



CURSOS DE FÉRIAS do Instituto Oswaldo Cruz

edição inverno **2023**

CITOMETRIA DE FLUXO: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES NA PESQUISA CIENTÍFICA



2023

COORDENADOR

ALVARO LUIZ BERTHO, PhD: Bacharelado em Biomedicina pela Universidade do Rio de Janeiro - UNI-RIO (Rio de Janeiro - RJ). Mestre em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ; Doutor em Ciências pelo Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Ex-Consultor Científico no Setor de Imunologia do Laboratório Dr. Sérgio Franco (1996 a 2002). Ex-Consultor Científico no Setor de Imunogenética do Laboratório Dr. Sérgio Franco (2002 a 2003). Ex-Professor Adjunto da disciplina de Imunologia Clínica no Curso de Biomedicina na Universidade Severino Sombra (Vassouras, RJ - 2005 a 2012). Pesquisador Titular em Saúde Pública no Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Pioneiro em Citometria de Fluxo no Brasil. Coordenador da Plataforma de Citometria de Fluxo, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ desde 1989. Especialização nas áreas de Imunologia, Citometria de Fluxo, Imunoparasitologia. Membro da International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) (desde 1991), da Sociedade Brasileira de Imunologia e da International Society for Extracellular Vesicles (ISEV).

DOCENTES

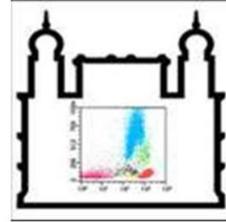
ANDRESSA DA SILVA CAZOTE, Mestre: Graduada em Ciências Biológicas pela Fundação Técnico-Educacional Souza Marques. Mestre em Ciências pelo curso de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Rio de Janeiro – RJ), área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle. Atualmente, é doutoranda em Ciências pelo curso de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Desenvolve a tese intitulada “Imunopatogênese da tuberculose ganglionar na associação HIV/TB: avaliação da participação das subpopulações de linfócitos T $\gamma\delta$ na contenção do *Mycobacterium tuberculosis* em pessoas vivendo com HIV”, sob orientação da Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp, no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular – FIOCRUZ.

KATHERINE KELDA GOMES DE CASTRO, Doutora.: Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Especialista em análises clínicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Mestre em Ciências pelo programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Doutora em Ciências pelo programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ) - área de concentração: Imunologia e Patogenia das doenças infecciosas. Atualmente é biotecnologista da Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*cell sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

VANESSA FERNANDES DE ABREU COSTA, Mestre.: Graduada em Biomedicina pelo Instituto Brasileiro de Medicina e Reabilitação – IBMR (Rio de Janeiro – RJ). Realizou 1 ano de Iniciação Científica no Lab. de Imunoparasitologia no Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ e 3 anos de Treinamento e Capacitação Técnica em Citometria de Fluxo na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ. Mestre em Ciências pelo Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, com dissertação intitulada “Detecção, caracterização e papel das vesículas extracelulares na resposta imune de pacientes de leishmaniose tegumentar americana: na fase ativa, durante o tratamento e após a cura clínica da doença”. Atualmente, trabalha como Especialista em Citometria de Fluxo na Plataforma de Citometria de Fluxo, no Beth Israel Deaconess Medical Center / Harvard Medical School.

MELISSA SILVA GONÇALVES PONTE, Mestranda: Graduada em Biomedicina pelo Instituto Brasileiro de Medicina e Reabilitação – IBMR (Rio de Janeiro – RJ). Foi bolsista no programa de Treinamento e Capacitação Técnica (TCT) da FAPERJ, trabalhando na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ, onde participou do projeto “Contribuição das vesículas extracelulares na resposta imune de pacientes de leishmaniose cutânea.”. Atualmente é mestranda pelo programa de Pós-graduação Stricto-sensu em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), área de concentração: Imunologia e Patogenia.

INICIATIVA E REALIZAÇÃO



Plataforma de Citometria de Fluxo
Núcleo de Purificação Celular – *Cell Sorting*
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ
Rio de Janeiro - Brasil

PREFÁCIO

A Citometria de Fluxo é uma tecnologia que tem sido aplicada principalmente nas áreas da Imunologia, Hematologia, Imunogenética, Microbiologia, Biologia Marinha, sendo utilizada em diversas instituições de pesquisas e em laboratórios de medicina diagnóstica. 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, de maneira resumida, os aspectos básicos da citometria de fluxo envolvidos no estudo de algumas doenças, o Curso de Férias do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, tem como objetivo apresentar, de uma maneira mais abrangente e detalhada, fundamentos da Imunologia e da Citometria de Fluxo. Serão abordados os princípios teórico-práticos e algumas aplicações da Citometria de Fluxo, com ênfase na identificação de diversas populações celulares e seus perfis funcionais associados à ativação, proliferação e papel destas células na resposta imune de algumas doenças infecto-parasitárias. Este material deve ser utilizado não somente durante o Curso, mas também para despertar, no aluno de graduação, interesse e novas ideias em estudos futuros que envolvam a Citometria de Fluxo.

Alvaro Luiz Bertho

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. BREVE HISTÓRICO DA CITOMETRIA DE FLUXO	1
CAPÍTULO 2. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA	4
2.1. Introdução.....	4
2.2. Imunidade Inata.....	4
2.3. Imunidade Adaptativa	9
2.4. Produção de Anticorpos Monoclonais (Hibridomas)	16
CAPÍTULO 3. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO	19
3.1. A Citometria de Fluxo.....	19
3.2. Fluoróforos e <i>LASERs</i>	20
3.3. Sistema Ótico	27
3.4. Sistema Eletrônico	30
3.5. Princípios de Funcionamento	30
3.6. Programas Computacionais Especializados - <i>Flow Cytometry Softwares</i>	35
3.7. Titulação de anticorpos	39
3.8. Compensação de cores	39
3.9. Controles	41
3.10. Exclusão de <i>doublets</i>	43
CAPÍTULO 4. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO	47
4.1. Distinção de populações celulares	47
4.2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo	48
4.3. Avaliação do conteúdo de DNA	54
4.4. Morte Celular – Apoptose	58
4.5. Proliferação celular.....	60
4.6. Ensaio funcionais	61
4.7. <i>Bead-based immunoassay</i>	62
4.8. Análises de Vesículas Extracelulares.....	64
4.9. Nanopartículas	66
4.10. Análise de microrganismos	69
4.11. Interação parasito-célula hospedeira.....	69
4.12. Microbiologia marinha	70
4.13. Vacinas.....	71
4.14. Citometria de Fluxo Espectral.....	73
4.15. Citometria de Fluxo de Imagem.....	75

CAPÍTULO 5. CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA AO ESTUDO DAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS	80
5.1. AIDS e Infecção pelo HIV	80
5.2. Covid-19	86
5.3. Hanseníase	91
5.4. Leishmaniose Tegumentar Americana	98
5.5. Malária	110
CAPÍTULO 6. CELL SORTING POR CITOMETRIA DE FLUXO – PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES	120
6.1. Exemplos de <i>cell sorting</i>	121
6.2. Princípios do <i>cell sorting</i> por citometria de fluxo	122
6.3. Aplicações do <i>cell sorting</i> por citometria de fluxo.....	124
6.3.1. <i>Crossmatch</i>	124
6.3.2. Pesquisa científica.....	125
6.3.3. Sexagem de sêmen.....	126
6.3.4. Single Cell Sorting – Clonagem	128

CAPÍTULO 1. BREVE HISTÓRICO DA CITOMETRIA DE FLUXO

Alvaro Luiz Bertho

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, principalmente na bacteriologia, na imunologia e na hematologia entre outras. Ainda, a associação de anticorpos monoclonais às substâncias fluorescentes possibilitou uma maior especificidade na identificação dos componentes celulares, com consequente classificação mais detalhada das células. Posteriormente, o surgimento de vários tipos de *LASERs*, o desenvolvimento eletrônico e da ciência computacional foram fundamentais para a evolução dos citômetros de fluxo e suas aplicações.

Devido ao constante aprimoramento destes equipamentos, atualmente podemos encontrar no mercado citômetros de fluxo equipados com até sete *LASERs*; com cada vez mais fotossensores, capazes de detectar até 32 parâmetros em uma única célula; e Citômetros de Fluxo *Cell Sorters* (purificadores de células), capazes de separar até 6 populações celulares homogêneas diferentes a partir de uma população heterogênea, permitindo uma maior investigação das características funcionais e genéticas das populações purificadas. Ao longo dos anos, pôde-se perceber a evolução dos equipamentos no que tange às características e particularidades dos *LASERs*, número e sensibilidade dos fotossensores, *softwares* específicos de análise, a eficiência e pureza nos procedimentos de *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 1.1), foi instalado no então Departamento de Protozoologia, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.



Figura 1.1 - 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, vem apresentando um exponencial crescimento na 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 no Brasil.

Na medicina diagnóstica, a utilização destes equipamentos aumentou significativamente a partir de 1992, a partir da implementação de citômetros de fluxo analíticos registrados para uso em diagnósticos. Como exemplo temos a determinação do Ministério da Saúde do Brasil, estabelecendo que todo laboratório de medicina diagnóstica, que prestasse serviço para a rede CD4/CD8 AIDS, deveria possuir um citômetro de fluxo para avaliar a proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes HIV positivos, no monitoramento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART). Além disso, os laboratórios que se propõem a investigar algumas desordens hematopoiéticas, como leucemias e linfomas, passaram a utilizar estes equipamentos como ferramenta na confirmação diagnóstica destas enfermidades.

Na pesquisa científica, o caráter multi-aplicativo da Citometria de Fluxo tornou-a a ciência de escolha nas avaliações fenotípicas e funcionais em contextos imunoparasitológicos e de biologia celular. Devido ao alto valor de investimento nesses equipamentos, surgiu a necessidade da criação de Plataformas Multiusuários de Citometria de Fluxo, nas quais se concentram alguns equipamentos de modo a oferecer

essa tecnologia para atender a comunidade científica intra e interinstitucional. Pensando desta maneira, a FIOCRUZ investiu ao longo destes 35 anos no aprimoramento do parque tecnológico em citometria de fluxo, com aquisição de vários citômetros de fluxo espalhados pelas Unidades Federativas da Instituição.

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

- Plataforma de Citometria de Fluxo Analítica do Instituto Oswaldo Cruz, com dois citômetros de fluxo – FACS Calibur (BD) e CytoFlex S (Beckman Coulter).
- Plataforma de Citometria de Fluxo de Purificação Celular (*Cell Sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz, com um citômetro de fluxo *cell sorter*: MoFlo ASTRIOS EQ *Cell Sorter* (Beckman Coulter).
- Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ – com um citômetro de fluxo: FACS Aria *Cell Sorter* (BD).

Além dos equipamentos das plataformas, a FIOCRUZ-RJ ainda possui no seu parque tecnológico outros citômetros de fluxo, como: Accuri C6 *Analyzer*, FACS Verse, FACSCanto, FACSCelesta, FACSMelody, FACSSymphony (todos BD Bioscience); CytoFlex (Beckman Coulter) instalados em laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC); Gallios *Analyzer* (Beckman Coulter) instalado no Instituto Nacional de Infectologia (INI), LSRFortessa (BD) instalado em Biomanguinhos e um CytoFlow (ParTec) no Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS).

Atualmente, outras empresas vêm entrando no mercado da citometria de fluxo, com a comercialização de citômetros cada vez mais avançados, como a Sony Biotechnology (SH800Z *Cell Sorter*), a ThermoFisher Scientific (Attune) e a Cytex BioSciences (Aurora). Além disso, novas tecnologias, e uma nova abordagem da citometria de fluxo vêm sendo explorada: a citometria de fluxo com imagem (Image Flow Cytometry), a Citometria de Fluxo Espectral (Spectral Flow Cytometry e a Citometria de fluxo Nanométrica (Nano Flow Cytometry). Estas abordagens agregam recursos de análises de última geração visando uma versatilidade na obtenção de resultados e na análise de partículas de dimensões nanométricas como vesículas extracelulares, vírus e bactérias.

CAPÍTULO 2. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA

Alvaro Luiz Bertho

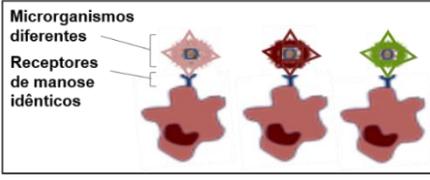
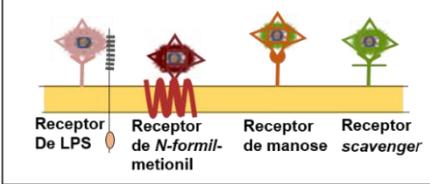
2.1. Introdução

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, mesmo após certas intervenções terapêuticas contra agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos e protozoários), pode ocorrer falha do benefício esperado para estabelecer o controle da infecção. Em geral, a eficiência da resposta imunológica para promover o controle e a proteção contra microrganismos é dependente da sinergia entre células das linhagens mieloides e linfoides, as quais integram a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa.

2.2. Imunidade Inata

A resposta imune inata ou imunidade inata atua como uma primeira linha de defesa contra os microrganismos invasores. 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 de uma 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 sequências CpG de DNA de bactérias; 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 2.1).

Tabela 2.1 - Especificidade da Imunidade Inata.

Imunidade inata	
Especificidade	<p>Para estruturas compartilhadas por classes de microrganismos ("padrões moleculares")</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;"> <p>Microrganismos diferentes</p> <p>Receptores de manose idênticos</p>  </div> <p>Codificados na linhagem germinativa; Diversidade limitada</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 5px 0;">  <p>Receptor De LPS Receptor de N-formil-metionil Receptor de manose Receptor scavenger</p> </div>
Distribuição dos receptores	Não-clonal: receptores idênticos em todas as células de uma mesma linhagem
Distribuição entre "próprio" e "não-próprio"	Sim: células do hospedeiro não são reconhecidas ou Podem expressar moléculas que evitam as reações de imunidade inata

Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

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 *natural killer* (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 2.2).

