renais. Entretanto por se algo ainda pouco descrito, os estudos já existentes ainda são controversos principalmente com relação aos níveis de micropartículas que possam ser considerados patológicos e a necessidade da padronização dos diferentes protocolos utilizados, para que assim seja possível à utilização de micropartículas como biomarcadores úteis na prática clínica.

Até a década de 1990, nenhuma importância biológica foi dada às MP, e elas eram consideradas como partículas resultantes de destruição celular ou apenas marcadores de apoptose. Foi a partir de 1996 que começaram a investigar e sugerir que as MPs possuíam um papel importante na resposta imune adaptativa. A partir disso, vários trabalhos têm mostrado a importância dessas vesículas como vetores de troca intracelular de informação biológica, por meio de identificação, caracterização e quantificação das MP em várias situações, como obesidade, diabetes, infarto, depressão, câncer, HIV e insuficiência renal.

A citometria de fluxo é um método muito utilizado nos estudos de MP devido à sua capacidade de quantificar o número absoluto de partículas e atributos de análise multiparamétrica, permitindo assim a detecção de vários marcadores simultaneamente.

Com relação ao isolamento de MP para a posterior identificação por citometria de fluxo, não há um consenso ou um protocolo uniforme. As MPs podem ser isoladas a partir de tipos de fluidos biológicos como plasma, soro e urina ou de sobrenadantes de cultura celular. Há diferentes protocolos de isolamento sendo empregados, os mesmos tendem a incorporar os interesses particulares do estudo, bem como a disponibilidade de equipamentos em seu laboratório. Apesar dos diferentes protocolos utilizados, a metodologia mais utilizada para o isolamento MP é a centrifugação diferencial a qual emprega um número de diferentes passos de centrifugação caracterizados por diferentes forças centrífugas e tempos de centrifugação.

Entretanto fatores como a preparação da amostra, coleta da mesma, temperatura de processamento, bem como a forma como as amostras devem ser armazenadas e preparadas para utilização futura são etapas fundamentais para um evitar perdas e para um bom isolamento de MPs.

Por se tratarem de moléculas muito pequenas é necessário muita cautela para caracteriza-las por citometria de fluxo. Geralmente *bead* de tamanhos já conhecidos são utilizados para auxiliar na identificação de diferentes MPs de diferentes tamanhos (Figura 3.12).

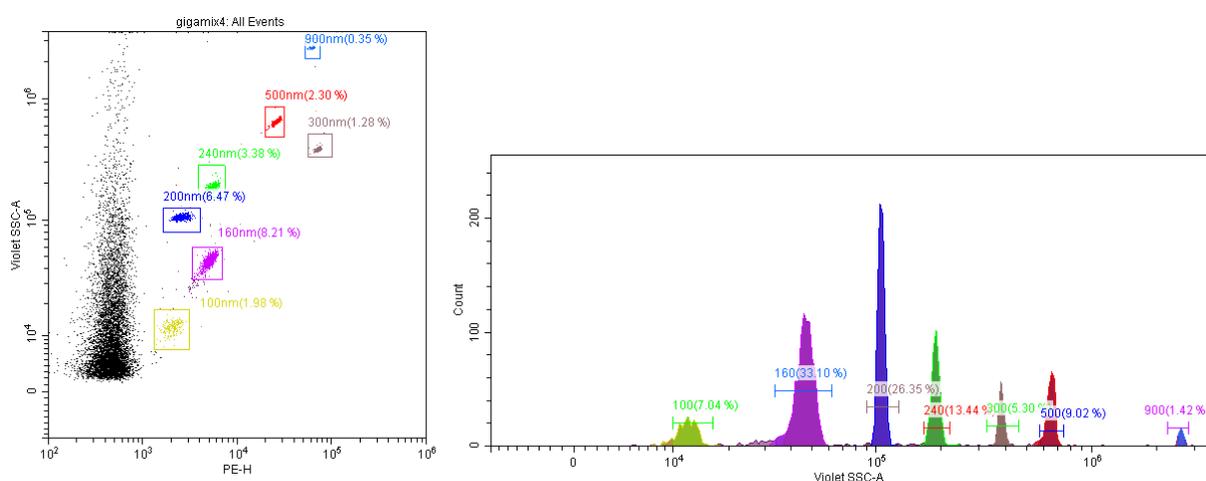


Figura 3.12: Gráficos representando *beads* de diferentes diâmetros observadas por citometria de fluxo.

Além disso, diferentes marcadores como a calceína, anexina V são utilizados para identificar as MPs de maneira geral. A Calceína AM é uma substancia não fluorescente que em partículas integras ou em células viáveis é transportada através da membrana celular. Já na parte interna da partícula, esterases hidrolisam a calceína convertendo-a a um produto fluorescente, o mesmo não ocorre em células e partículas não viáveis e integras. Enquanto a anexina V se liga à fosfatidilserina presente na membrana das MPs. As verdadeiras MPs são consideradas como os eventos duplo-positivos para anexina V e Calceína AM (Figura 3.13).

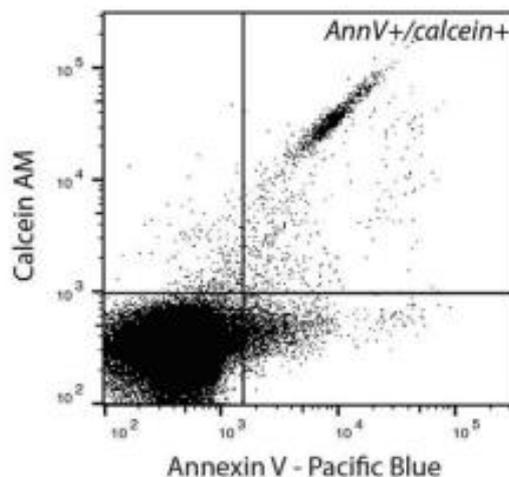


Figura 3.13: Para definição de MPs após seleção da população pela morfologia (FSC x SSC), todos os eventos positivos para a anexina V e a calceína AM são definidos como eventos MP "verdadeiros".

Fonte: Wisgrill S. *et al.* 2016

Após a definição das MPs, essas partículas podem ser analisadas e classificadas quanto à sua origem, utilizando diferentes marcadores (Tabela 3.3).

Tabela 3.3: Principais marcadores utilizados para identificação da origem das MPs

Origem da MP	Marcador
Linfócito T CD4 ⁺	CD3 e CD4
Linfócito T CD8 ⁺	CD3 e CD8
Monócito	CD14
Linfócito B	CD20 ou CD19
Plaqueta	CD61 ou CD41
Células endoteliais	CD62e ou CD144
Granulócitos	CD66b
Eritrócitos	CD235a
Neutrófilos	CD15

3.9 Análise de microorganismos

Protozoários, fungos, bactérias e até vírus podem ser detectados e avaliados através da citometria de fluxo. O avanço na descoberta de biomarcadores para os mais variados microorganismos tornam a citometria de fluxo cada vez mais a técnica de escolha para esta análise, visto que é capaz de detectar, caracterizar e até separar populações específicas a partir de uma amostra heterogênea. Além disto, nas culturas purificadas, é necessário a avaliação do crescimento do microorganismo, a proliferação, a viabilidade, seu metabolismo e sua interação com vários agentes químicos e físicos para diversos tipos de estudo, análises possíveis através da citometria. A citometria de fluxo tem sido utilizada nos estudos microbiológicos em diversas áreas, como na monitorização do processo de fermentação por bactérias, na microbiologia industrial, em diagnósticos clínicos e na toxicologia ambiental.

3.10 Interação parasito-célula hospedeira

Através da citometria de fluxo é possível avaliar a interação de parasitos com suas células hospedeiras, seja através de marcações fenotípicas específicas, da utilização de parasitas geneticamente modificados autofluorescentes, da realização de ensaios funcionais ou simplesmente através da observação da diferença de granularidade (Figura 3.14).

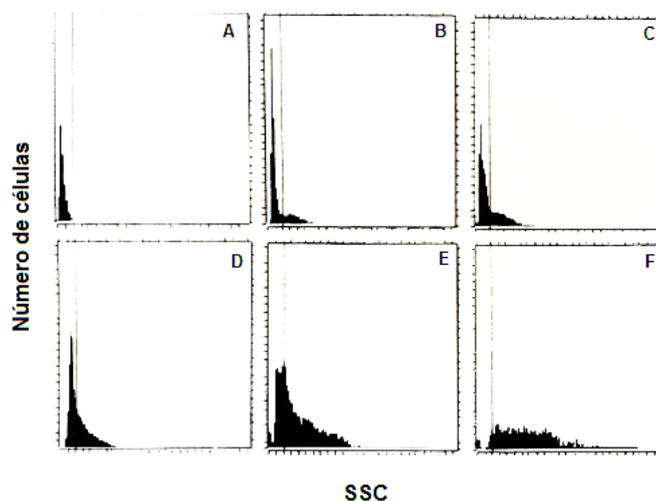


Figura 3.14. Dot plots de número de células vs. granularidade (SSC) de uma cultura de macrófagos com *Leishmania* em diferentes momentos (A – tempo zero de cultura). É possível observar o aumento da granularidade ao longo do tempo de cultura, o que representa a invasão das leishmânias nos macrófagos. Fonte: Bertho *et al.* J. Parasitol. (1992).

3.11 Microbiologia marinha

Bactérias, cianobactérias, fitoplânctons e zooplânctons estão presentes em altas concentrações nos ambientes marinhos e o estudo de suas funções e comportamento são fundamentais para a compreensão destes ecossistemas. A citometria de fluxo tem sido aplicada no estudo destes microorganismos principalmente através da avaliação de tamanho e granularidade, autofluorescência e análise de DNA e RNA (Figura 3.14), e vem se tornando a técnica padrão para o monitoramento de populações de fito e zooplânctons. A partir destes estudos, novos citômetros são fabricados especialmente para tal aplicação, já que a caracterização e quantificação dos microorganismos presentes nos mananciais aquáticos, como oceanos, lagoas e rios, fornecem um monitoramento acurado da qualidade da água destes ambientes.