Tabela 2.2 - 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 efetoras circulantes	
Neutrófilos	Fagocitose inicial e morte de microrganismos
Macrófago	Fagocitose eficiente e morte de microrganismos, secreção de citocinas que estimulam a inflamação
Células NK	Lise de células infectadas, ativação de macrófagos
Proteínas efetoras circulantes	
Complemento	Morte do microrganismo, opsonização de microrganismo, ativação de leucócitos
Lectina ligada a manose (colectina)	Opsonização de microrganismos, ativação de complemento (via da lectina)
Proteína C reativa (pentraxina)	Opsonização do microrganismo, 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 macrófago
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

Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

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), que consistem num mecanismo *post-mortem*, onde os neutrófilos projetam uma rede constituída por material nuclear e grânulos intracitoplasmáticos, que possuem alto potencial inflamatório capazes de capturar os microrganismos. Por outro lado, caso não seja recrutado para um local de inflamação, os neutrófilos circulam no sangue por apenas seis horas, 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, interstício dos órgãos parenquimatosos, revestimento dos sinusóides vasculares do fígado e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos. Nestes locais desempenham 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 2.1).

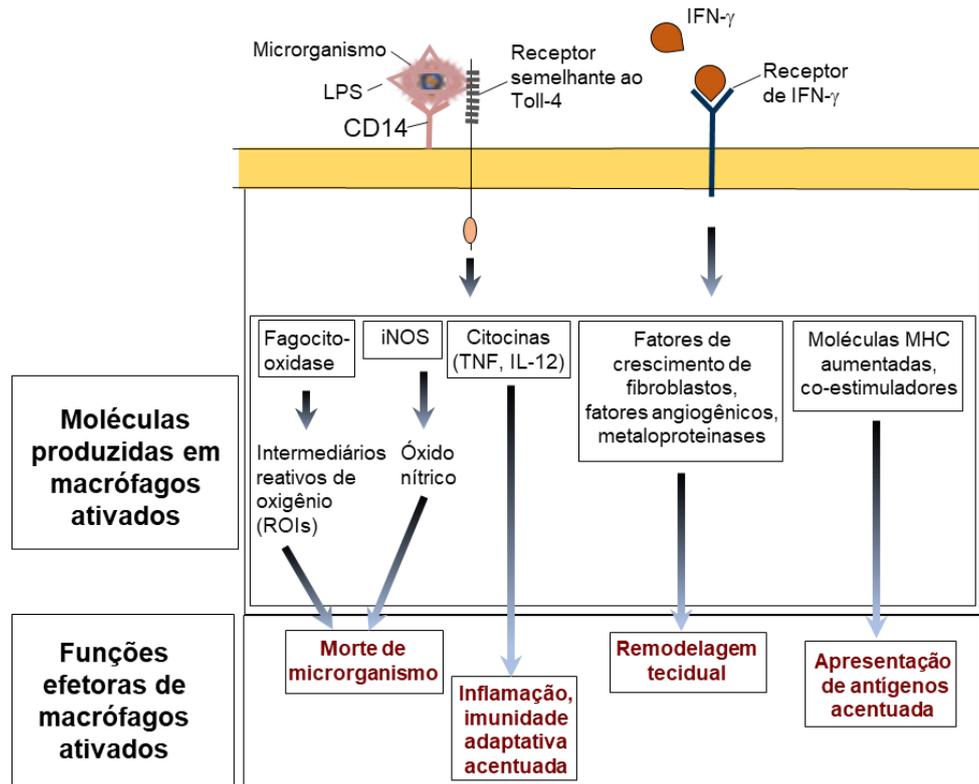


Figura 2.1 - Funções efetoras dos macrófagos, adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As células *Natural Killer* constituem uma subpopulação linfocitária que não expressa receptores TCR, 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). Os receptores de inibição de células NK se ligam a moléculas de MHC de classe I próprias, as quais são expressas em células normais. O conceito de balanço entre sinais inibitórios e de ativação para a regulação das respostas das células NK é extremamente simplificado, 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 a favor da inibição. A expansão, produção de citocinas e atividade citolítica de células NK também pode ser estimulada 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, induzindo apoptose ou através da secreção de IFN-γ, que induz atividade microbida 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.

2.3. 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. Ambos 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 os linfócitos B são capazes de reconhecer especificamente antígenos na superfície celular e secretar anticorpos capazes de reconhecer antígenos solúveis.

Os anticorpos são glicoproteínas globulares com função imunitária e pertencem à superfamília das imunoglobulinas que são produzidos por linfócitos B ativados (plasmócitos). A ação dos anticorpos desencadeia vários mecanismos na fase efetora da resposta imune que, frequentemente, resultam em anular a ação dos microrganismos, por meio da ativação do sistema complemento, opsonização dos antígenos para fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), onde os anticorpos marcam os microrganismos para serem destruídos pelas células do sistema imune inato (Figura 2.2).

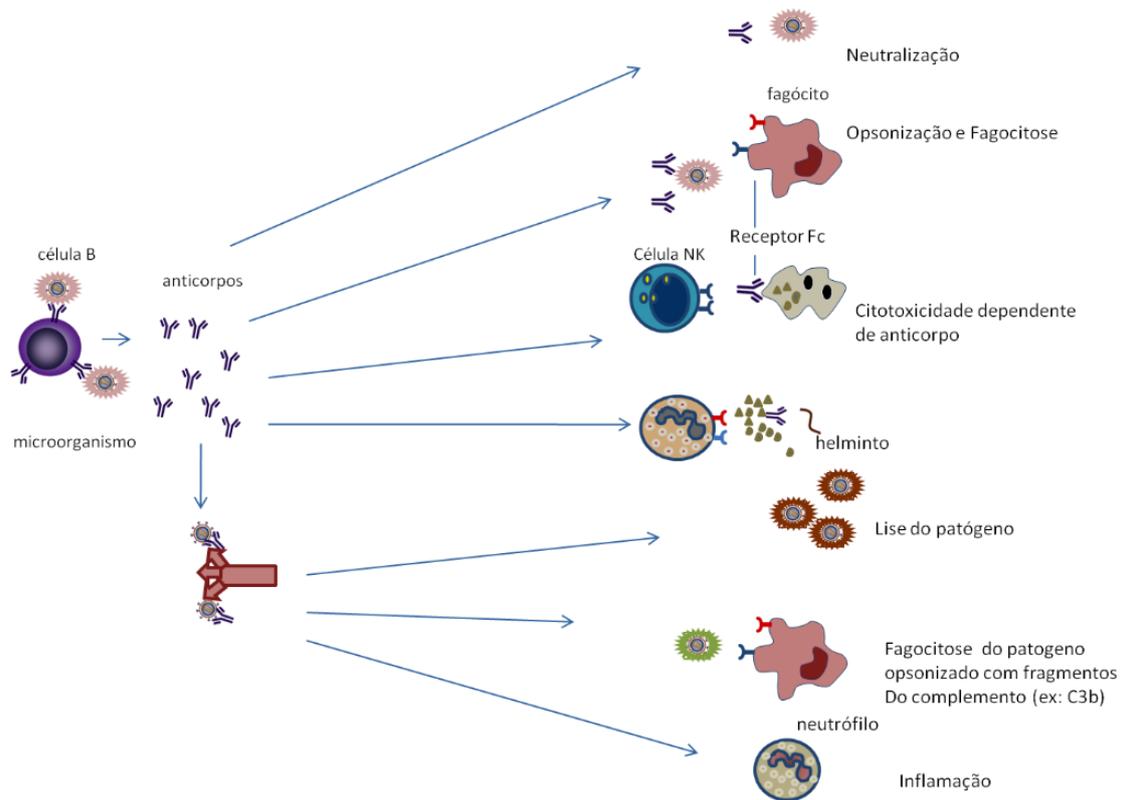


Figura 2.2 - Mecanismos da Resposta Adaptativa Humoral. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

Os anticorpos são estruturalmente divididos em regiões que desempenham funções distintas. 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 2.3). Além disso, conforme a disposição de suas estruturas, as imunoglobulinas (anticorpos) são classificadas em 5 classes ou isotipos (Figura 2.4)

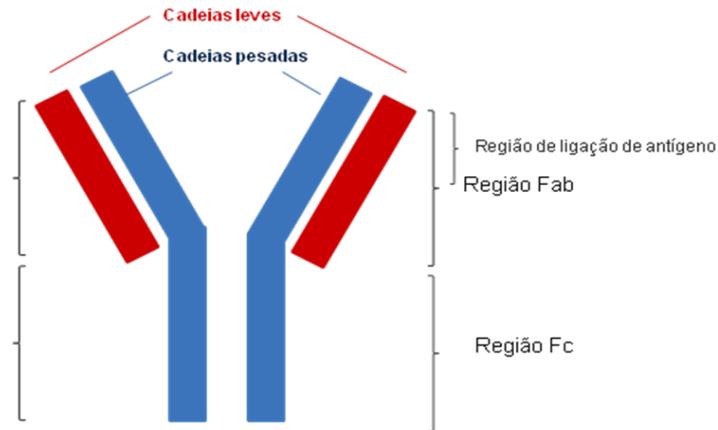


Figura 2.3 - Estrutura da Imunoglobulina.

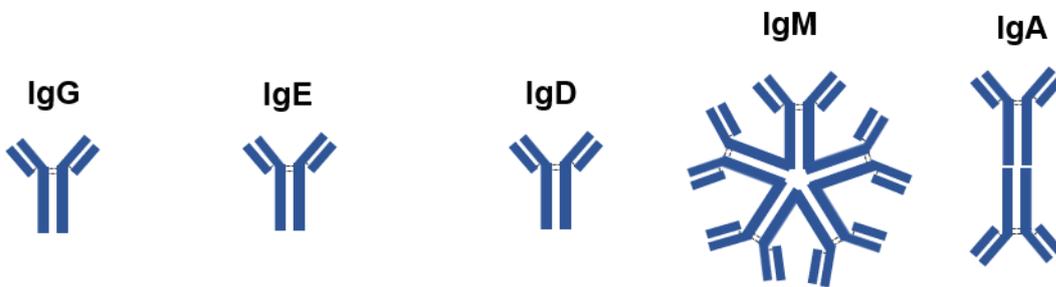


Figura 2.4 - Estrutura das classes de Imunoglobulina.

No soro humano cerca de 10% das Imunoglobulinas totais são da classe IgM (que não atravessam o endotélio e a placenta; estão em locais inflamados), 70 a 75% são da classe IgG (atravessam a placenta) e 15 a 20% da classe IgA1. Nas secreções encontramos predominantemente IgA2, inclusive nas glândulas mamárias, sob a forma de dímero (IgA das secreções ou sIgA). 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 disparar a 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. Tal 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 células NK, ativação do complemento e da 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 coestimulatórios 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-chave para as funções que serão desempenhadas dentro dos compartimentos linfoides secundários ou no sítio de inflamação (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Características dos linfócitos inativo, efetores e de memória.

	Linfócitos inativos	Linfócitos ativados ou efetores	Linfócitos de memória
Linfócitos T			
Migração	Principalmente para linfonodos periféricos	Principalmente para os tecidos inflamados	Principalmente para tecidos inflamados, mucosas
Frequência das células que respondem a um determinado antígeno	Muito baixa	Alta	Baixa
Funções efetoras	Nenhuma	Secreção de citocinas de atividade citotóxica	Nenhuma
Ciclo celular	Não	Sim	+/-
Expressão da proteína de superfície	Baixa	Alto	Baixa
Receptor IL-2 de alta afinidade			
Receptor de <i>homing</i> do Linfonodo periférico (L-selectina, CD62L)	Alto	Baixo	Baixa ou variável
Moléculas de adesão: integrinas, CD44	Baixa	Alto	Alta
Receptor de quimiocinas: CCR7	Alto	Baixo	Variável
Isoforma do CD45 (somente nos seres humanos)	CD45RA	CD45RO	CD45RO; variável
Morfologia	Pequeno, citoplasma escasso	Grande, mais citoplasma	Pequeno
Linfócitos B			
Isotipo da imunoglobulina (Ig) da membrana	IgM e IgD	Frequentemente IgG, IgA e IgE	Frequentemente IgG, IgA e IgE
Afinidade da Ig produzida	Relativamente baixa	Aumenta durante as respostas imunes	Relativamente alta
Função efetora	Nenhuma	Secreção de anticorpos	Nenhuma
Morfologia	Pequeno, citoplasma escasso	Grande: mais citoplasmas; plasmócito	Pequeno
Receptor de quimiocinas: CCR5	Alto	Baixo	?

Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

Dentre as subpopulações de linfócitos T, as que possuem melhor caracterização são as células T CD4⁺ auxiliares (*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 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. A via de diferenciação T_{H2} é a resposta deflagrada contra 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}. 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.

A principal função efetora de células T_{H2} é a destruição de microrganismos grandes, como os helmintos, que não são capazes de serem fagocitados e são mais resistentes à atividade microbicida de macrófagos. O mecanismo efetor desempenhado pelas células T CD4 *helper* da linhagem T_{H2} 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 para a cadeia pesada ϵ . Os eosinófilos ativados liberam proteínas líticas capazes de destruir até o firme tegumento dos helmintos (Figura 2.5). Os mastócitos expressam receptores Fc- ϵ e reagem aos

antígenos associados a IgE mediante degranulação, liberando aminas vasoativas e citocinas que induzem a inflamação local.