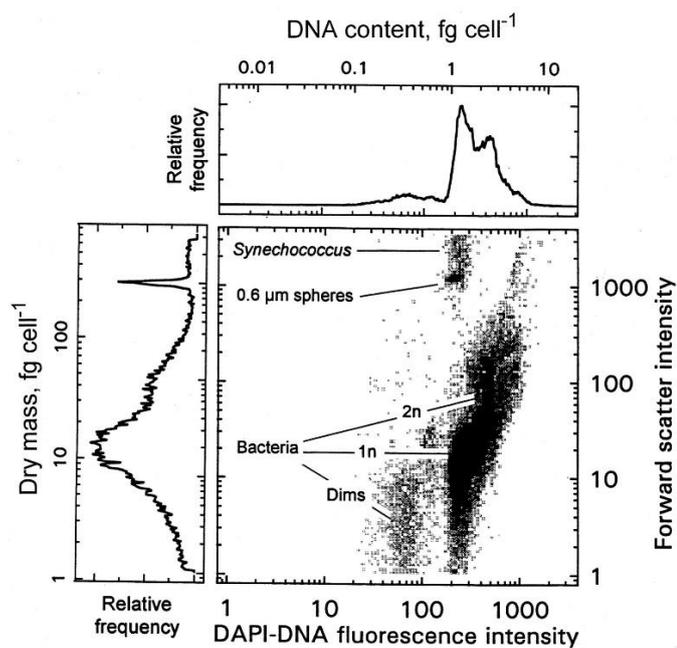


Figura 3.14. *Dot plot* de bactérias marinhas em uma amostra de água coletada no Golfo do Alaska. A análise de células com baixa intensidade de incorporação do DAPI (*dims*), um agregado na posição semelhante de *Synechococcus*, e células 1n e 2n são indicadas. Avaliação do tamanho (FSC) e conteúdo de DNA (através da marcação com DAPI) de bactérias. Fonte: D. K. Button, and Betsy R. Robertson Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67:1636-1645

CAPÍTULO 4. CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA AO ESTUDO DAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Clarissa Cunha, Jéssica Lima, Thaize Quiroga Chometon

A possibilidade de se integrar em uma técnica, análises multiparamétricas trouxe grande enriquecimento de informações no campo da imunologia, sendo a CMF atualmente, uma das principais técnicas aplicadas para estudo do sistema imunológico, principalmente da imunidade celular, mas também o ramo humoral da resposta, já que a imunofenotipagem permite a identificação de linfócitos T e B, assim como outras células que também participam da resposta imune do hospedeiro. Visto isso, muitos estudos têm utilizado a citometria de fluxo para a melhor compreensão da imunopatogênese de várias infecções, já que além da determinação do fenótipo celular que está envolvido no mecanismo imune, também é possível avaliar a modulação positiva ou negativa de receptores da superfície celular que indicam como o hospedeiro interage durante a dinâmica da infecção ou ainda compreender vias que o patógeno utilize para subjugar o sistema imune. Nesse quesito, várias doenças são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro de maneiras distintas de acordo com o agente etiológico, via de transmissão, ciclo biológico, patogenicidade etc.

4.1 Infecção pelo HIV e a depleção de células T CD4⁺

O vírus da imunodeficiência adquirida é o retrovírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA-AIDS). A maioria das infecções pelo HIV-1 ocorre pelo contato sexual, através da exposição do trato genital ou da mucosa retal. Embora os mecanismos utilizados pelo HIV-1 para cruzar a barreira epitelial ainda não estejam totalmente definidos, estudos demonstram que o vírus é capaz de fazer contato direto com células de Langerhans e células T CD4⁺ intraepiteliais, além da transcitose, que é o transporte de macromoléculas de um lado para o outro da célula por meio de vesículas, também ser uma via proposta. Além disso, já foi demonstrado que ocorre um aumento do risco de infecção quando a mucosa genital está com sua integridade comprometida, seja por trauma mecânico ou infecções genitais coexistentes. Após cruzar essa barreira, o vírus alcança a camada subepitelial, onde encontra as células TCD4⁺ e células dendríticas, que são consideradas alvos iniciais da infecção.

Seguindo a transmissão do vírus, ocorre um período de aproximadamente 10 dias no qual o RNA viral não é detectado no plasma. Ao final dessa etapa, o vírus alcança o linfonodo de drenagem, onde encontra células T CD4⁺CCR5⁺, que são alvos para infecção adicional. A molécula de CD4 e o receptor de quimioquina CCR5 (CD195) funcionam como receptor e co-receptor, respectivamente, para a entrada do vírus na célula. Alguns vírus utilizam a molécula CXCR4 (CD184) como co-receptor e são denominados X4 trópicos outros são capazes de se ligar a ambos os co-receptores e são conhecidos como R5X4 trópicos. No gânglio linfático, o vírus replica-se rapidamente e atinge outros tecidos linfóides, particularmente, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), onde células de memória T CD4⁺CCR5⁺ estão presentes em grande número e são alvos predominantes da depleção inicial de células T CD4⁺. Quase todas as células T CD4⁺CCR5⁺ são depletadas no GALT. Enquanto o HIV está replicando neste sítio e em outros tecidos linfóides, a viremia plasmática aumenta exponencialmente, podendo atingir um pico de mais de 20 milhões de cópias de RNA por mililitro de plasma, por volta do 14^o-21^o dia de infecção.

Este pico na carga viral, acompanhado por uma queda expressiva de células T CD4⁺ do sangue periférico, caracterizam o período inicial da infecção, denominada fase aguda (Figura 4.1). Logo após a viremia declina drasticamente, estabilizando-se a um determinado valor conhecido como *set point* viral, caracterizando o início da fase crônica, a qual pode durar de 8 a 10 anos e é marcada por um período de latência clínica e uma queda progressiva na contagem de células T CD4⁺. Após vários anos de infecção, ocorre um aumento da carga viral acompanhado por uma queda acentuada na contagem de linfócitos T CD4⁺, atingindo valores inferiores a 200 células/ μ L e pelo aparecimento de sintomas clínicos e infecções oportunistas, assinalando a fase sintomática, ou AIDS propriamente dita. Este perfil de evolução da doença é observado para a grande maioria dos indivíduos, embora cerca de 10-15% dos indivíduos infectados entrem na fase de AIDS após 2 a 3 anos de infecção, sendo denominados progressores rápidos. Por outro lado, existe um grupo de indivíduos (5%-15%), chamado de Não Progressores de Longo Termo (do inglês LTNP – *long term non-progressors*), que não evoluem para a AIDS mesmo após 10 a 15 anos de infecção.

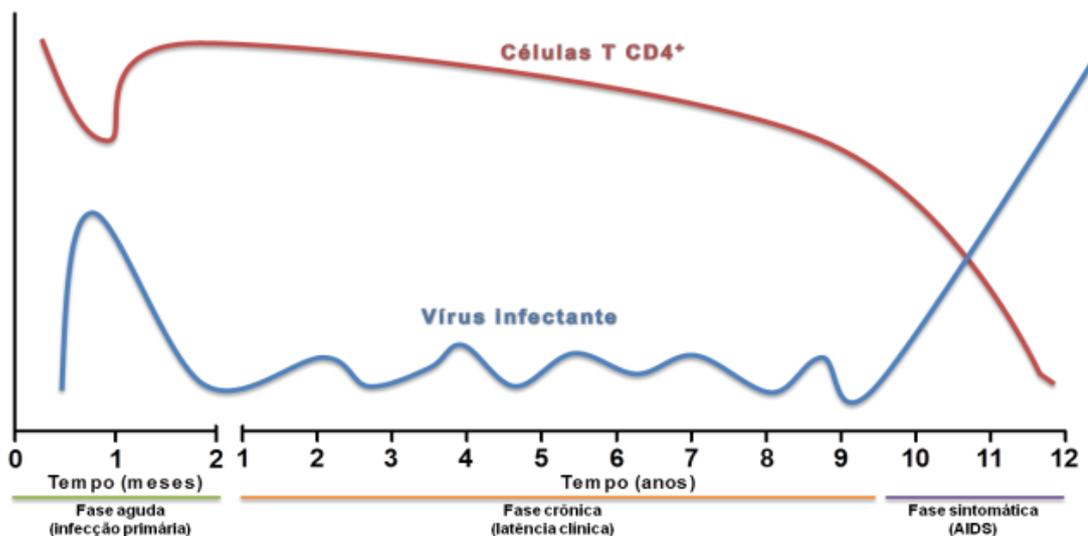


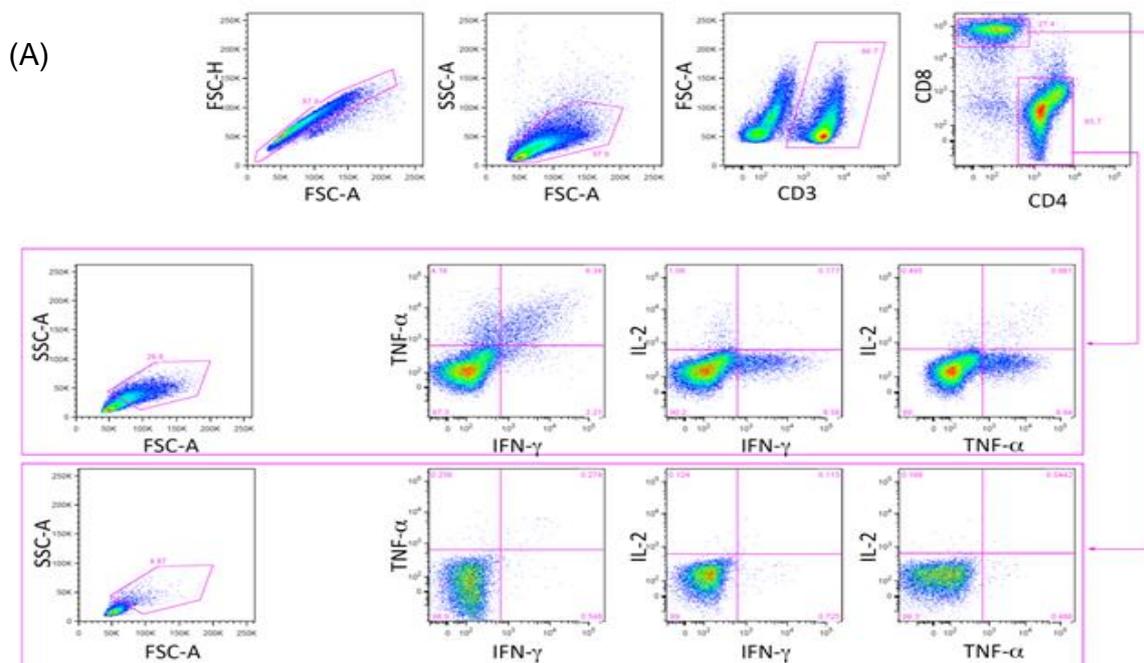
Figura 4.1: Curso natural da infecção pelo HIV

4.2 Tuberculose

A tuberculose é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e é reportada como a segunda maior causa de morte por doença infectocontagiosa no mundo, ficando atrás da infecção pelo HIV. A transmissão ocorre quando um indivíduo suscetível inala partículas infecciosas provenientes de um paciente bacilífero, ou seja, que está eliminando ativamente, através da saliva e/ou secreções respiratórias, o bacilo da tuberculose. O curso natural da infecção segue com a migração do bacilo para o sistema respiratório, devida às dependências, do mesmo, de concentrações adequadas de oxigênio. No pulmão, o *M. tuberculosis* infecta primeiramente macrófagos residentes do pulmão, multiplicando-se no interior dessas células. Se o sistema imune do hospedeiro não for capaz de recrutar uma resposta imune celular de contenção, o bacilo irá multiplicar-se ativamente em outras células do sistema fagocítico mononuclear, podendo alcançar a circulação e disseminando-se para outros sistemas, causando as chamadas formas extra-pulmonares da tuberculose. Estima-se que 1/3 da população mundial já tenha entrado em contato com o *M. tuberculosis*, mas aproximadamente 90% nunca irá desenvolver a forma ativa da doença, devido aos eficazes mecanismos de controle do sistema imune. Estudos mostram que a capacidade do indivíduo de conter a infecção está baseada no efetivo recrutamento das células T, principalmente aquelas da polaridade Th1 com a participação de TNF α e IFN- γ . Estudos em citometria de fluxo têm mostrado que é possível rastrear o perfil de ativação das células T e correlacioná-los com a fase da doença. Neste contexto, é possível mostrar que indivíduos sadios não apresentam o mesmo o perfil de ativação dos doentes em fase ativa, assim como aqueles controles, onde a população Th1 ativada mostra-se como um marcador importante nesta fase da doença. A vacina BCG é um dos principais métodos de prevenção da tuberculose, sendo a mesma uma vacina quase secular e a mais utilizada no mundo. A mesma emprega cepas de *Mycobacterium bovis*, contendo o patógeno vivo e atenuado. Quanto a proteção fornecida pela vacinação, esta é considerada limitada, conferindo proteção contra casos graves e disseminados de TB na infância. Contudo, a TB pulmonar principalmente em adultos, ainda um problema de saúde pública, apesar da extensa cobertura vacinal. Na literatura, discute-se que a melhoria na vacinação contra a TB depende, por um lado, de uma compreensão da natureza da sua imunidade protetora, por outro, de um melhor controle de qualidade da vacina, visando principalmente a sua eficácia/potência. A complexa interação de células da imunidade inata com as da adaptativa, que leva a

imunidade protetora após a vacinação, ainda não são completamente compreendidos. No entanto, esta informação pode ser crucial para o desenvolvimento de novas vacinas ou melhorar a vacina atual com relação à eficiência. Já com relação ao controle de qualidade da BCG, hoje, os ensaios preconizados pela farmacopéia são principalmente testes de viabilidade e contagem do bacilo, faltando assim ensaios que indiquem a capacidade da vacina de induzir uma resposta imunológica.

Com isso a citometria de fluxo vem sendo uma ferramenta importante para promover uma melhor compreensão da resposta imune gerada pela vacina (Figura 4.3A) através do entendimento dos mecanismos de proteção gerados pela mesma. Além disso, a citometria de fluxo também vem sendo aplicada, no intuito de propor um possível ensaio para o controle de qualidade na produção da vacina BCG (Figura 4.3B).



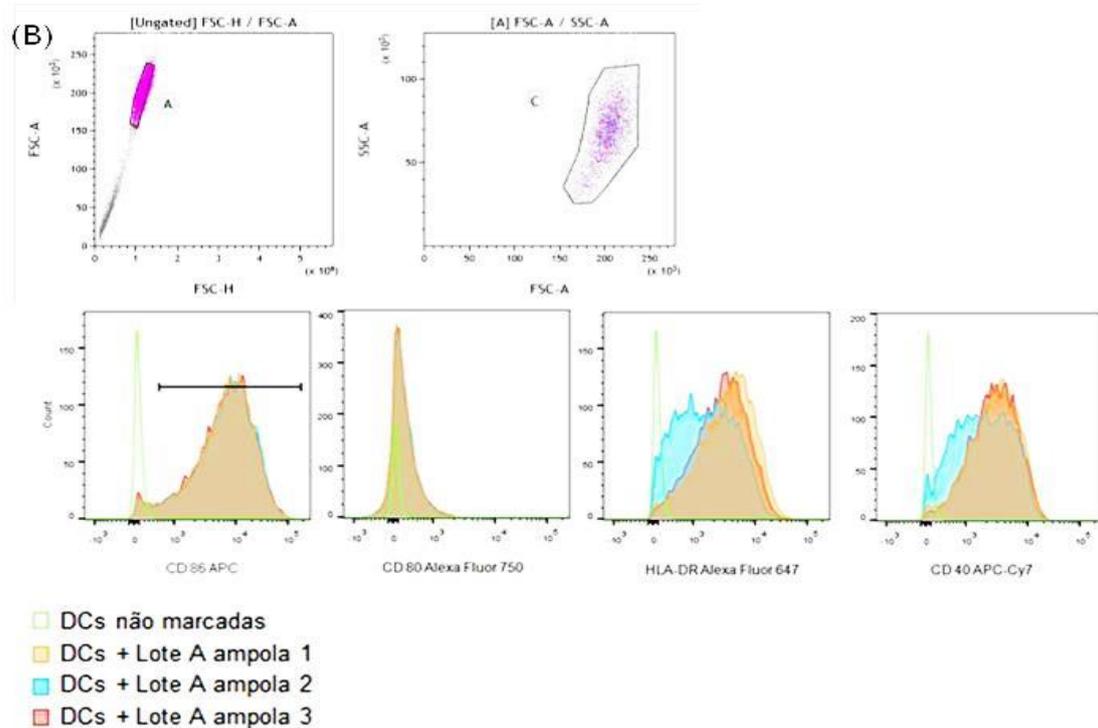


Figura 4.3: (A) Estratégia de Gates para avaliação da produção de citocinas, mais especificamente IFN- γ , TNF- α e IL-2, pelos linfócitos após infecção com BCG (Fonte: Smith *et al.*, 2015) (B) Avaliação da reprodutibilidade da vacina BCG, dentro de um mesmo lote, por meio da capacidade de maturação de células dendríticas. A maturação foi avaliada pela expressão de moléculas co-estimulatórias (CD 86, CD80 e CD40) e HLA-DR.

4.3 Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar Americana é uma infecção dermatológica polimórfica, causada por protozoários do gênero *Leishmania spp.* As leishmanioses são antropozoonoses transmitidas pelos flebotomíneos. O protozoário *Leishmania spp.* apresenta ciclo de desenvolvimento heteroxeno, com a presença de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. A transmissão para o homem envolve complexos ciclos silvestres, secundários ou peridomésticos, já que algumas espécies desse gênero são mais facilmente adaptadas ao ambiente modificado pelo homem e/ou são capazes de infectar uma larga variedade de mamíferos, dentre estes animais domésticos que agem como reservatórios da doença.

Sabe-se que a *Leishmania spp.*, assim como outros patógenos intracelulares, ativa o direcionamento da resposta imune do hospedeiro à uma polaridade do tipo Th1, com ativação das células efetoras, como macrófagos, que produzem radicais livres como óxido nítrico, para destruir o parasito. As células-alvo da *Leishmania spp.*

São células do sistema fagocítico, como macrófagos e células dendríticas, onde o parasita consegue se multiplicar ativamente no pH ácido do interior do fagolisossomo. Estudos já demonstraram que a espécie do parasito interfere diretamente nos mecanismos imunológicos do hospedeiro, evidenciando diferenças principalmente no perfil de citocinas liberadas pelas células infectadas.

Pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) possuem a imunidade celular preservada, o que é verificado pela positividade ao teste cutâneo com antígenos de *Leishmania*, conhecido como Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e por outros testes *in vitro*, tais como de proliferação celular e produção de IFN- γ frente antígenos de *Leishmania*. Esta resposta celular observada na LCL tem predominância de citocinas do tipo 1, tendendo a uma boa resposta ao tratamento e até à cura espontânea. A incapacidade do paciente de estruturar uma resposta imune celular eficaz está associada à má evolução clínica e à resposta terapêutica não satisfatória. Estudos em camundongos demonstraram que quanto mais intensa a resposta tipo 1, maior a eficiência na eliminação do parasito; enquanto uma resposta predominante do tipo 2 leva maior sobrevivência do protozoário e progressão das lesões. Entretanto, em seres humanos essa dicotomia não é tão bem definida assim, sendo observada em pacientes de leishmaniose mucosa (LM) uma intensa resposta tipo 1 que causa destruição tecidual e lesões mais agressivas. Esta dinâmica pode explicar porque o isolamento de parasitos é mais difícil em lesões antigas, já com substituição de tecido por fibrose e em lesões com alto grau de destruição, como nas formas mucosas.