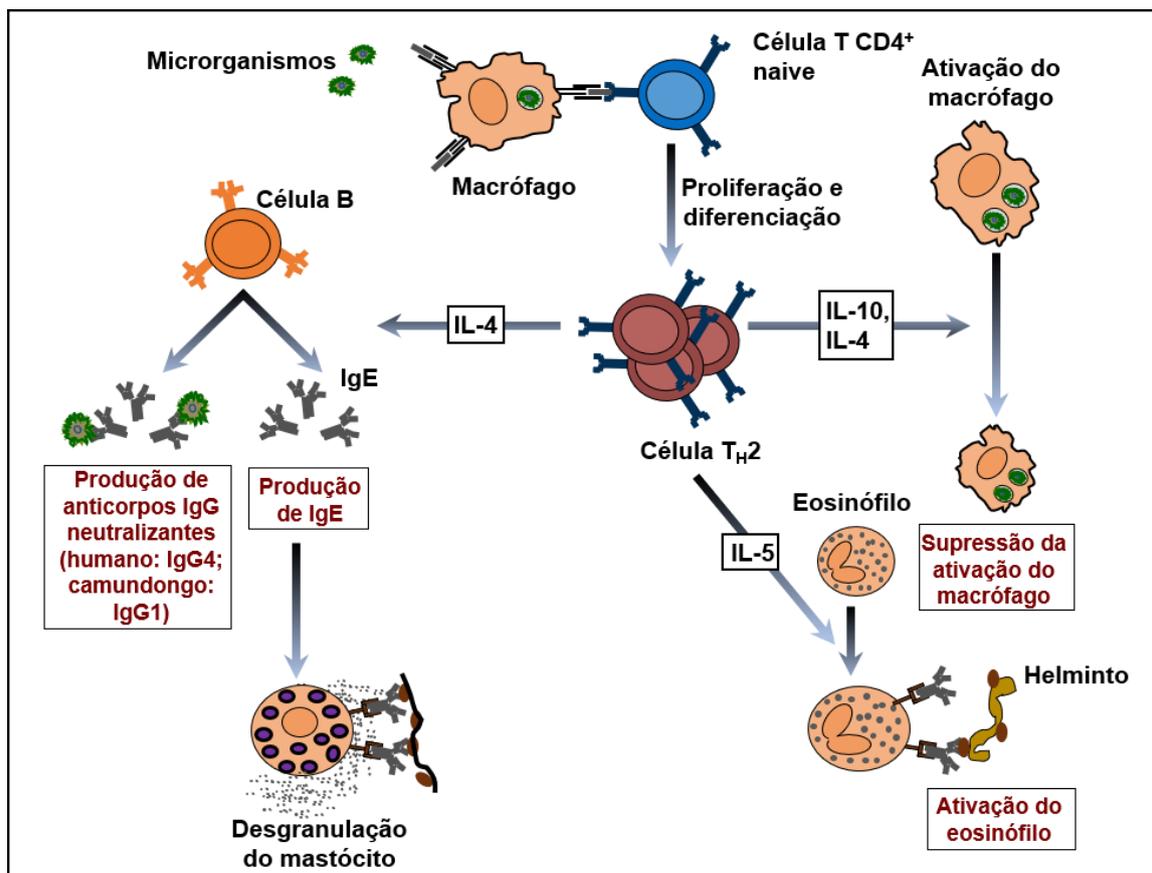


Figura 2.5 - Funções efetoras das células T_H2. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As CTLs se diferenciam de células T CD8 *naïve* após o reconhecimento antigênico, sinais coestimulatórios 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 células apresentadoras de antígeno (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 2.6A) que 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 2.6B). Em geral a atividade das caspases e 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 e proteínas microbianas (célula-alvo).

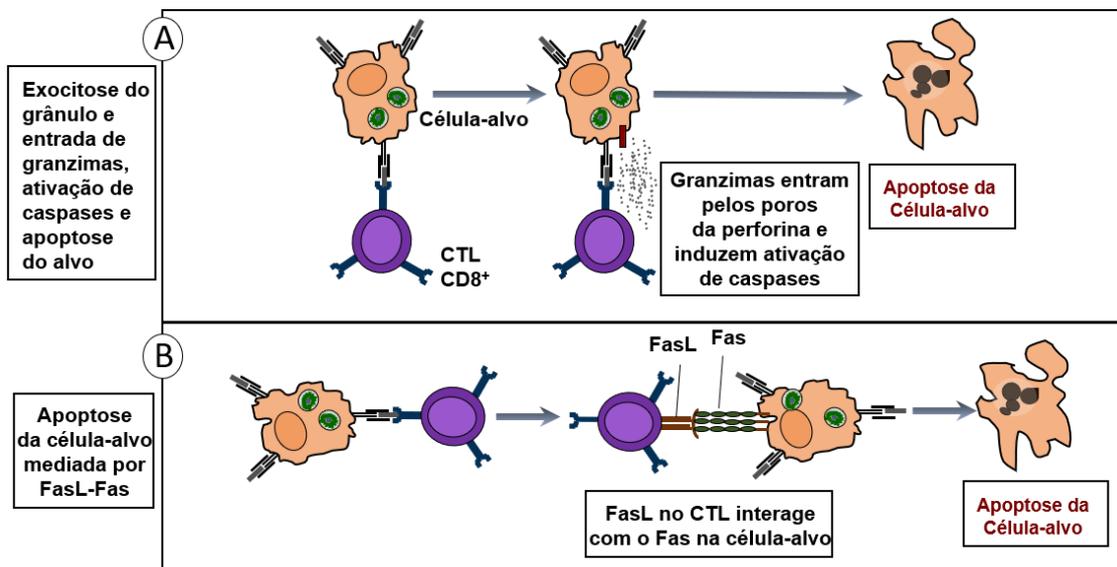


Figura 2.6 - Mecanismos da destruição das células-alvo mediados por CTL. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

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, expressão de MHC e moléculas coestimuladoras pelos macrófagos ativados.

2.4. Produção de Anticorpos Monoclonais (Hibridomas)

Os anticorpos, de maneira geral, são produzidos no organismo de forma específica contra um determinado antígeno. Os plasmócitos expressam e secretam vários anticorpos, cada um com uma especificidade diferente e capaz de interagir com um determinado epítipo antigênico, estes são denominados anticorpos policlonais. Já os anticorpos que são produzidos a partir de um mesmo clone de plasmócitos e se ligam somente a um determinante antigênico específico, possuindo desta forma a mesma especificidade entre si, são chamados de anticorpos monoclonais.

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 de 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 reconhecem apenas um epítopo antigênico e, por isso, são chamados de anticorpos monoclonais, que são produzidos e secretados 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 o seu emprego continuado em procedimentos terapêuticos.

Nos ensaios para a produção destes anticorpos monoclonais, os camundongos estimulados com um antígeno X expandem células B esplênicas que são retiradas e cultivadas em presença de células de mieloma em meio HAT contendo hipoxantina, aminopterina e timidina. 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 são expandidos em escala industrial para produção de anticorpos monoclonais específicos (Figura 2.7).

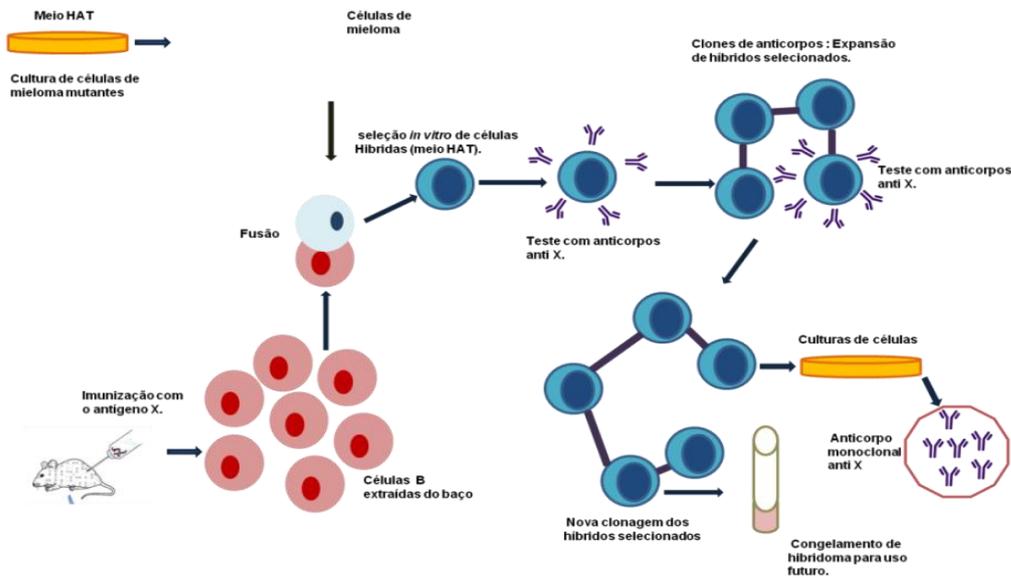


Figura 2.7 - Produção de anticorpos monoclonais, a partir de culturas de hibridomas, constituídas por linfócitos B antígeno-específicas e células tumorais.

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 multiparamétrico e possibilita a caracterização da complexidade molecular de uma célula que passou pelo processo de imunofenotipagem.

REFERÊNCIAS

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

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

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

CAPÍTULO 3. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Katherine Kelda Castro, Vanessa Costa, Alvaro Luiz Bertho

3.1. A Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo quantitativo, morfológico, fenotípico e funcional de células individuais a partir de uma suspensão celular heterogênea. Devido à sua capacidade ímpar para analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula, a Citometria de Fluxo se tornou a técnica de escolha para análises multiparamétricas de células, principalmente na imunologia, imunogenética, biologia celular, microbiologia, biologia marinha, fenotipagem celular, estudos de avaliação funcional e diferenciação de populações celulares, conteúdo de DNA e RNA, atividades enzimáticas, apoptose, produção de íons, citotoxicidade, expressão e modulação de receptores, distribuição populacional, produção de citocinas, entre outros.

Em virtude da sua capacidade de análise multiparamétrica, a citometria pode ser classificada como:

- **Citometria de fluxo analítica tradicional**, utilizada para a definição de características físico-químicas das células;
- **Citometria de fluxo espectral**, utilizada para obtenção de informações mais detalhadas das partículas, devido a associação com a espectroscopia;
- **Citometria de imagem** capaz de fornecer, além das características celulares, imagens em alta resolução das partículas;
- **Citometria de fluxo de purificação celular (*cell sorting*)**, utilizada para purificar (separar/sortear) uma ou mais populações celulares homogêneas a partir de uma suspensão heterogênea de células.

Para isso, vários tipos de citômetros de fluxo são produzidos comercialmente como os citômetros de fluxo analisadores (*Bench-top Analyzers*) (Figura 3.1), os citômetros de fluxo separadores/purificadores de células (*Cell Sorters*), entre outros (Figura 3.2).

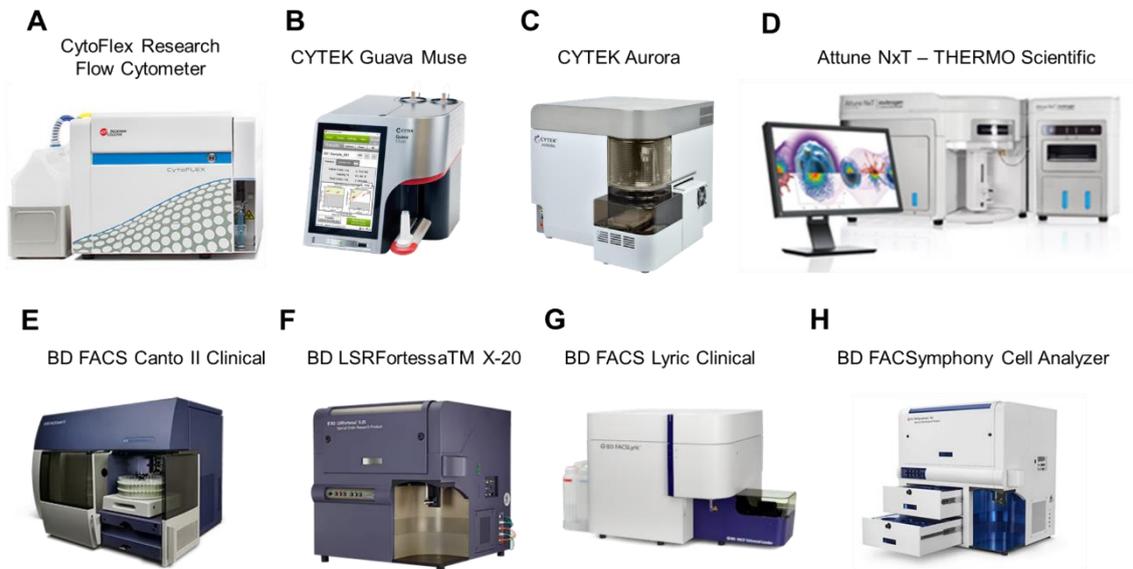


Figura 3.1 – Exemplos de citômetros de fluxo analisadores.



Figura 3.2 – Exemplos de citômetros de fluxo *cell sorting*.

3.2. Fluoróforos e LASERs

A base para os protocolos citofluorimétricos é a identificação de moléculas de superfície celular ou intracitoplasmáticas, através da utilização de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a fluoróforos, que são capazes de emitir cor quando excitados por um LASER (do inglês- *light amplification by stimulated emission of radiation*). Os fluoróforos são moléculas fluorescentes, inicialmente em repouso, que emitem luz de um determinado comprimento de onda e cor característica quando excitados especificamente por um LASER (Figura 3.3).

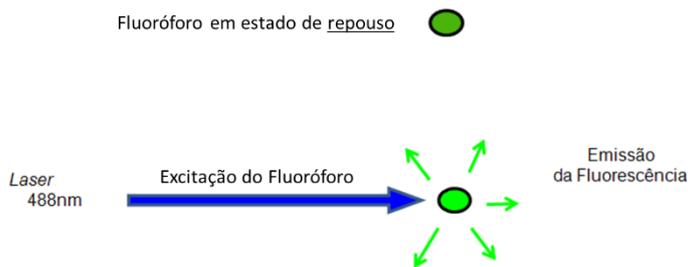


Figura 3.3 - Fluoróforo em estado de repouso e emitindo fluorescência após ser excitado pela luz do *LASER*.