Os linfócitos T CD8⁺ participam ativamente na resposta imune na leishmaniose, com função de citotoxicidade e produção de citocinas, principalmente pro-inflamatórias, sendo associados à cura da doença, principalmente em estudos de infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Neste contexto, tem sido demonstrado um menor percentual de linfócitos T CD8⁺ durante a fase ativa da infecção e este se restabelece durante o processo de cura. Ainda, Bertho e cols. (2000) observaram um maior percentual de linfócitos T CD8⁺ apoptóticos em lesões de pacientes na fase ativa da doença quando comparados a pacientes que curaram espontaneamente. Ferraz e cols. (2015) demonstraram, através da citometria de fluxo (Figura 4.4), que pacientes sob a terapia apresentam maiores percentuais de

apoptose dos linfócitos T CD8⁺ totais e efetores, o que foi também observado após cultura de estimulação com LbAg. Também mostraram que quanto maior o tamanho da lesão, menor a frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores nos pacientes com doença ativa e sob tratamento; bem como uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores em apoptose e o tamanho da lesão nos pacientes durante o tratamento (Figura 4.5). Deste modo, as alterações nas frequências dos linfócitos T CD8⁺ efetores, durante e após o tratamento, representam um estágio crítico na geração de uma resposta imune eficiente e estão envolvidas no desencadeamento ou na resolução da lesão sob a influência da terapia.

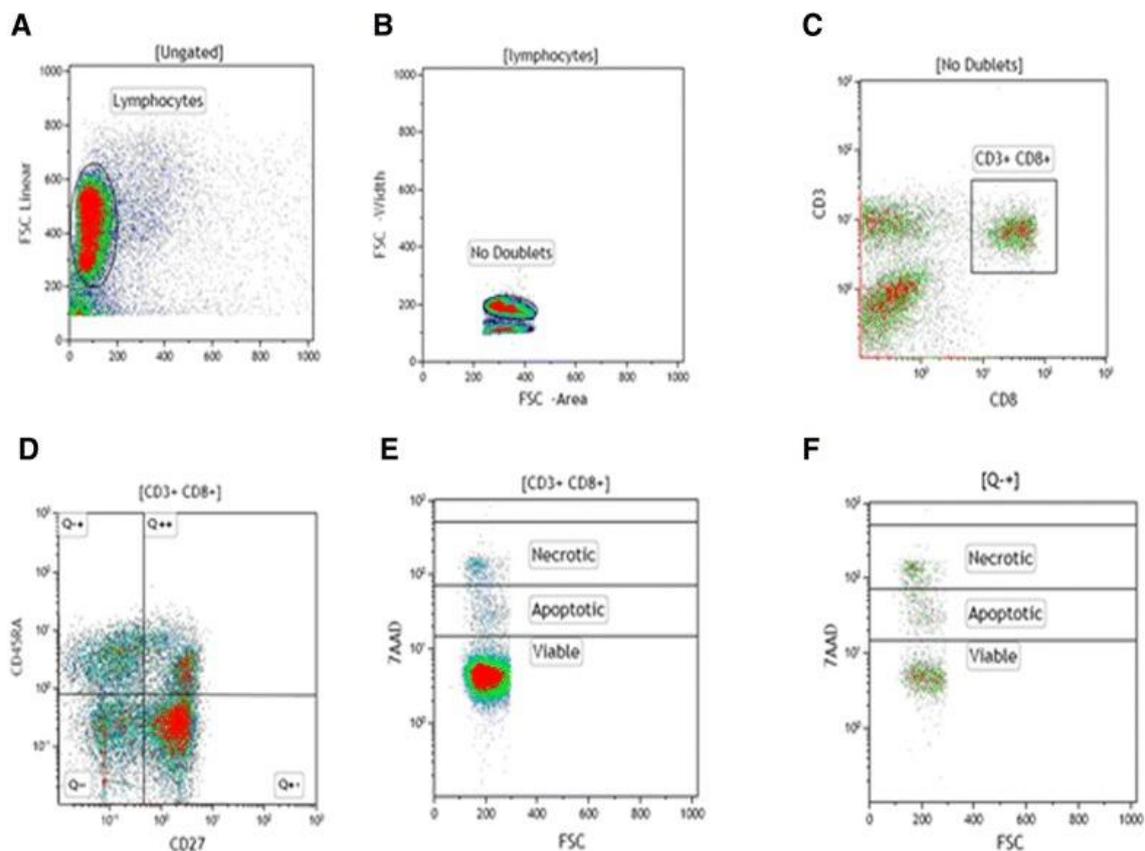


Figura 4.4: Protocolo de citometria de fluxo para determinar as frequências de subpopulações de linfócitos T CD8⁺ e apoptose. Células do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea foram marcadas ex vivo e após serem cultivadas na presença de antígenos de Leishmania, com CD3-FITC, CD8-APC, CD45RA-ECD, CD27-PE-Cy7 e 7-AAD. (A) Os linfócitos foram definidos através do *gate* no *dot-plot* de tamanho (FSC) vs granularidade (SSC); (B) Doublets foram excluídas da análise através de um *density plot* de FSC Area vs FSC Width. (D) *Dot plot* de CD27 vs CD45RA foi criado baseado no gated CD3+CD8+ region (C) e usado para definir as frequências de linfócitos T CD8⁺ efetores e naïve. A frequência de células apoptóticas (7AADlow) nos linfócitos T CD8⁺ totais e nos linfócitos T CD8⁺ efetores foram determinadas pelos *dot plots* FSC vs 7AAD (E) e (F), baseado nos gates CD3+CD8+ (C) e CD45RA⁺CD27^{neg} (D), respectivamente.

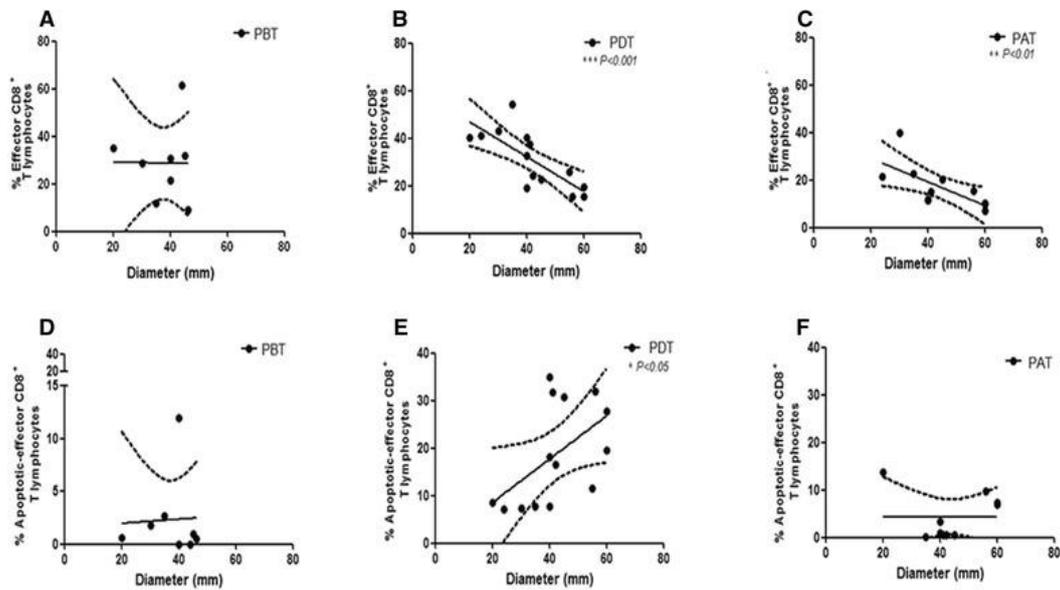


Figura 4.5: Correlação entre o percentual de linfócitos T CD8⁺ totais (A, B, C) e linfócitos T CD8⁺ apoptóticos (D, E, F) com o diâmetro das lesões (mm). (A, D) PBT – pacientes antes do tratamento; (B, E) PDT – pacientes durante o tratamento; (C, F) PAT – pacientes após o tratamento. Análises estatísticas foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman. Resultados foram considerados significantes com $P < 0.05$.

A função citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ vem sendo bastante discutida, com alguns autores relacionando-a com a progressão da doença, enquanto outros não observaram tal associação. Cunha e cols. (2016) mostraram recentemente o envolvimento de outras populações celulares, além dos linfócitos T CD8⁺, com atividade citotóxica na evolução da LCL, como os linfócitos T CD4⁺ citotóxicos, células NK e células NKT (Figura 4.6).