Atualmente, a maioria dos citômetros de fluxo possui um ou mais *LASERs* como uma fonte de luz monocromática, pontual e de alta intensidade. Dentre a variedade de *LASERs*, utilizados em citometria de fluxo, os mais frequentes são: iônicos refrigerados a ar (nos citômetros mais antigos) ou de estado-sólido (nos citômetros atuais). O *LASER* mais comum emite um comprimento de onda de 488nm e por isso é chamado de *LASER* azul. Todos os citômetros de fluxo possuem este *LASER* em suas configurações básicas, pois além de excitar os fluoróforos também são responsáveis pela avaliação morfológica das células (baseados em tamanho e granularidade). Outros *LASERs* são o Hélio-Cádmio (He-Cd), que pode emitir na luz azul (441,6nm) e na UV (325nm); Hélio-Neônio (He-Ne), que emite em vermelho (633nm), sendo estes dois iônicos. Nos equipamentos atuais os *LASERs* iônicos foram substituídos por *LASERs* de estado-sólido (*solid-state LASER*), por serem de dimensões menores, mais baratos, de mais fácil calibração, maior estabilidade e durabilidade.

De acordo com a demanda de aplicação citofluorimétrica, os citômetros de fluxo podem ser configurados e adquiridos com um ou mais de um *LASERs* (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - *LASERs* e seus respectivos comprimentos de onda

LASER	Comprimento de onda (nm)
Ultravioleta (UV)	355 ou 373
Violeta (<i>violet</i>)	405
Azul (<i>blue</i>)	488
Verde (<i>green</i>)	532
Amarelo-verde (<i>yellow-green</i>)	561
Laranja (<i>orange</i>)	592
Vermelho (<i>red</i>)	633 ou 638
Infra-vermelho (<i>infra-red</i>)	808

Os fluoróforos geralmente são acoplados a AcMo que interagem de forma específica com moléculas-alvo presentes na superfície celular ou intracitoplasmáticas. Assim, funcionam como biomarcadores e possibilitam definir o perfil fenotípico, funcional além de eventos bioquímicos. Dessa maneira, em conjunto, esses marcadores permitem a definição do tipo e intensidade da resposta imunológica. Essas moléculas-alvo são definidas como grupamento de diferenciação ou *cluster* de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*, geralmente abreviado como CD), sendo esta nomenclatura mundialmente utilizada.

Nos leucócitos, por exemplo, a caracterização dos CDs possibilita estabelecer o fenótipo da célula determinando a população ou subpopulação em questão, bem como permite definir seu perfil de ativação e função que essa possivelmente executa. Neste sentido, a maioria dos painéis citofluorimétricos envolve a combinação entre biomarcadores que definem populações ou subpopulações celulares, bem como o estado funcional.

A expressão de TCR e/ou CD3, por exemplo, caracteriza a célula como um linfócito T; a expressão concomitante de TCR e/ou CD3 e CD4 caracteriza uma subpopulação de linfócito T *helper* (linfócito T CD4⁺); a expressão concomitante de TCR e/ou CD3 e CD8 caracteriza outra subpopulação linfocitária: os linfócitos T supressores e os citotóxicos (linfócito T CD8⁺); a expressão de CD19 caracteriza os linfócitos B e os CDs 20, 21, 22, 23 caracterizam qual a fase de diferenciação esses linfócitos B se encontram; a expressão de CD14 pode ser observada em monócitos e macrófagos; células *Natural Killer* expressam CD56; expressão de CD69 indica que a célula se encontra em estado funcional de ativação recente. É importante salientar que além da citometria de fluxo estabelecer a frequência de conjuntos celulares, ela também possibilita definir variações na expressão molecular. A expressão de algumas moléculas como CD27, CD62L, CD44 e as isoformas de CD45 (CD45RA e CD45RO) definem células efectoras, *naïve*, memória efectora, memória central, células em processo de "*homing*" tecidual (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Exemplos de algumas moléculas de CDs e suas respectivas características.

CD	Principais células que expressam	Nomes comuns/Funções conhecidas ou proposta
CD3	Linfócitos T, tímócitos	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 tímócitos, 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 tímócitos	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, tímócitos 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 <i>naïve</i> ; 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 nave, 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 dendríticas, linfócitos B ativados, monócitos e macrófagos	B7-1/Liga-se a CD28 e CD152 (CTLA-4); molécula coestimuladora para ativação de linfócitos T

CD86	Monócitos, células dendríticas, linfócitos B, alguns linfócitos B	B7-2/Ver CD80
CD122	Linfócitos T e B, células NK, macrófagos e monócitos	IL-2Rβ/Cadeia β do receptor de IL-2 e IL-15
CD127	Precursosores linfóides na medula óssea, linfócitos T maduros, monócitos	IL-7Rα/ Cadeia α do receptor de IL-7
CD183	Linfócitos T e células NK	CXCR3/Receptor de quimiocinas, incluindo CXCL9, CXCL10 e CXCL11
CD184	Largamente expressa em células sanguíneas e teciduais	CXCR4/Receptor de CXCL12; correceptor para a entrada do HIV-1 em células alvo
CD192	Monócitos, linfócito T ativados e células NK	CCR2/Receptor de CCL2 (MCP-1)
CD194	Subpopulação de linfócitos T, linfócitos B, células NK	CCR4/ Receptor de CCL2, CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL17 e CCL22
CD195	Linfócito T e macrófagos	CCR5/ Receptor de CCL3 (MIP-1α), CCL4, CCL5 (RANTES); correceptor para o HIV-1
CD197	Linfócitos T, células dendríticas	CCR7/Receptor para CCL9 (MIP-3β)

Abaixo é demonstrado, em resumo, uma imunofenotipagem de linfócitos T utilizando AcMo anti-CD3 conjugado ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC). O AcMo se ligará, pelas cadeias Fab, aos receptores CD3 na membrana dos linfócitos T e, ao ser interceptado pelo *LASER* 488 nm, o fluoróforo (FITC) emitirá uma luz no comprimento de onda de 525 nm (cor verde), que através de espelhos dicróicos e filtros será enviada para os sensores fotomultiplicadores específicos (Figura 3.4).

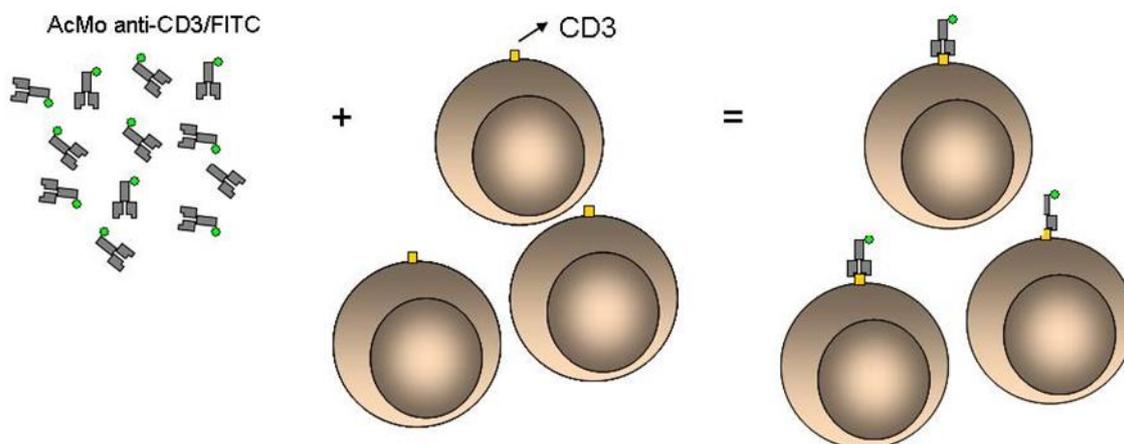


Figura 3.4 - Esquema representativo da marcação de linfócitos T com anticorpo monoclonal anti-CD3 conjugado com o fluoróforo FITC.

Vários AcMo conjugados a diversos fluoróforos estão comercialmente disponíveis por empresas especializadas como a Beckman Coulter, Becton & Dickinson (BD), ThermoFisher, Biolegend etc. A combinação AcMo-fluoróforo deve ser escolhida de acordo com as moléculas (CDs) que se deseja investigar e, com a configuração do citômetro que será utilizado, como *LASERs*, filtros e sensores. Alguns dos fluoróforos utilizados em citometria de fluxo estão descritos na Tabela 3.3 com seus respectivos *LASERs* de excitação e pico de emissão.

Tabela 3.3 - Alguns fluoróforos disponíveis no mercado, seus respectivos picos de emissão e *LASER* de excitação.

Fluoróforo	<i>LASER</i> (excitação)	Pico de emissão
Brillant Violet 421	405	421
Pacific Blue	405	455
Brillant Violet 510	405	510
Krome Orange	405	528
Brillant Violet 605	405	605
Brillant Violet 650	405	650
Brillant Violet 785	405	785
Alexa Fluor 488	488	519
FITC	488	519
PE	488/532/561	578
PE/Dazzle 594	488/532/561	610
ECD	488/532/561	613
PE-TexasRed	488/532/561	615
PerCP	488	678
PerCP/Cy5.5	488	695
PE/Cy7	488/532/561	785
APC	633/638	660
Alexa Fluor 647	633/638	668
Alexa Fluor 700	633/638	719
APC/Cy7	633/638	785
APC/H7	633/638	785
APC/Fire 750	633/638	787

A conjugação dos fluoróforos à anticorpos podem ser simples ou compostas (*Tandem Dyes*), sendo este último constituído por dois fluoróforos acoplados: o primeiro fluoróforo (fluoróforo doador) que transfere energia luminosa (FRET) para o segundo fluoróforo (fluoróforo receptor). Quando o fluoróforo doador é excitado pelo *LASER*, este transfere a energia de emissão de luz, no respectivo comprimento de onda, para o fluoróforo receptor, que por sua vez emite luz em um comprimento de onda, característico dela própria, diferente do primeiro fluoróforo (Figura 3.5).

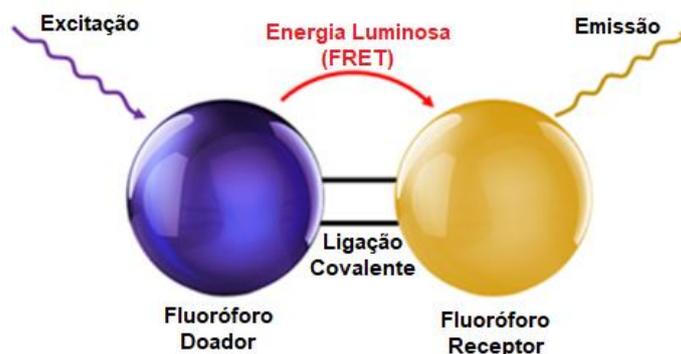


Figura 3.5 - Princípio dos *Tandem Dyes*

É importante ressaltar que os *Tandem Dyes* são mais instáveis e lábeis, sendo sensíveis à fixação, variação de temperatura e exposição excessiva à luz, sendo recomendado que a amostra seja adquirida no citômetros de fluxo em no máximo 24 horas após a marcação, devido ao risco de degradação do *tandem dye* em questão gerando uma marcação falso-positiva.

Conhecendo as propriedades de excitação e de emissão de cada fluoróforo, o comprimento de onda de cada *LASER* e o sistema ótico (filtros) dos citômetros de fluxo, é possível escolher as combinações de anticorpos monoclonais ideais a serem usadas em conjunto, de forma que diferentes moléculas de interesse possam ser avaliadas em uma única célula. Por exemplo: AcMos anti-CD4 FITC, anti-CD8 PE, anti-CD3 PercP em um citômetro que tenha um *LASER* de 488 nm e três fotossensores com filtros capazes de captar os comprimentos de onda de 525 nm, 578 nm e 667 nm, respectivos a cada fluoróforo.

IMPORTANTE: No caso da marcação com mais de um AcMo, deve-se tomar cuidado para não escolher fluoróforo cujo pico de emissão seja detectado pelo mesmo filtro, como FITC e Alexa Fluor® 488, já que ambos possuem comprimentos de onda de emissão muito semelhantes.

Além dos comprimentos de onda de excitação *LASER* e pico de emissão, outra característica importante para escolha dos fluoróforos é a intensidade de emissão de luz (brilho) destes. Eles possuem diferentes intensidades de brilho e são classificados em uma escala de 1 - 5 (Tabela 3.4) ou como muito brilhante (*very bright*), brilhante (*bright*), moderado (*moderate*) e fraco (*dim*). Recomenda-se escolher fluoróforos mais brilhantes (PE, APC) para moléculas menos expressas ou raras como, por exemplo, receptores de quimiocinas ou citocinas intracelulares, enquanto para moléculas

constitutivas, expressas em maior quantidade, como CD4, CD8, CD45, pode-se utilizar fluoróforos menos brilhantes (FITC, Pacific Blue).

Tabela 3.4 - Alguns fluoróforos disponíveis comercialmente e seus respectivos índices de brilho.