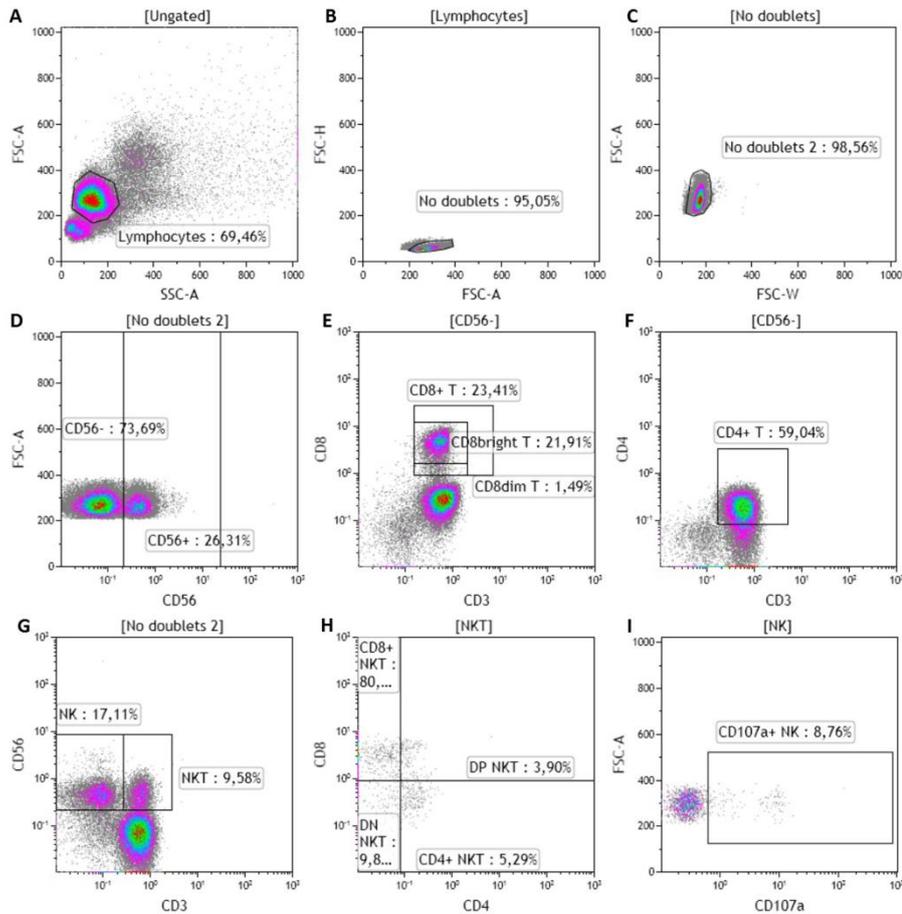


Figure 4.6: Protocolo de citometria de fluxo para determinar as frequências de subpopulações de linfócitos T CD3⁺, células NK e NKT citotóxicas. Células do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 and anti-CD107a. (A) Os linfócitos foram definidos através do *gate* no *dot-plot* de tamanho (FSC) vs granularidade (SSC); (B) Doublets foram excluídas da análise através de dois *density plots* de FSC-Area vs. FSC-Height (B) e FSC Area vs FSC Width (C) Linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ foram definidos usando CD8 vs. CD3 (E) and CD4 vs. CD3 (F) dot-plots, baseados no gated CD56^{neg} triado no *dot plot* FSC vs. CD56 dot plot (D), respectivamente. Células NK and NKT foram definidas através do *dot plot* CD56 vs. CD3 (G). Subpopulações de células NKT CD8⁺ e CD4⁺ foram definidas no dot plot CD8 vs. CD4 (H), baseado no gate NKT (G). A expressão de CD107a foi determinada no dot plot FSC vs. CD107a, baseada em cada população celular definida – representada aqui pelas células NK (I).

O papel protetor dos linfócitos T CD8⁺ foi também demonstrado em relação à sua atividade citotóxica em infecções por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, em que estes linfócitos possuem a capacidade de lisar macrófagos autólogos infectados. Ainda, foi evidenciado que linfócitos T CD8⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea difusa (LCD) apresentam uma significativa redução da capacidade citotóxica e da

produção de citocinas frente macrófagos autólogos infectados por *L. (L.) mexicana*, quando comparados com pacientes de LC.

As células T regulatórias (Tregs) são uma pequena percentagem das células T circulantes, que adquirem durante o processo de ontogenia e maturação a capacidade de regular a resposta imune inata e adaptativa por mecanismos de: supressão da proliferação de células T, via secreção de citocinas com efeito supressor (IL-10 e TGF- β 1) ou através da indução de apoptose. São mais recentes nas descrições imunológicas, mas seu papel já tem sido descrito em processos imunes associados a patógenos. Já foi demonstrado que as Tregs migram para o sítio de lesão e lá tem capacidade supressora da resposta imune, mostrado pela técnica de supressão celular e confirmado pela inibição na produção de citocinas do perfil Th1, esse estudo também foi pioneiro ao mostrar que a quantidade de Tregs na lesão diminuía progressivamente no decorrer do tempo de evolução da mesma, o que poderia explicar uma forte regulação negativa que as Tregs exercem sob as células do sistema imune nas fases iniciais da infecção, o que acabaria por acarretar uma irresponsividade do sistema imune o que poderia explicar alguns eventos de falha terapêutica na LTA.

4.4 Zika

O flavivírus Zika é o agente etiológico da doença que leva o mesmo nome. É uma arbovirose, sendo transmitido através da picada de um inseto vetor. O principal vetor dessa doença é o mosquito *Aedes aegypti* que também é o transmissor de outras arboviroses como dengue e febre amarela, além de ser também o transmissor da febre Chikungunya. Esse agente fora isolado em 1947 de um macaco sentinela em Uganda. O vírus foi classicamente descrito como causador de algumas manifestações brandas como febre, mialgia, rash cutâneo e conjuntivite, os primeiros casos relatados ocorreram principalmente na África e Ásia tendo caráter local. Em 2013, no entanto, foi declarado um dos maiores surtos dessa doença na polinésia francesa, o que acarretou em aproximadamente 70% de infecção da população. Em 2015 foi decretado situação de atenção em saúde no Nordeste do Brasil e Colômbia devido ao grande número de casos da doença, e ao registro de crianças nascidas com más formações congênitas após suas mães terem contraído a infecção por Zika durante o período gestacional.

Vários estudos têm focado na avaliação do sistema imune a fim de melhor compreender por quais mecanismos o vírus é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e causar infecção no tecido neuronal. Estudos recentes tentaram avaliar a composição do infiltrado celular após a infecção de modelo experimental com o vírus. Já foi avaliado que o melhor modelo experimental para avaliação do efeito do vírus sobre o SNC são camundongos jovens incapazes de produzir ou responder à interferons (INFAR-KO), o intuito de novos estudos é avaliar se o vírus seria capaz de causar o mesmo efeito em modelos animais ditos imunocompetentes. Mangeeswaran e cols. (2016) mostraram que o infiltrado celular é composto por macrófagos e células da micróglia ativadas, além de linfócitos T. Os principais marcadores utilizados para a avaliação do infiltrado celular foram: CD4, CD8, CD11b, CD19, Ly6G, NK1.1 e F4/80. Além da expressão de CD45 como marcador de ativação celular.

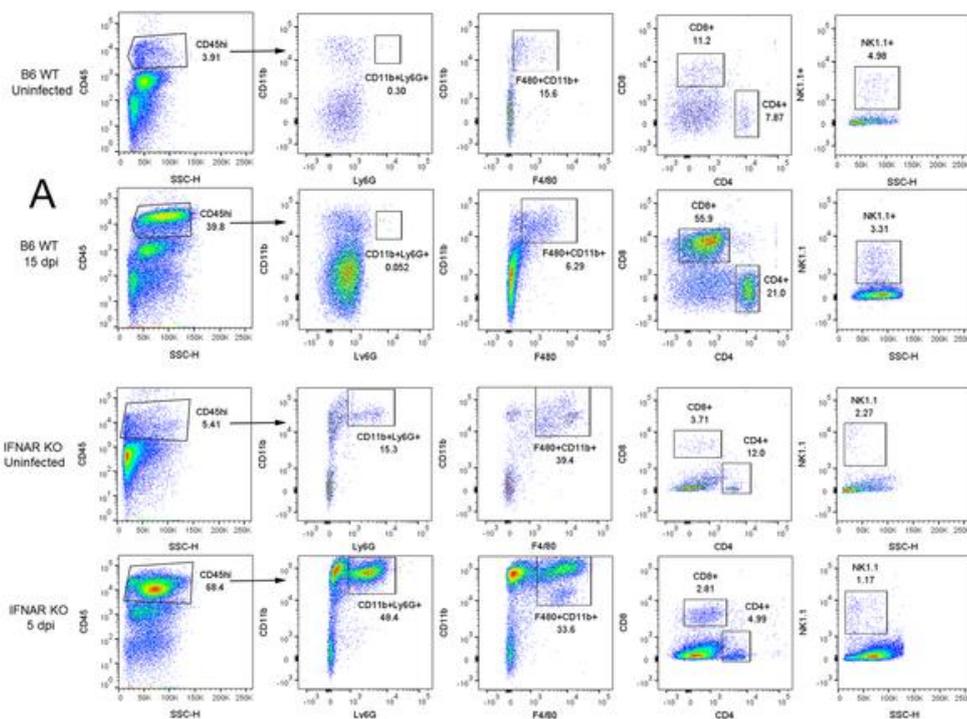


Figura 4.7: Células imunes infiltrando no SNC em resposta à infecção pelo vírus da Zika. (A) Protocolo de citometria de fluxo de células isoladas do SNC de camundongos B6 WT a IFNAR KO no 15 e 5 dia por infecção, respectivamente. As células viáveis foram definidas pela expressão de CD45. Células CD45^{hi} foram definidas através de um gate no dot plot SSC vs. CD45 e as populações de neutrófilos Ly-6G⁺, macrófagos CD11b⁺F4/80⁺, células T CD4⁺ e CD8⁺ T e células NK1.1⁺, respectivamente, foram determinadas baseadas neste gate.

CAPITULO 5. CELL SORTING POR CITOMETRIA DE FLUXO – PRINCIPIOS E APLICAÇÕES

Thaize Quiroga e 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, como já visto nos capítulos anteriores de princípios básicos e aplicações da citometria de fluxo. 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 biológicos predefinidos. Estas populações purificadas se tornam, então, disponíveis para diversas aplicações como avaliações genéticas e ensaios funcionais. Sendo assim o *cell sorting* uma ferramenta poderosa para isolar de forma precisa populações celulares, baseando-se na análise de suas características biológicas, a partir de uma amostra heterogênea. 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*.

5.1 Princípio

Existem diversas maneiras de isolar uma determinada população celular, a metodologia pode variar de acordo como o tipo celular e frequência da população desejada. Atualmente, as metodologias mais eficazes e utilizadas para purificação de células são: a separação por citometria de fluxo (FCCS – *flow cytometry cell sorting*) e kit para separação por magnetismo (MACS). A escolha da melhor metodologia a ser utilizada vai variar de acordo com tipo e percentual da célula-alvo e o objetivo do estudo.