Fluoróforo	Brilho
Brillant Violet 421	4
Pacific Blue	1
Brillant Violet 510	3
Brillant Violet 605	3
Brillant Violet 650	5
Brillant Violet 785	3
Alexa Fluor 488	1
FITC	1
PE	5
PE/Dazzle 594	5
PerCP	1
PerCP/Cy5.5	2
PE/Cy7	4
APC	4
Alexa Fluor 647	4
Alexa Fluor 700	2
APC/Cy7	2
APC/H7	2
APC/Fire 750	2

3.3. Sistema Ótico

O sistema óptico de um citômetro de fluxo é composto por filtros, lentes e espelhos e, tem a função de direcionar a luz (fótons) emitida pelos fluoróforos para os fotossensores. A maioria dos citômetros de fluxo possuem fotossensores denominados tubos fotomultiplicadores (*PMTs* - do inglês *photomultiplier tubes*). Atualmente, novas tecnologias surgiram no intuito de aumentar a sensibilidade dos sensores, um exemplo é o sensor APD (*Avalanche Photodiode*) que equipa os citômetros de fluxo nanométricos (p.ex. Cytoflex da Beckman Coulter), melhorando a sensibilidade e a resolução desses equipamentos para detecção de partículas pequenas como bactérias, nanovesículas e exossomas e, ainda, de populações celulares com baixa expressão da molécula a ser analisada. A disposição dos diferentes tipos de lentes, espelhos e filtros determina a configuração óptica do equipamento.

As lentes têm a função de reunir o máximo de luz possível do ponto de interceptação e colimar essa luz de modo que os raios se propaguem paralelamente uns aos outros e percorrem o caminho sem divergir até seus respectivos fotossensores. Em outras palavras, à medida que o laser interage com uma partícula que passa pelo ponto de interceptação a sua luz é dispersada e, caso haja fluoróforo, fluorescências são geradas. Por sua vez, as lentes são responsáveis por coletar o máximo possível dessa luz dispersada e fluorescência(s) gerada(s) e direcioná-las paralelamente, com a maior precisão possível, para uma melhor detecção do sinal gerado. O sistema de lentes geralmente consiste em múltiplas lentes colocadas diretamente em frente ao ponto de interceptação para a captura do máximo de luz possível e outras posicionadas a alguma distância da lente de coleta para um melhor direcionamento dos feixes de luz, dependendo do design ótico do citômetro.

Os espelhos são responsáveis por fracionar a luz de modo que as fluorescências e a luz difusa sejam direcionadas para os detectores apropriados, além de auxiliar no direcionamento da luz através do caminho de detecção. Permitindo assim a discriminação entre a dispersão da luz (relacionado aos parâmetros morfológicos) e diferentes fluorescências. Para auxiliar na separação de fluorescências de diferentes comprimentos de onda utiliza-se espelhos dicróicos. Estes são revestidos em um dos lados com um material que permite que a luz acima ou abaixo de um determinado comprimento de onda passe, enquanto reflete os outros comprimentos de onda (cores). Eles são colocados a 45° em relação à direção da luz, refletindo a luz para os respectivos sensores e permitindo a passagem facilitando a reflexão. Os espelhos dicróicos podem ser de dois tipos.

- Espelho Dicróico *Long Pass (LP)*: deixa passar comprimentos de onda maiores que o valor do espelho e reflete o restante. Isto é, um espelho de 525 LP permite a passagem de comprimentos de onda maiores que 525 nm e reflete comprimentos de onda menores ou iguais a 525 nm (Figura 3.6).
- Espelho Dicróico *Short Pass (SP)*: deixa passar comprimentos de onda menores do valor do espelho e reflete o restante. Por exemplo, espelho de 525 SP e, permite a passagem de comprimentos de onda menores que 525 nm e reflete comprimentos de onda maiores ou iguais a 525nm.

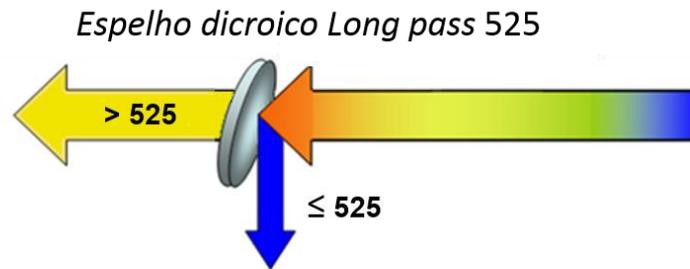


Figura 3.6 - Exemplo de Espelho Dicróico *Long Pass* 525

Os filtros de absorvância têm a função de permitir a passagem da cor (comprimento de onda) correspondente a ele próprio, absorvendo todas as outras cores, restringindo assim a luz que chega aos detectores. Existem três diferentes tipos de filtro:

- Filtro de Absorvância *Long Pass (LP)*: permite a passagem de comprimentos de onda maiores do que o valor do filtro. Isto é, um filtro 560 LP, deixa passar (atravessar o filtro) os comprimentos de onda maiores que 560 nm e absorve (impede) a passagem de comprimentos de onda menores ou iguais a 560 nm (Figura 3.7A).
- Filtro de Absorvância *Short Pass (SP)*: permite passar comprimentos de onda menores do que o valor do filtro, ou seja, um filtro 560 SP, deixa passar (atravessar o filtro) os comprimentos de onda menores que 560 nm e absorve (impede) a passagem de comprimentos de onda maiores ou iguais a 560nm (Figura 3.7B).
- Filtro de Absorvância *Band Pass (BP)*: permite que uma faixa de comprimento de onda seja interceptada pelo detector e evita que comprimentos de onda diferentes daquele que se deseja detectar interfiram. Isto é, um filtro *Band Pass* 560/60, deixa passar (atravessar o filtro) apenas os comprimentos de onda na faixa entre 530 (560 – 30) e 590 nm (560 + 30) e impede a passagem de comprimentos de onda diferentes dessa faixa (Figura 3.7C).

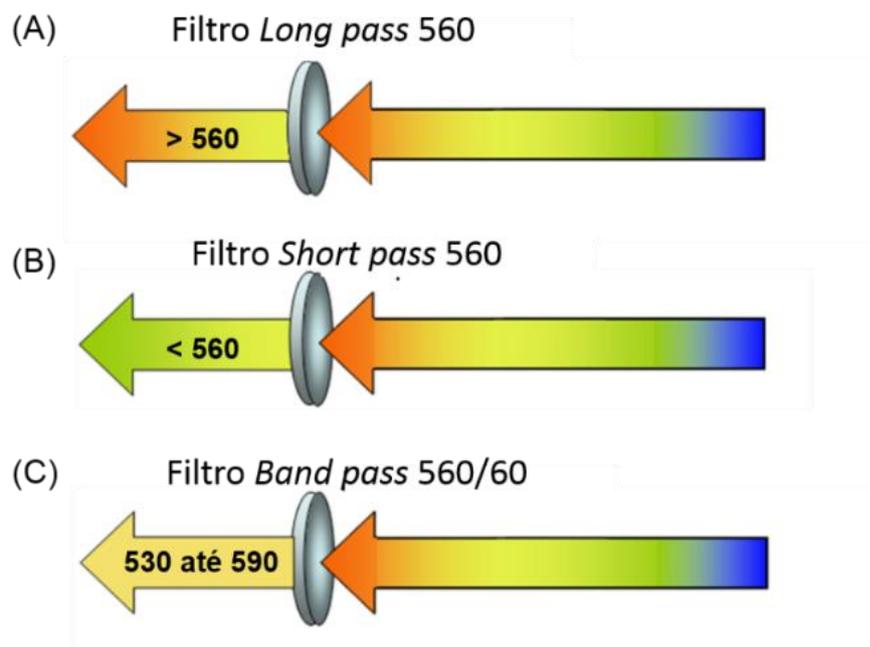


Figura 3.7 - Ilustração de um (A) filtro *Long Pass* 560, (B) filtro *Short Pass* 560 e (C) filtro *Band Pass* 560

3.4. 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 sensores, 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 o espalhamento frontal da luz do *LASER* (*forward scatter*); o espalhamento lateral da luz do *LASER* (*side scatter*) e as emissões das fluorescências.

3.5. Princípios de Funcionamento

Para utilizar a citometria de fluxo como ferramenta de estudo, as amostras devem estar em uma suspensão e três protocolos principais podem ser seguidos: um protocolo de obtenção de células (por exemplo: gradiente de densidade – ex: Ficoll Hypaque e/ou lise de hemácias; técnicas de digestão ou maceração de tecido); e o protocolo de marcação citofluorimétrica. Seja esta amostra de sangue periférico, cultivo celular, medula óssea, tecido ou 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 serão imunomarcadas. Por exemplo, em uma amostra de sangue periférico, está

primeiramente poderá ser submetida ao gradiente de densidade, se deseja avaliar o percentual de monócitos e de linfócitos T CD8⁺, deve-se utilizar uma combinação de AcMo anti-CD14 (que se liga aos monócitos), AcMo anti-CD3 (específico para linfócitos T) e AcMo anti-CD8 (que se liga às células CD8⁺). Cada um destes AcMo deve estar acoplado a um fluoróforo de cor diferente, como por exemplo: FITC, PE e PE-Cy5. É importante lembrar que para a escolha dos fluoróforos é necessário saber quais são as cores que podem ser detectadas “lidas” no citômetro de fluxo a ser utilizado, isto é, qual o(s) *LASER*(s) e a configuração óptica do equipamento.

Após a preparação da amostra (marcação das células com anticorpos monoclonais), o tubo contendo a suspensão de células¹ é inserido no citômetro de fluxo e a suspensão de células é aspirada gradualmente por um sistema de pressão e levadas à câmara de fluxo². Além de ser preenchida pela solução salina (*sheath fluid*), esta câmara recebe então a suspensão de células³, as quais, por conta do formato cônico da câmara e fluxo diferencial da salina em relação a amostra, seguem posicionadas uma atrás da outra até o foco hidrodinâmico⁴, onde cada uma delas é interceptada pelo *LASER*⁵. Este encontro resulta na refração da luz do *LASER* e na emissão de fluorescência(s)⁶ de acordo com o(s) fluoróforo(s) acoplado(s) aos AcMo, ligado em cada célula. A emissão de fluorescências de diferentes comprimentos de onda (cores) é direcionada para um fotossensor de acordo com uma combinação e disposição de filtros⁷. Após a captação das fluorescências, elas 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 pontos (*dot plot*) (Figura 3.8).

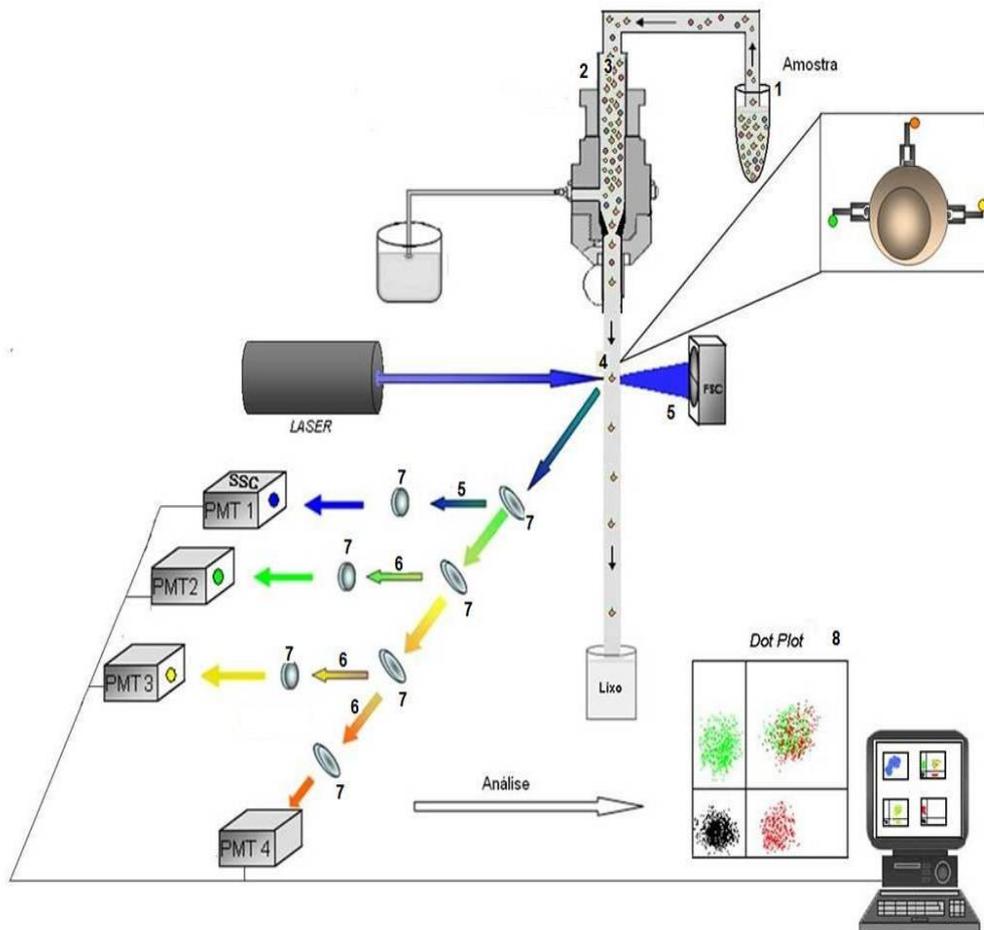


Figura 3.8 - Esquema representativo do funcionamento do citômetro de fluxo. *Flow cell* – câmara de fluxo; *Sheat* – solução salina; FSC – *foward scatter* (dispersão frontal); SSC – *side scatter* (dispersão lateral); PMT – *photomultiplier* (fotomultiplicador); *dot plot* – gráfico de pontos.

Cada partícula/célula que o *LASER* intercepta é chamada de evento. Todos os eventos 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 a molécula investigada, são analisadas através de histogramas (gráficos monoparamétricos) (Figura 3.9A) e/ou *dot plots* (gráficos biparamétricos), os quais podem ser divididos em quatro quadrantes (Figura 3.9B).