O kit para separação por magnetismo (MACS) é uma metodologia simples, rápida e bastante eficiente para separar populações celulares que possuem uma frequência mais alta, não sendo tão eficiente para separar populações mais raras. A separação por essa metodologia é mais apropriada quando você deseja isolar uma população de acordo com apenas um ou poucos critérios de separação ou características. Devido a esse fato muitas vezes quando a população-alvo é rara (como por exemplo uma célula dendrítica plasmocitoide – pDCs - no sangue periférico) a separação por citometria de fluxo é mais indicada. Muitas vezes, para auxiliar na separação destas populações raras é feita uma

etapa de enriquecimento, podendo ser feita com MACS por ser mais rápida, e posteriormente a separação da população-alvo por citometria de fluxo. No exemplo das pDCs, pode-se a partir das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) purificar a população total de DCs por MACS (etapa de enriquecimento) e a partir das DCs purificadas, pode-se isolar as pDCs por FCCS.

O princípio da separação por MACS é bem simples, o qual as células em suspensão são colocadas em contato anticorpos monoclonais acoplados à microesferas de ferro, específicos para determinada(s) população(ões). Após essa etapa a suspensão de células é colocada em contato com um ímã, onde as células que se ligaram aos anticorpos são atraídas pelo ímã (Figura 5.1).

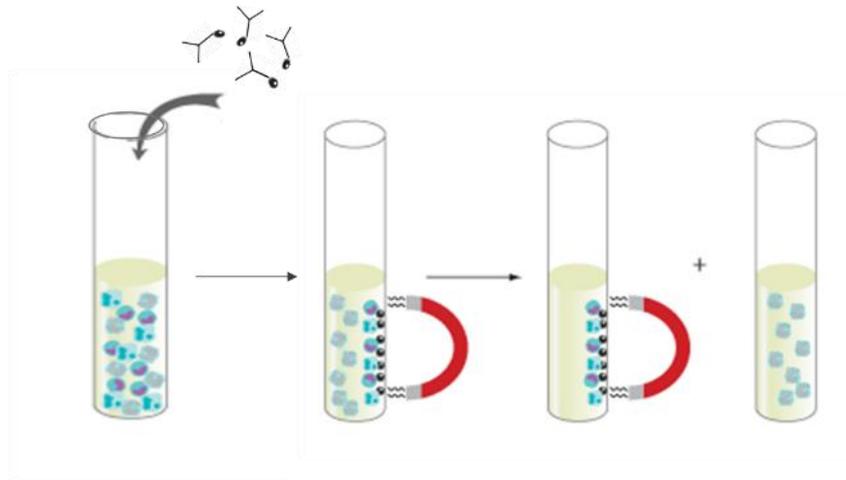


Figura 5.1: Esquema representativo de separação de células por MACS. Fonte: Adaptado de <https://www.rdsystems.com/resources/technical/magcollect-assay-principle>

Aqui, iremos focar na separação células por citometria de fluxo. Primeiramente, antes de iniciar o processo de *Cell Sorting*, é necessário a aquisição e análise da amostra, onde se defini, através de *dot plots* e/ou histogramas, as regiões de interesse (*gates*) para selecionar as populações celulares que desejamos purificar. Por exemplo, se queremos separa as duas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, primeiramente vamos adquirir amostra marcada com anti-CD4 e anti-CD8 acoplados à fluorocromos distintos para a escolha das populações de interesse (Figura 5.2).

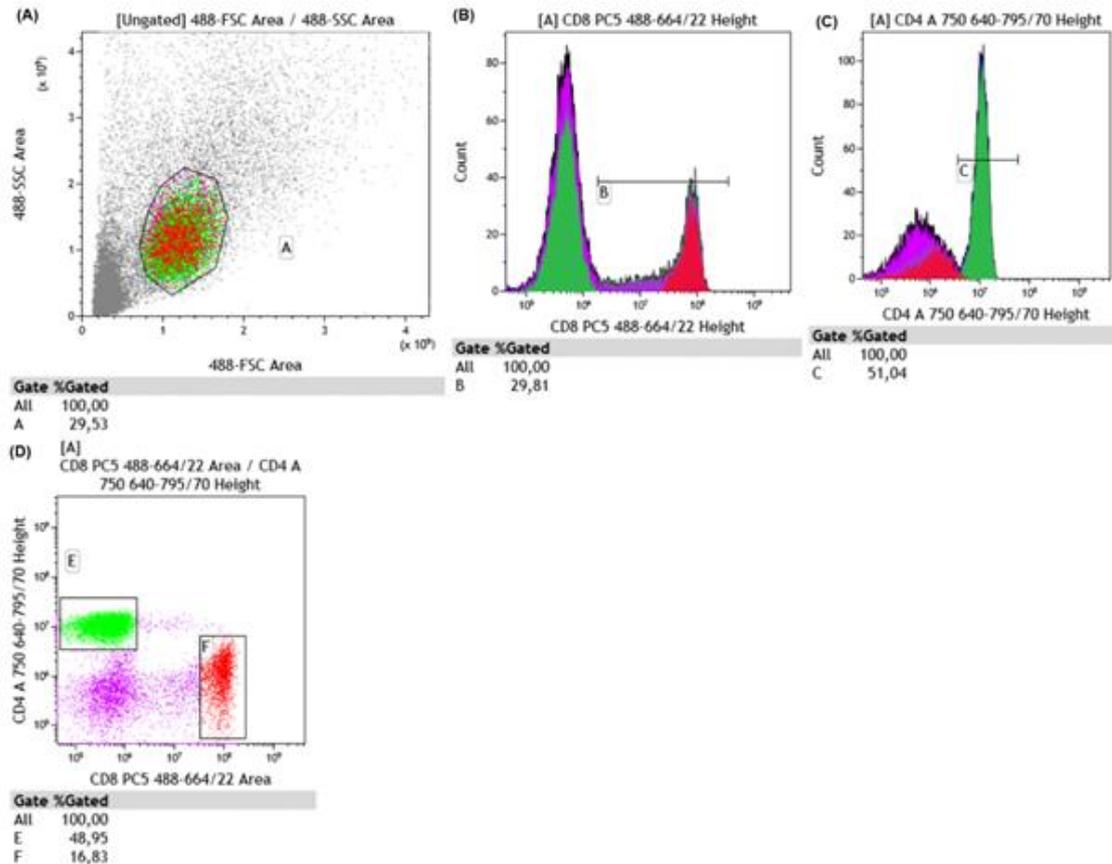


Figura 5.2: Linfócitos humanos marcados com anticorpos anti-CD8-PC5 e anti-CD4-Alexa 750. (A) *Dot plot* de morfologia (tamanho – FSC vs. granulosidade – SSC), ao qual a população de linfócitos foi selecionada (*gate A*); (B) e (C) Histogramas de CD8-PC5 e CD4-Alexa 750 onde as regiões B e C representam as populações positivas para CD8 e CD4, respectivamente, dentro da população de linfócitos (*gate A*); (D) *Dot plot* de CD8 vs. CD4, onde o *gate E* representa a população CD4⁺ e o *gate F* a população CD8⁺. Os *gates E* e *F* contêm as populações celulares escolhidas para a purificação.

Após a escolha da população a ser purificada, o processo de *Cell Sorting* se inicia e as células escolhidas serão direcionadas para tubos ou placas de cultivo de vários tipos contendo o meio apropriado. Um dos princípios iniciais para a realização do *cell sorting* é o emprego de uma vibração na câmara de fluxo (*Flow Cell*), levando o fluxo contínuo de salina a se “quebrar” em gotas (*droplets*), onde cada gota deve conter uma única célula. A frequência e a amplitude desta vibração são definidas pelo operador do equipamento, seguindo critérios de calibração pré-estabelecidos, visando uma pureza absoluta após o processo de purificação. Assim, a célula no interior de cada gota é interceptada pelo laser, suas características morfológicas e as fluorescências são emitidas para os PMTs, que por sua vez enviam pontos eletrônicos para o computador. Critérios de sorting são definidos no software de aquisição, baseado nos *dot plots* e histogramas pré-criados, cujas informações são reenviadas para a *flow cell*, aonde a mesma recebe uma carga elétrica, transferindo-a

para a gota que será separada. É importante salientar que, de fato, é a gota contendo a célula que é separada. Assim, por carregamento de elétrons, a gota selecionada recebe uma carga positiva ou negativa, dependendo do critério de seleção pré-estabelecido no software. No nosso exemplo, aonde as duas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são purificadas, cada gota contendo uma destas células (ex. LT CD4⁺) recebe uma carga positiva e outra gota contendo a outra célula (ex. LT CD8⁺) recebe uma carga negativa. Continuando, o fluxo contínuo de gotas, passam por duas placas defletoras energizadas (4000 volts) e as gotas então serão atraídas pela placa defletora com carga elétrica contrária à da gota, de forma que as gotas carregadas, ao invés de seguir o fluxo de líquido contínuo do equipamento, são defletidas, levando-as a caírem em tubos contendo meio próprio para o recebimento destas células (Figura 5.3). Devido ao tempo necessário entre a interceptação da célula pelo laser, a ida destas informações ao computador e a volta para o correto carregamento elétrico de cada gota, tem-se como objetivo principal para a calibração do citômetro de fluxo, a definição do *drop delay*. Para isso, 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, visando sempre atingir 100% de pureza de eficiência na separação homogênea das populações celulares. A eficácia do processo pode ser conferida pela própria citometria de fluxo, através de nova aquisição das células isoladas, as quais devem ser positivas somente para o parâmetro que foi selecionado. Então, no nosso exemplo após todo o processo de separação teremos um tubo contendo somente células CD8⁺ e outro contendo células CD4⁺ (Figura 5.4).