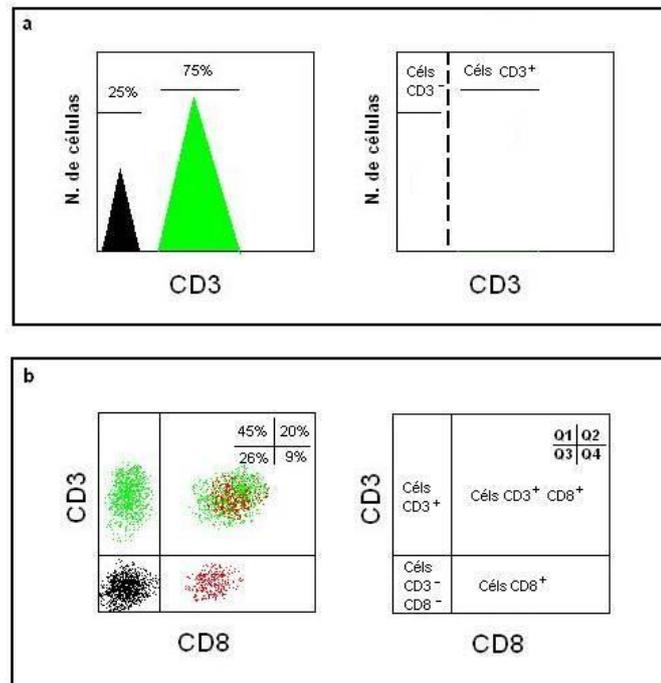


Figura 3.9 - Gráficos de análise de resultados obtidos por citometria de fluxo. (A) gráfico monoparamétrico (CD3) com respectivo pico das células negativas para a marcação com os AcMo anti-CD3 (25%) e pico das células positivas para esta marcação (75% - linfócitos T); (B) gráfico biparamétrico (CD8 vs CD3) 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).

Além de excitar os fluoróforos, 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 (dispersão frontal) 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 sensor (Figura 3.10). Simultaneamente, a luz do *LASER* refratada devido à granularidade celular é captada por lentes que as direcionam lateralmente (90°) para um sensor (Figura 3.11).

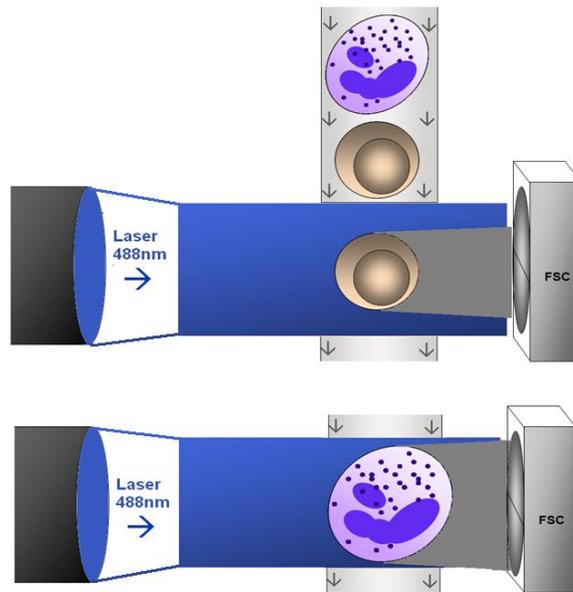


Figura 3.10 - Avaliação do tamanho celular de acordo com a luz do *LASER* refratada. Luz do *LASER* interceptando as células que passam através da solução salina formando um ângulo de refração que é detectado pelo fotossensor. FSC - *forward scatter*.

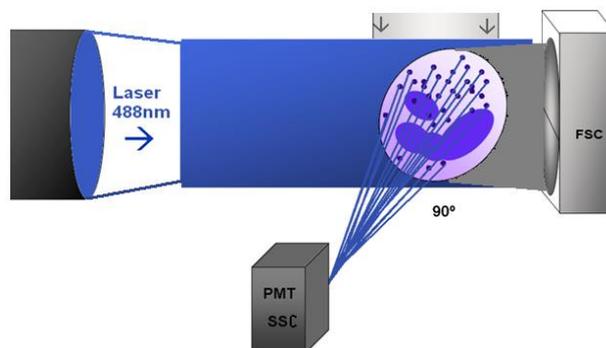


Figura 3.11 - Avaliação da granularidade celular de acordo com a luz do *LASER* refratada a 90°. Luz do *LASER* sendo refratada de acordo com a granularidade celular e sendo direcionada através de espelhos e filtros para o fotossensor. SSC - *side scatter*).

Assim, um espelho dicróico *long pass* 488 nm deixa passar todos os comprimentos de onda acima de 488 nm (cores emitidas pelos fluoróforos 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 488 nm até o PMT. 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 espelho dicroico *long pass* 488nm são refletidas por outro(s) espelho(s) dicroico(s) *long pass* de determinado comprimento de onda, e então chegam ao sensor após passar por um filtro de interferência *band pass* específico para cada fluorescência (Figura 3.12). Hoje, nos citômetros mais modernos também é possível avaliar a granulosidade celular (*side scatter* SSC) pela refração de outros *LASERs* com o *LASER* violeta (405nm) e vermelho (638nm), sua detecção ocorre de forma semelhante ao do *LASER* azul, atrás de um conjunto de espelhos, filtros e um sensor. O parâmetro SSC de *LASERs* como o violeta e o vermelho vem sendo muito utilizados em algumas aplicações mais específicas como para detecção de partículas pequenas como bactérias e microvesículas, pois esses *LASERs* produzem menos interferência (ruídos) quando comparado ao *LASER* azul.

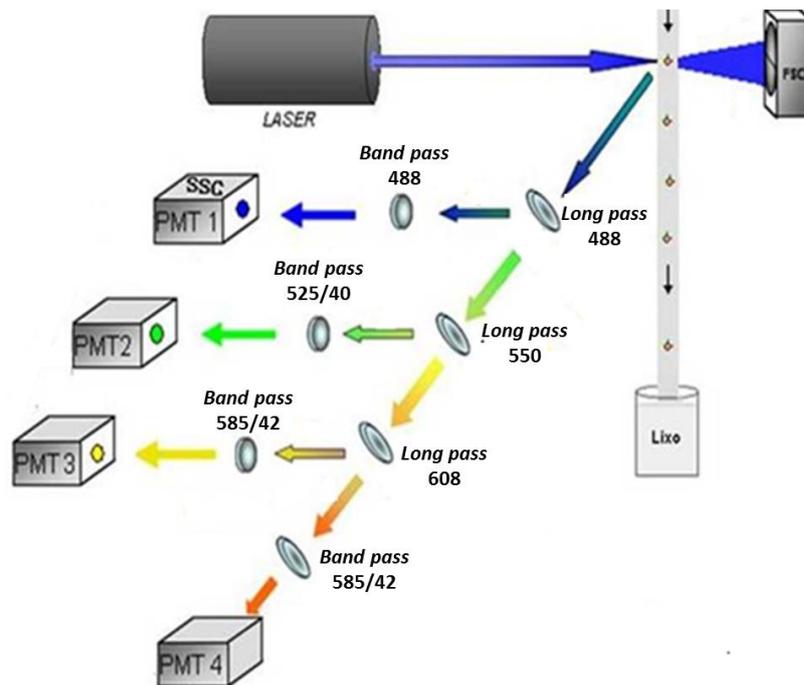


Figura 3.12 - Esquema representativo do caminho de cada fluorescência, direcionada pelos espelhos e filtros até um PMT (fotossensor).

3.6. Programas Computacionais Especializados - *Flow Cytometry Softwares*

Em segundos, milhares de células passam uma a uma pelo *LASER* e toda a informação quanto à refração da luz e à intensidade de fluorescência dos fluoróforos é detectada e convertida em sinal eletrônico. As informações morfológicas, como tamanho

e granularidade, e as intensidades de fluorescência referentes aos marcadores fenotípicos e/ou funcionais são obtidas simultaneamente à aquisição da amostra. Através de *softwares* específicos é possível montar histogramas e demais 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, como Summit, CytExpert (ambos da Beckman Coulter) que equipam os citômetros de fluxo MoFlo e CytoFlex respectivamente; e o software DIVA (BD Bioscience) que equipa os citômetros de fluxo FACSCanto e FACSAria, por exemplo. Além disso, existem também *softwares* específicos multiplataformas para análises *offline*, dos quais destacamos: Kaluza (Beckman Coulter) e FlowJo (FlowJo, LLC).

Antes de começar a aquisição de amostras, recomenda-se montar um protocolo contendo gráficos mono (histogramas) e biparamétricos (*dot plots*) específicos para análise dos parâmetros que se deseja avaliar, como tamanho e granularidade e fluorescência(s) emitida pelos fluoróforos utilizados.

Toda análise se baseia, primeiro, na identificação das populações quanto às propriedades físicas, isto é, tamanho e granularidade. Deve-se então montar um gráfico *dot plot*, selecionando para o eixo x e y, para esses parâmetros morfológicos geralmente se utiliza uma escala linear (Figura 3.13) para uma melhor visualização de pequenas variações morfológicas da amostra. Apenas para células muito pequenas, como bactérias, é recomendado utilizar uma escala logarítmica.

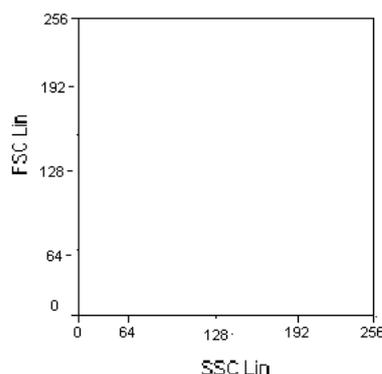


Figura 3.13 - *Dot plot* de tamanho vs granularidade. FSC – *forward scatter* (tamanho); SSC – *side scatter* (granularidade); Lin – escala linear.

A seguir, devem-se montar os gráficos para a avaliação de intensidade de fluorescência dos respectivos fluoróforos utilizados no protocolo de marcação da amostra. Para esse tipo de parâmetro, relativo às fluorescências, geralmente se utiliza uma escala logarítmica.

A análise de fluorescências pode ser realizada através de histogramas, nos quais se avalia a intensidade de emissão de uma única fluorescência (Figura 3.14); e/ou *dot plots*, onde se avalia a intensidade de emissão de fluorescência por dois fluoróforos simultaneamente. Figura 3.15 ilustra o tipo de análise em quadrantes utilizando-se um *dot plot*, onde a intensidade de fluorescência representada no Q1 é referente às células marcadas com o fluoróforo Y; o Q2 representa a intensidade de fluorescência das células marcadas tanto com o fluoróforo Y quanto com o fluoróforo X; as células negativas para ambos os fluoróforos são representadas no Q3; e finalmente, o Q4 representa a intensidade de fluorescência das células positivas para o fluoróforo X.

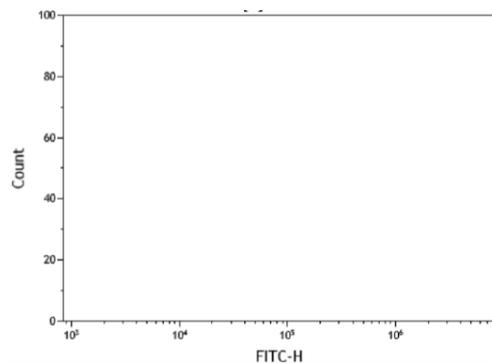


Figura 3.14 - Histograma. Gráfico monoparamétrico para a avaliação de uma única fluorescência vs número de células. *Counts* – número de células; FITC – intensidade de fluorescência do Fluoróforo FITC utilizado em escala logarítmica.

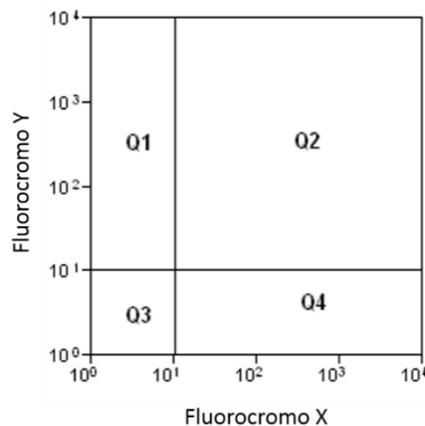


Figura 3.15 - *Dot plot*. Gráfico biparamétrico: fluoróforo X vs fluoróforo Y, onde Q representa os quadrantes. Q1 – positivo apenas para o fluoróforo Y, Q2 – positivo para o fluoróforo X e Y, Q3 – negativo para ambos os fluoróforos e Q4 – positivo apenas para o fluoróforo X

É possível montar um protocolo com a variedade de combinações desejadas de histogramas e *dot plots*, de forma que durante a aquisição da amostra, os gráficos demonstram as informações qualitativas e principalmente as quantitativas dos parâmetros utilizados. As análises podem ser feitas através do percentual de células e/ou da intensidade de fluorescência.

Ainda como ferramenta de aquisição e análise, os *softwares* permitem a criação de regiões, denominadas *gates*, para delimitar as populações celulares que se deseja avaliar (Figura 3.16). A partir deste *gate* pode-se então criar outros gráficos, histogramas ou *dot plots*, com o intuito de avaliar a intensidade da fluorescência emitida pelos fluoróforos utilizados em determinada população do experimento. Assim, é possível determinar o percentual de células em cada *gate* e, desta forma, determinar os dados relevantes das análises de cada amostra.

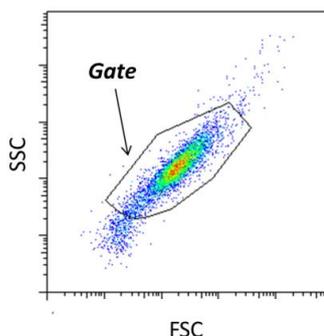


Figura 3.16 - *Gate* envolvendo a população de interesse

Uma outra ferramenta fundamental de aquisição, é a criação do gráfico *dot plot* de tempo (*Time*), que funciona como um controle interno do equipamento, a fim de verificar possíveis entupimentos ou perturbações no aparelho durante a aquisição (Figura 3.17).