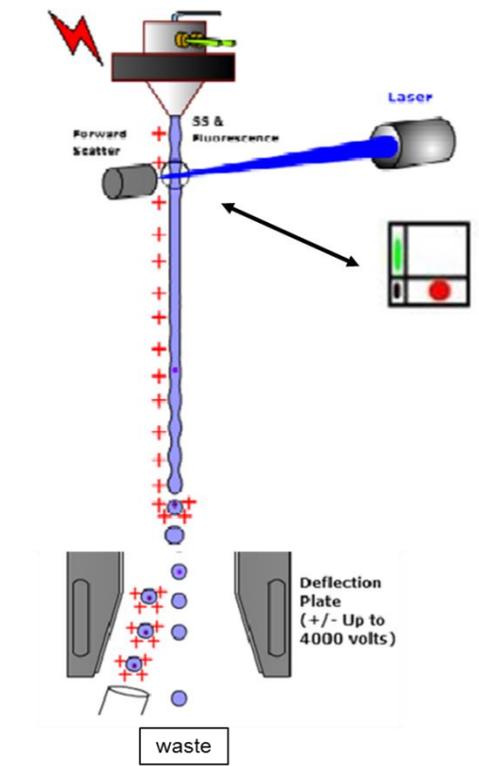


Figura 5.3: Esquema representativo de um cell sorting.

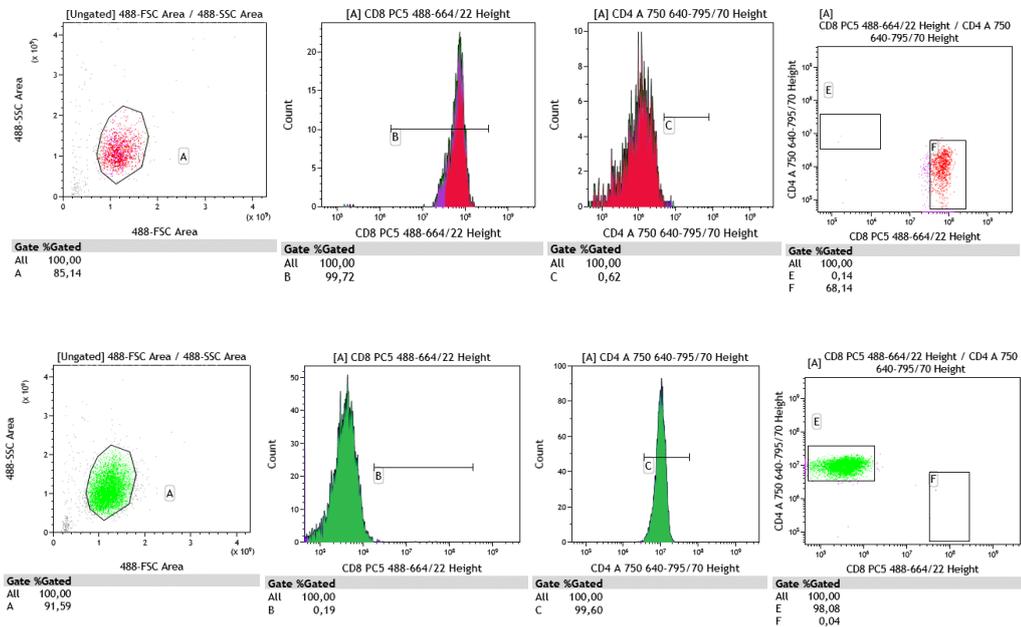


Figura 5.4: Células pós sorting, onde a primeira linha representa as células CD8⁺ e a segunda linha representam as células CD4⁺. A primeira coluna mostrando *Dot plot* de morfologia (Tamanho - FSC vs. Granulosidade - SSC) da população de linfócitos (gate A). A segunda e terceira colunas mostrando Histogramas de CD8-PC5 e CD4-Alexa 750 onde as regiões B e C representam as populações CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente, dentro da população de linfócitos (gate A). A quarta coluna mostrando *Dot plot* de CD8 vs. CD4, onde o gate E representa a população purificada CD4⁺ e o gate F a população purificada CD8⁺.

5.2 Aplicações do *cell sorting*

Existem diversas aplicações para o *cell sorting*, tanto na pesquisa básica quanto na clínica. Após a obtenção de uma amostra homogênea, viável e podendo até mesmo estar estéril essas células podem ser usadas em diversos ensaios como ensaios funcionais; seleção de células progenitoras (CD34⁺) em busca de células-tronco pluripotentes; seleção células transfectadas com um marcador de expressão, como a Green Fluorescence Protein (GFP), entre outros.

Na clínica, hoje o *sorting* é utilizado no teste pré-transplante renal, conhecido como *crossmatch*, teste de reatividade cruzada ou compatibilidade cruzada, muito utilizado para determinar o grau de compatibilidade entre receptor e doador em um transplante renal. Esse teste determina se o paciente que receberá um transplante possui anticorpos que reagem especificamente com as células do seu doador. O teste pesquisa no plasma do receptor a presença de reatividade apenas contra células particulares do doador (tipicamente linfócitos B e T). Ele mescla o plasma do receptor com linfócitos T e/ou B do doador, separados previamente por citometria de fluxo. Após incubação, durante a qual deve ocorrer a formação de complexos antígeno-anticorpo (se no soro houver a presença de anticorpos anti-HLA), adiciona-se ao sistema, uma fonte de complemento, que provoca a lise de linfócitos reconhecidos pelos anticorpos, sendo assim uma compatibilidade cruzada positiva. Tal lise indica que o doador não é apropriado para aquele receptor, o que, caso a cirurgia seja realizada, pode acarretar numa rejeição aguda do receptor, podendo levar o paciente ao óbito.

5.2.1 Sexagem de semem

A sexagem de semem por citometria de fluxo é feita pela separação de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y em duas subpopulações purificadas, baseado no conteúdo de DNA celular. Esse método mensura a quantidade de DNA de cada célula espermática pela fluorescência emitida pelo corante Hoechst 33342, que é um corante que se liga ao DNA (Figura 5.5).

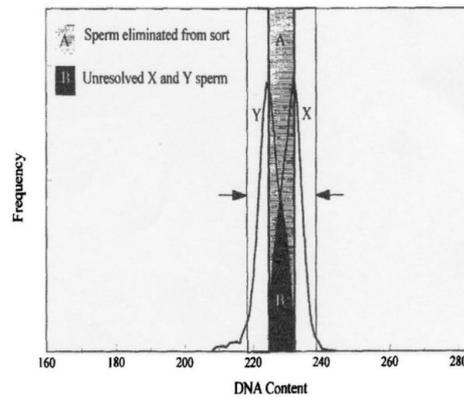


Figura 5.5: Ilustração de um histograma típico de citometria de fluxo de esperma.

O sêmen sexado se tornou comercialmente disponível em 2006, utilizando-se o método de citometria de fluxo para a separação de células. Até os dias de hoje, nenhum outro método provou ser eficaz para este fim. A separação dos espermatozoides para a produção de machos (cromossomo Y) ou fêmeas (cromossomo X) é possível devido à diferença no conteúdo de DNA dessas células (o espermatozoide que gera fêmea possui 4% mais material genético que o espermatozoide que gera macho). Com o uso da citometria de fluxo para separação de células é possível separar os dois tipos de espermatozoides com alta confiabilidade. Mamíferos produzem sêmen de forma que 50% dos espermatozoides carregam o cromossomo X e 50% carregam o cromossomo Y. Muitas diferenças teóricas entre o espermatozoide X e Y têm sido sugeridas (por exemplo, diferenças de tamanho, peso e densidade, dentre outras). Entretanto, essas diferenças são tão pequenas que atualmente é impossível medir a maioria deles de forma precisa. Assim sendo, os espermatozoides são, na prática, idênticos quanto ao tamanho, peso, velocidade, etc. Essa técnica tem se mostrado eficaz para a sexagem de sêmen bovino, com pureza acima de 90% para o sexo desejado. Entretanto, a sexagem de sêmen por citometria de fluxo ainda é um desafio para outras espécies devido a menor diferença entre a quantidade de DNA presente nos cromossomos X e Y em cada uma dessas espécies (Figura 5.6).

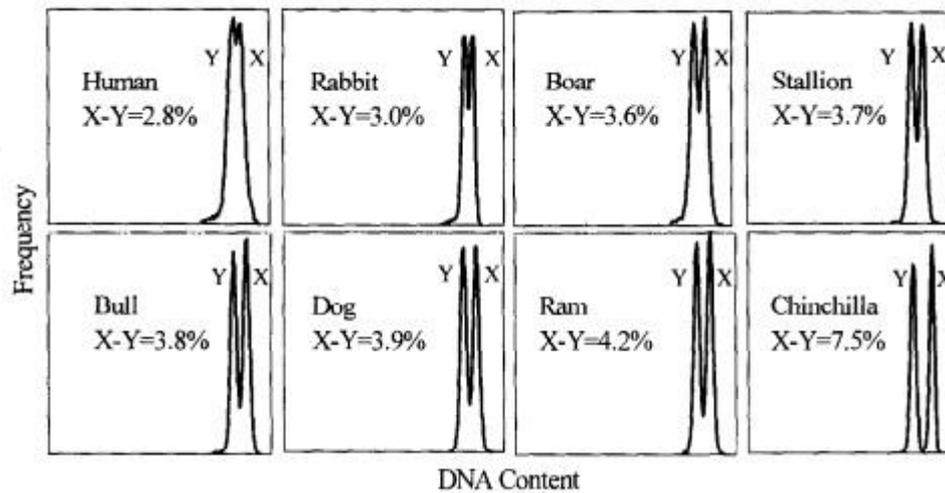


Figura 5.6: Histograma típicos de sexagem de semem por citometria de fluxo em diferentes espécies.

Para uma melhor eficiência na sexagem de semem, o citometro de fluxo convencional sofreu algumas modificações. A principal delas ocorreu na conformação estrutural da *flow cell tip* (ponteira), permitindo uma maior acurácia na avaliação do DNA dos espermatozoides, devido ao fato desta *flow cell tip* forçar os espermatozoides a passarem somente na orientação vertical quando interceptados pelo LASER (Figura 5.7).

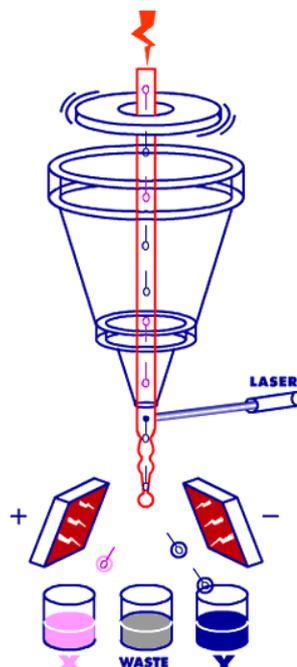


Figura 5.7: Esquema de um citometro-*cell sorter* modificado para sexagem de semem, mostrando que com a modificação da ponteira os espermatozoides passam sempre na orientação vertical.

5.2.2 Single Cell Sorting - Clonagem

Em alguns citômetros de fluxo *cell sorters* 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, após o *single cell sorting*, em ensaios funcionais *in vitro* ou de biologia molecular. Além disso, a clonagem pode ser feita a partir de células para, por exemplo, produção de anticorpos monoclonais ou para ensaios *in vitro* que vise estudar populações celulares oriundas de um clone celular. Geralmente neste processo, cada célula é direcionada para um poço de uma placa de cultivo (96 poços) e para isso o citômetro de fluxo deve ter além do suporte específico para a placa, permitindo a sua movimentação para que cada poço receba a única célula, um software específico para calcular o direcionamento da mesma (Figura 5.8).

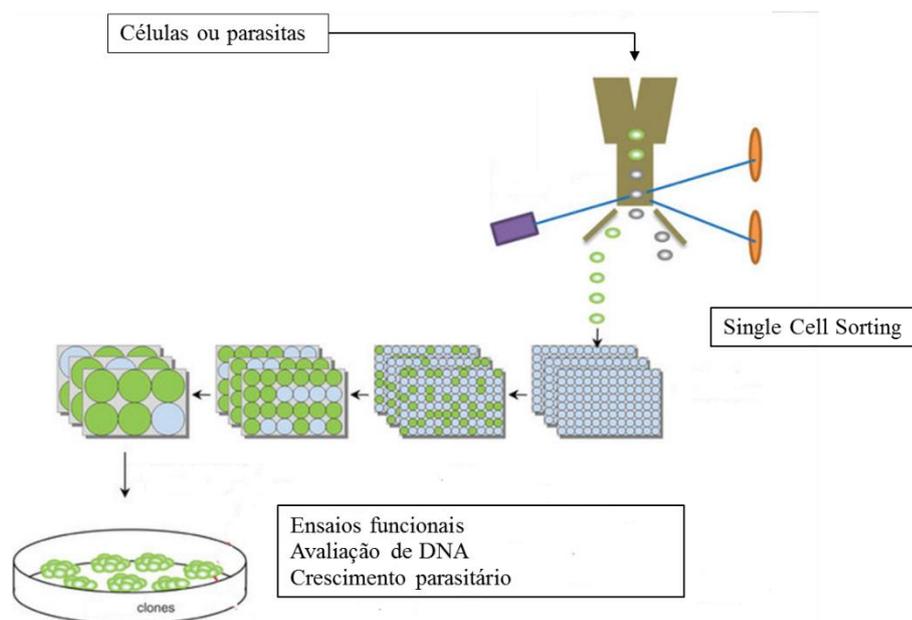


Figura 5.8: Esquema de clonagem por citometria de fluxo. Placa de cultivo em movimento para que cada poço receba uma única célula. A partir do *single cell sorting*, clones serão expandidos e podem ser submetidos a ensaios funcionais e de biologia molecular.

6. REFERÊNCIAS:

LIVROS

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

Azeredo-Coutinho R, Mendonça S 2014. Formas clínicas das leishmanioses tegumentares nas Américas. Conceição-Silva Fátima, Alves Carlos. *Leishmanioses do continente americano, Brasil* 311-322.

Bertho AL, Ferraz R. *Citometria de Fluxo: Princípios Metodológicos de Funcionamento*. In: Maria Mirtes Sales, Dewton de Moraes Vasconcelos. *Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa*. São Paulo> Editora Atheneu, 2013. p. 3-19

Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Szatanek R, and Siedlar M. *Application of Flow Cytometry in the Studies of Microparticles*. <http://www.intechopen.com/>

Cunha CF, Côrtes FH, Ferraz R, Flores GL, Sánchez-Arcila JC, Silva TP. *Citometria de Fluxo: Imunofenotipagem e Avaliação da Produção de Citocinas*. Apostila. Rio de Janeiro. 2012.

Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA. *Methods in Cell Biology*. Volume 41 *Flow Cytometry*. 2nd Ed. Part A. Academic Press: 1994. 591 p.

Da-Cruz AM, Pirmez C 2005. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Coura, José. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Brasil* 697-712.

Peçanha-Brazil R, Brazil B 2014. Vetores na leishmaniose tegumentar Americana. Conceição-Silva Fátima, Alves Carlos. *Leishmanioses do continente americano, Brasil* 194-198.

Janeway, CA; Travers, P; Walport, M e Shlomchik; MJ. *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease*. 5. Ed. New York: Garland Science; 2001.

Janeway, CA; Travers, P; Walport, M. Tradução Ana Paula Franco Lambert e cols. *Imunobiologia*. 7ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010

Maria Mirtes Sales, Dewton de Marais Vasconcelos. *Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa*. São Paulo> Editora Atheneu, 2013. p. 3-19

Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. Flow Cytometry and Sorting. Wiley-Liss, 1990. 836p.

Peakman, M; Vergani, D. Imunologia Basica e Clínica. 2ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Robinson JP, editor. Handbook of Flow Cytometry Methods. New York: Wiley-Liss; 1993.

Sack U, Tárnok A, Rothe G. Cellular Diagnostics. Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. Karger: 2009. 738p.

Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 4th ed. Wiley-Liss; 2003. 736 p.

Stewart CC, Janet KA. Nicholson, Editors. Immunophenotyping. John Wiley & Sons; 2000.

Vaz AJ, Takei K, Bueno EC. Imunoensaios: Fundamentos e Aplicações. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem. 2000;46(8 Pt 2):1221-9. Epub 2000/08/06.

Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pralong F, Martin R, Schutz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C. Presence of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania guyanensis Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. The Journal of Infectious Diseases. 2016; 2013: 105-111.

Cunha CF, Ferraz R, Pimentel MI, Lyra MR, Schubach AO, Da-Cruz AM, Bertho AL. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. Parasite Immunol. 2016 Apr;38(4):244-54. doi: 10.1111/pim.12312.

Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. J Invest Dermatol. 2010 May;130(5):1329-36. doi: 10.1038/jid.2009.428.

Dos-Santos MC, Matos-Gomes N, Makimoto FH, Katsurayama M, Santana LL, Becker MA, Paredes-Garcia E, Bertho AL. Cell phenotyping in saliva of individuals under psychological stress. *Cell Immunol.* 2009;260(1):39-43.

doi:10.1016/j.cellimm.2009.08.002.

Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MI, Lyra MR, Schubach AO, Mendonça SC, Da-Cruz AM, Bertho AL. T-cell receptor V β repertoire of CD8+ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Aug;110(5):596-605. doi: 10.1590/0074-02760150039.

Ferraz R, Cunha CF, Gomes-Silva A, Schubach AO, Pimentel MI, Lyra MR, Mendonça SC, Valete-Rosalino CM, Da-Cruz AM, Bertho AL. Apoptosis and frequency of total and effector CD8+ T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients during antimonial therapy. *BMC Infect Dis.* 2015 Feb 19;15:74. doi: 10.1186/s12879-015-0799-x.

Garner D.L., G.E. Seidel Jr. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69 (2008), pp. 886-895.

Garner D.L., B.L. Gledhill, D. Pinkel, S. Lake, D. Stephenson and M.A. Van Dilla et al., Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing sperm of domestic animals by flow cytometry, *Biol Reprod* 28 (1983), pp. 312-321.

Mangeeswaran M, Ireland D, Verthelyi D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. *PLoS Pathog.* 2016; 12(11).

Mendes-Aguiar Cde O, Gomes-Silva A, Nunes E Jr, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto Mde P, Bertho AL, Da-Cruz AM. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2009 Sep;157(3):377-84. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03970.x.

Nikolova M, Markova R, Drenska R, Muhtarova M, Tadorova Y, Dimitrov V, Taskov H, Saltini C, Amicosante M. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mycobacteriology.* 2013; 75: 277-281.

Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJ, Bertho AL, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous Leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. *PLoS One.* 2013 Nov 26;8(11):e81529. doi: 10.1371/journal.pone.0081529.

Santiago MA, Ribeiro FC, Mouta-Confort E, Nascimento LD, Schubach Ade O, Madeira Mde F, Bertho AL. Differentiation between canine cutaneous and visceral leishmaniasis by the detection of immunoglobulin G specific for *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens using flow cytometry. *Vet Parasitol.* 2008 Jul 4;154(3-4):341-6. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.009.

Santiago M, de Paula Fonseca E, Fonseca B, da Silva Marques CF, Domingos da Silva E, Bertho AL, Nogueira AC. Flow Cytometry as a Tool for Quality Control of Fluorescent Conjugates Used in Immunoassays. *PLoS One.* 2016 Dec 9;11(12):e0167669. doi: 10.1371/journal.pone.0167669.

Seidel Jr. G.E., C.H. Allen, L.A. Johnson, M.D. Holland, Z. Brink and G.R. Welch et al., Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed sperm. *Theriogenology* 48 (1997), pp. 1255-1264.

SÍTIOS NA INTERNET:

<http://www.bdbiosciences.com>

<https://www.beckmancoulter.com/>

<http://www.biolegend.com/>

<https://www.merckmillipore.com/>

<http://www.sonybiotechnology.com/>