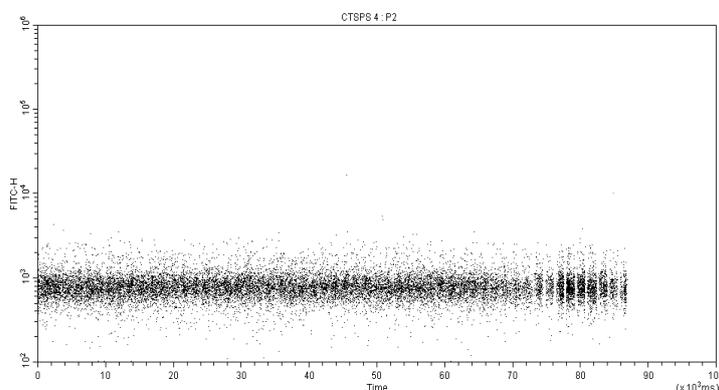


Figura 3.17 - *Dot plot*. Gráfico biparamétrico: FITC-H vs Time, para verificar o andamento da aquisição, e detectar possíveis entupimentos, perturbações ou finalização das amostras.

3.7. Titulação de anticorpos

A titulação de anticorpos é importante para estabelecer um índice entre a concentração ideal do reagente e a imunomarcagem da molécula-alvo a ser estudada.

Com a titulação é possível determinar a concentração de saturação do anticorpo. O excesso de anticorpo em relação a molécula alvo pode gerar um aumento de ligações não específicas (ou de baixa afinidade), reduzindo a acurácia da medição. Em alguns casos, a utilização de concentrações altas de AcMo pode resultar no deslocamento do espectro de fluorescência ao longo da escala logarítmica do gráfico e, gerar problemas para a definição de positividade para o marcador.

Por outro lado, quando se utiliza concentrações muito baixas de anticorpos em relação a molécula-alvo, pode ocorrer a subestimação de moléculas e da população celular positiva.

3.8. Compensação de cores

A excitação de um fluoróforo gera uma faixa de emissão que corresponde a diferentes valores de comprimento de onda. Por vezes esse espectro apresenta sobreposição com o espectro de outro fluoróforo (Figura 3.18A), como artifício a maior parte dos detectores de fluorescência são customizados para trabalhar com o pico de emissão de cada fluoróforo (filtros *bandpass*). Esse artifício possibilita que a sobreposição natural entre diferentes fluoróforos seja subtraída eletronicamente, assim a fração da fluorescência emitida pelo PE, por exemplo, que esteja sendo detectada pelo canal de fluorescência do FITC pode ser retirada, este procedimento é chamado de compensação de cores. As Figuras 3.18B e 3.18C ilustram o espectro de emissão de cada fluoróforo antes e depois da compensação de cores, respectivamente.

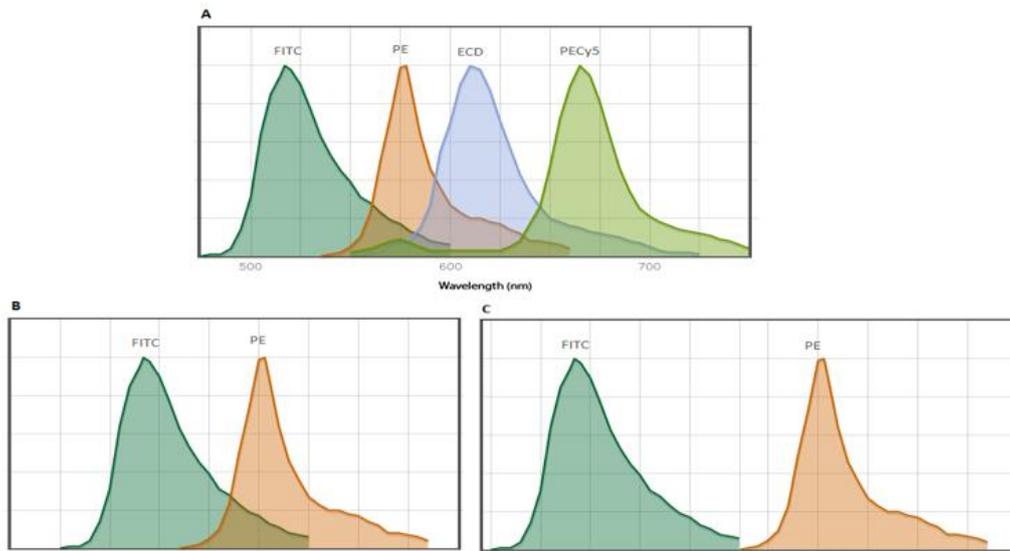


Figura 3.18 - Compensação de cores. (A) Espectro de emissão dos fluoróforos FITC, PE, ECD e PC5 e sobreposição do sinal de fluorescência entre os fluoróforos; (B) Sobreposição do sinal de fluorescência do FITC e do PE e (C) sinais compensados.

Para realizar uma compensação de cores eficiente é crucial a utilização de amostras de células marcadas individualmente com cada fluoróforo que será utilizado no painel citofluorimétrico (Figura 3.19). Estas amostras devem ser adquiridas antes da amostra experimental marcada com múltiplos fluoróforos. Através das marcações simples é possível ajustar o percentual de marcação somente para uma determinada fluorescência, comparando a mediana de fluorescência dos eventos negativos e positivos, a compensação correta, geralmente mostra um perfil visual com o alinhamento entre as populações negativas e positivas presentes no *dot plot* de compensação. Após a compensação de cada fluorescência, a amostra pode então ser analisada (Figura 3.19C).

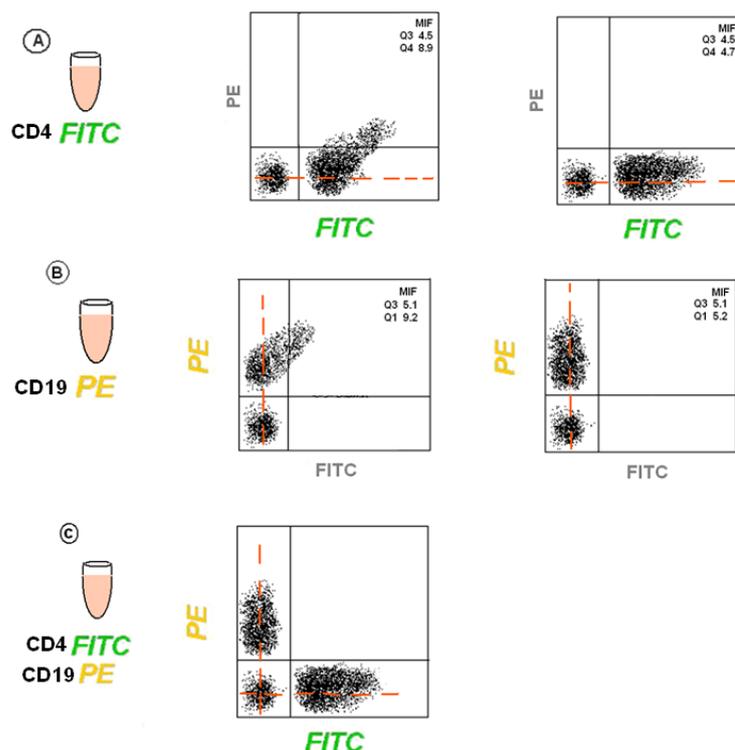


Figura 3.19 - Marcação simples para compensação de cores. (A) Aquisição de uma amostra marcada somente com CD4/FITC (B), e outra somente com CD19/PE seguida da compensação de cores através do ajuste da média de intensidade de fluorescência dos eventos negativos (Q3) e dos eventos positivos (Q4 – A; Q1 – B), de acordo com uma linha imaginária tracejada entre estes eventos (em laranja). (C) Em seguida a amostra marcada com os dois fluoróforos é adquirida conforme compensação previamente realizada.

3.9. Controles

Uma das melhores maneiras de melhorar a qualidade e confiabilidade do resultado, através do posicionamento adequado de *gates* é a utilização de controles de internos da citometria, além dos controles experimentais. Para isso, além do controle de compensação que utiliza marcações simples para cada fluoróforo, existem outros tipos de controle como: controle não marcado (*unstaining control*), controle isotipo (*isotype control*) e o controle FMO (*Fluorescence Minus One Control*).

O controle sem marcação é feito utilizando células não marcadas, mas tratadas da mesma maneira que as marcadas com os anticorpos. Tal controle é comumente utilizado para a avaliação da autofluorescência das células, para definir a população negativa e conseqüentemente o início da população positiva. Entretanto, muitas vezes o controle sem marcação não é o ideal para este fim, principalmente quando se utiliza muitos fluoróforos com espectros de emissão próximos, por isso é importante também

observar se houve deslocamento do espectro negativo quando adquirir as amostras com marcações positivas.

O controle isotípico é crucial para verificar possíveis ligações inespecíficas. Os anticorpos utilizados para a imunofenotipagem por citometria de fluxo podem se ligar de maneira específica, através da porção Fab do anticorpo se ligando com alta afinidade ao seu alvo específico, ou podem se ligar de maneira inespecífica, este último tipo de ligação ocorre de duas maneiras: a primeira é quando a porção Fc do anticorpo se liga a um receptor de Fc (FcR) presente na superfície de determinadas populações celulares (p.ex. macrófagos); e a segunda maneira é quando a porção Fab do anticorpo se liga com baixa afinidade, de forma inespecífica a uma molécula. Além disso, quando a integridade da membrana celular está comprometida, comum em processo de morte celular, os anticorpos também podem se ligar de forma não específica a componentes intracelulares ou restos celulares. Sendo assim, o controle isotipo consiste em um anticorpo não relacionado, porém do mesmo isotipo do anticorpo de referência (por exemplo: IgG1, IgG2a) e, do mesmo fluoróforo conjugado a tal anticorpo.

Já o controle FMO é usado para identificar o ponto de corte entre as fluorescências negativas, possíveis interferências de fluorescências entre detectores e a marcação positiva em painéis multicolor. Em algumas situações a falta de distinção entre populações positivas e negativas é causada pelo espectro de emissão de fluoróforos que geram interferência em filtros além do que deveria mesmo após a compensação de cores. Isto é, quando a população negativa se desloca e/ou a população positiva e negativa não apresenta uma separação clara, o uso dos controles isotípicos ou sem marcação não são a melhor estratégia para determinar o ponto de corte entre as populações positiva e negativas, nesse caso, o controle FMO é o mais indicado. Esse controle consiste em tubos de células marcadas com todos os fluoróforos usados no experimento, exceto um deles, sucessivamente combinados. O ideal é que o experimento que se utiliza múltiplos fluoróforos, possua um controle FMO para cada fluoróforo.

A Figura 3.20 exemplifica o uso dos controles sem marcação e FMO, mostrando a melhor aplicação deste último. Nota-se o fenômeno de deslocamento do espectro de fluorescência negativo do controle sem marcação quando a amostra é marcada positivamente. Neste exemplo temos um protocolo de marcação de linfócitos com anti-CD3-FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 PE-Cy5 e anti-CD45RO PE-Cy7, aonde os seguintes controles FMO são recomendados:

- FITC FMO: células marcadas com anticorpos conjugados com PE, Pe/Cy5 e Pe/Cy7 (sem FITC)

- PE FMO: células marcadas com anticorpos conjugados com FITC, Pe/Cy5 e Pe/Cy7 (sem PE) (representado na Figura 3.20)
- Pe/Cy5 FMO: células marcadas com anticorpos conjugados com FITC, PE e Pe/Cy7 (sem Pe/Cy5)
- Pe/Cy7 FMO: coradas com anticorpos conjugados com FITC, PE e Pe/Cy5 (sem Pe/Cy7)

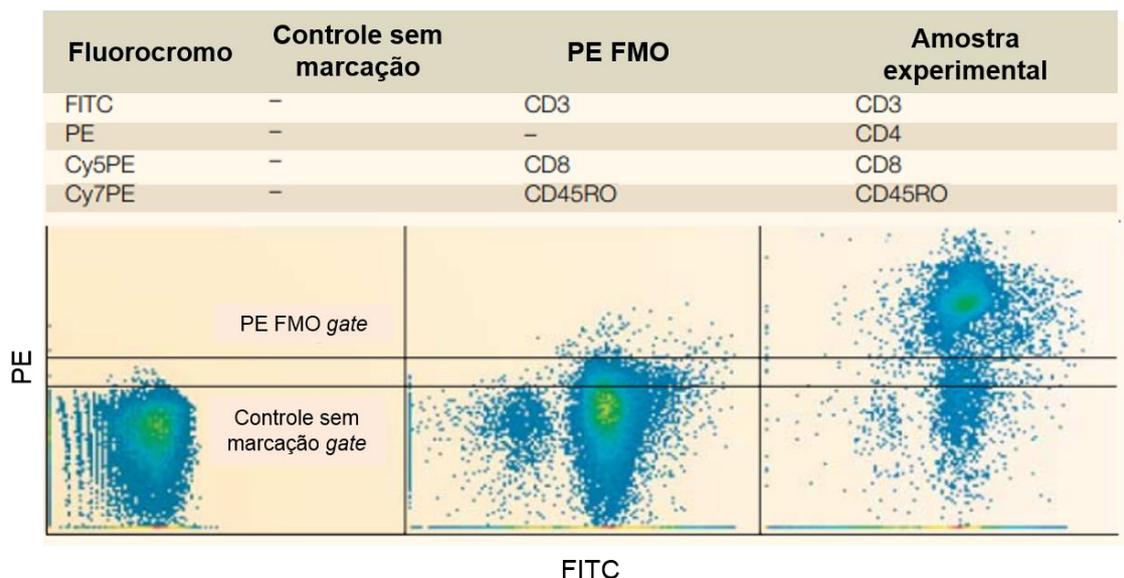


Figura 3.20 - O FMO foi utilizado para otimizar a identificação de células T CD4⁺ e CD4^{neg} em uma população de linfócitos. Para isso utilizou-se o controle FMO PE, o qual a amostra foi marcada com anti-CD3-FITC, anti-CD8-PE/Cy5 e anti-CD45RO-PE/Cy7. Gráficos mostrados após a compensação de cores. Observa-se que o controle FMO (linha FMO PE) é mais indicado para definir a posição do *gate* do que de controle sem marcação (linha Controle sem marcação). Adaptado de Perfetto SP, Chattopadhyay PK e Roederer M, 2004

3.10. Exclusão de *doublets*

Devido a característica da amostra ou do processo de marcação ao qual ela foi submetida pode haver a formação de *doublets*, que consiste na agregação de duas células que ao passar na frente do *LASER* e é caracterizada apenas como um evento. As partículas estão tão juntas que quando passam pelo ponto de interceptação, o instrumento é incapaz de distingui-las como eventos individuais, separados, podendo alterar o resultado da análise aumentando e/ou diminuindo os percentuais relativos à intensidade de fluorescência de um determinado marcador (Figura 3.21). Por exemplo, se o *doublet* consistir em uma célula CD4⁺ e uma célula CD4⁻, você incluirá eventos negativos na sua análise acarretando alterações na percentagem final (Figura 3.21C). Enquanto se o *doublet* for de duas células CD4⁺ ou um *singlet* de CD4⁺ o evento

continuará sendo classificado como positivo (Figuras 3.21D, 3.21A, respectivamente) e se o evento consistir num *doublet* de CD4^{neg}, o evento que será classificado como negativo (Figura 3.21B).

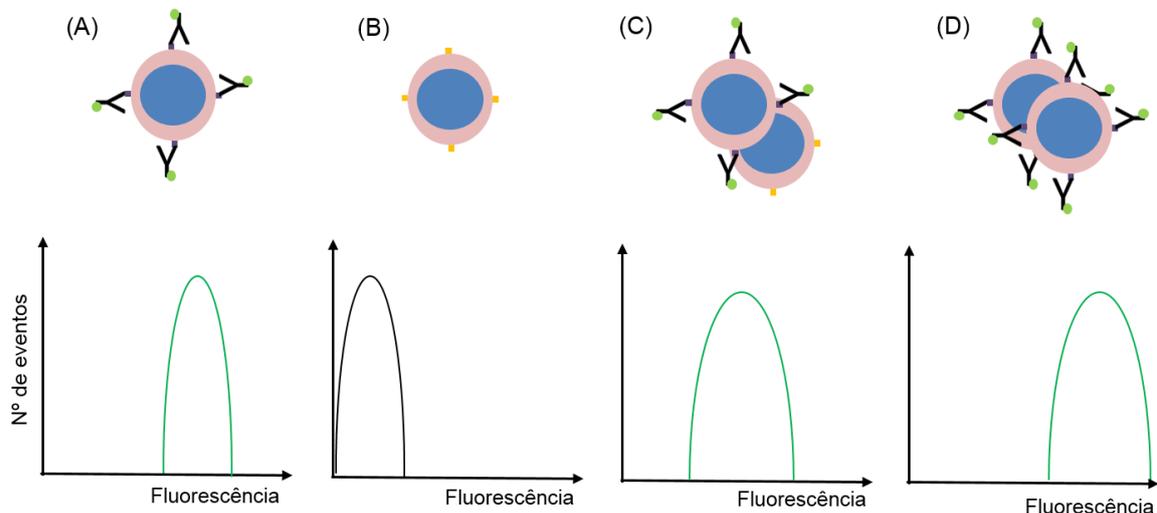


Figura 3.21 - Esquema de formação de *doublets*, o qual nas duas primeiras ilustrações (A e B) apenas uma célula passou pelo ponto de interceptação (*singlets*) enquanto nas duas últimas ilustrações (C e D) duas células passaram juntas pelo ponto de interceptação caracterizando apenas um evento (*doublets*). (A) Célula CD4⁺ marcada como um anticorpo anti-CD4; (B) Célula CD4^{neg} marcada como um anticorpo anti-CD4; (C) Uma célula CD4⁺ e outra CD4^{neg}; (D) Duas células CD4⁺ marcadas como um anticorpo anti-CD4.

Quando uma célula atravessa a câmara de fluxo (*Flow Cell*) e é interceptada pelo feixe do *LASER* parte desta radiação é espalhada, juntamente com a fluorescência emitida pelo fluoróforo para os detectores, gerando um pulso eletrônico. Esse pulso é monitorado e processado pela parte eletrônica do citômetro, gerando os parâmetros de Área (A do inglês *Area*), Altura (H do inglês *Height*) e largura (W do inglês *Width*) H é a altura é do pico do pulso, W é a largura do pulso, ou seja, relativa ao tempo que a célula é interceptada pelo *LASER*, e A é H x W (Figura 3.22).

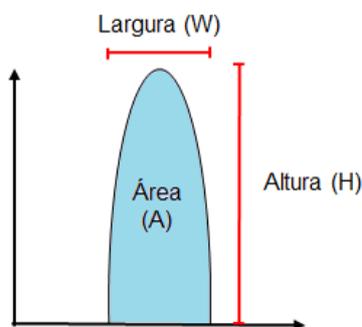


Figura 3.22 - Pulso gerado pela passagem de um evento ao passar pelo *LASER* no ponto de interceptação.

Quando duas células passam juntas na frente do *LASER* o pulso gerado por esse evento é alterado (Figura 3.23). Tanto a área (A) quanto a largura (W) do pulso do *doublet* são maiores do que a do *singlet* já que duas células levam mais tempo passando pelo feixe de *LASER* do que uma única célula, mas as alturas (H) dos dois pulsos são muito próximas, se não idênticas.

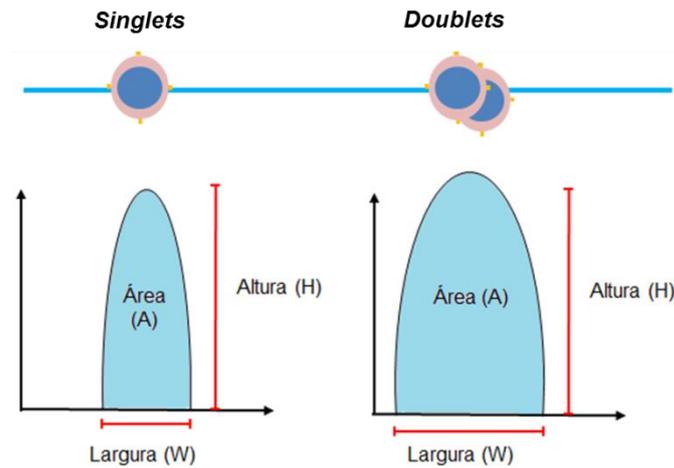


Figura 3.23- Ilustração do pulso gerado por um *singlet* quando interceptado pelo *LASER* (a esquerda) e do pulso gerado por um *doublet* quando interceptado pelo *LASER* (a direita).

Então como fazer a discriminação de *doublets* e *singlets* na análise dos resultados? Isso pode ser feito de diversas maneiras, porém a mais utilizada emprega gráficos (*do plots*) de dispersão frontal (FSC - forward scatter) combinado distintamente com os três parâmetros de medida do pulso (H, W e A) (Figura 3.24).

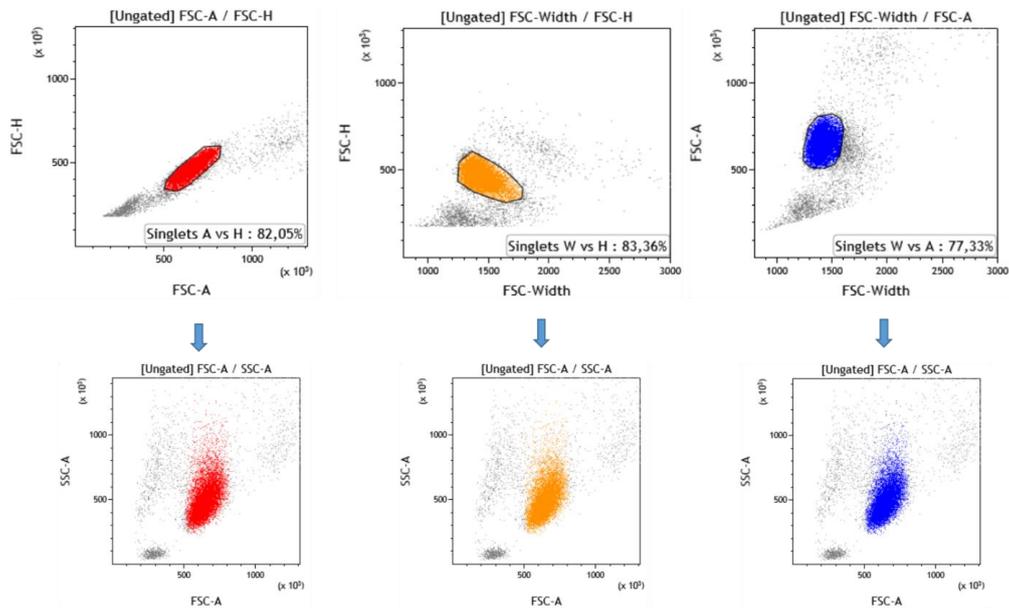


Figura 3.24 - Gráficos para exclusão de *doublets*, feitos de três maneiras diferentes, a partir de uma população enriquecida de granulócitos. Na primeira linha as três combinações possíveis para a exclusão de *doublets*: FSC-Area (A) vs FSC-Height (H), FSC-Height (H) vs FSC-Widch (W) e FSC-Area (A) vs FSC-Widch (W), respectivamente. Na linha abaixo o gráfico de morfologia (FSC-A vs SSC-A), mesma amostra, onde a população de *singlets* aparece colorida (*gate color*).

REFERÊNCIAS

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.

CAPÍTULO 4. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Katherine Kelda, Vanessa Costa, Alvaro Luiz Bertho

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 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 microrganismos como bactérias e vírus. Neste capítulo, trataremos de forma breve, as aplicações mais frequentes da citometria de fluxo.

4.1. Distinção de populações celulares

Para identificar e distinguir os 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), descritos anteriormente. O fenótipo celular, conhecido também como imunofenotipagem, pode ser avaliado pela presença de diferentes antígenos presentes em diversos compartimentos celulares como: membrana citoplasmática (receptores de superfície), citoplasma e núcleo.

A distinção de populações por imunofenotipagem será retratada em uma seção a parte, devido a sua maior complexidade (seção 4.2), nesse momento abordaremos as diferenças morfológicas entre as células.

Somente utilizando os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), é possível diferenciar algumas populações celulares. Como por exemplo, linfócitos, monócitos e granulócitos em sangue periférico humano, demonstrado na figura 4.1. Esta diferenciação, exclusivamente morfológica, pode ser considerada vantajosa, por não utilizar reagentes, como os anticorpos monoclonais. Entretanto, utilizando somente esses parâmetros talvez não seja possível distinguir as subpopulações com características semelhantes, como por exemplo os linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e T

CD8⁺, devido a este fato a identificação morfológica pode ser realizada juntamente com a imunofenotipagem.

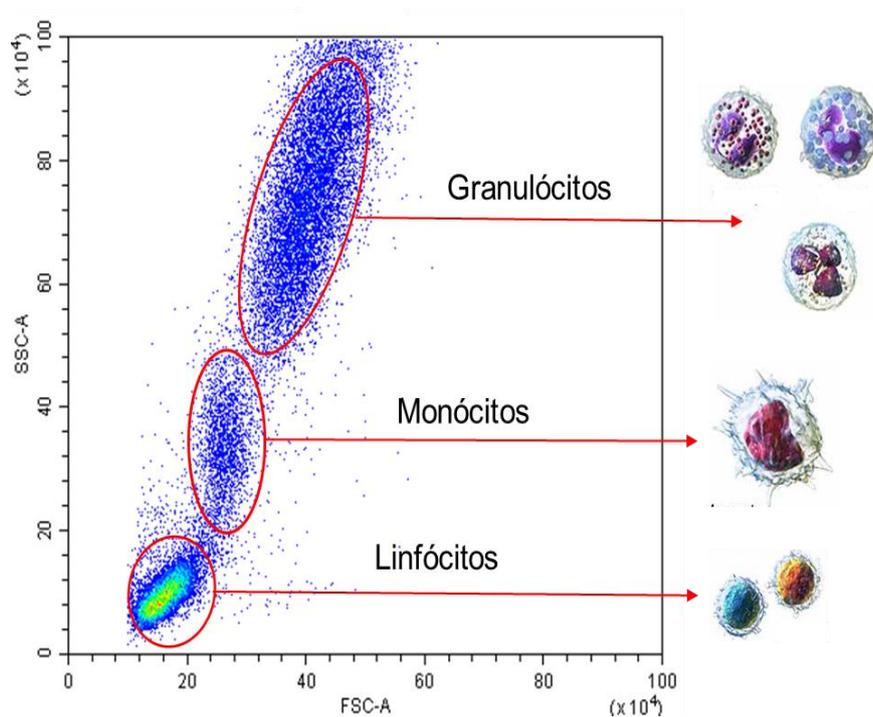


Figura 4.1 - *Forward scatter* (FSC) - tamanho e *Side scatter* (SSC) - granulosidade de sangue periférico humano após a lise de hemácias (*Lysis solution*), onde se observa que as células presentes nesse tipo de amostra possuem características morfológicas distintas. Fonte: Chometon & Bertho, 2017.

4.2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Atualmente a imunofenotipagem por citometria de fluxo pode ser considerada uma das ferramentas multiparamétricas mais relevantes para a definição de 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 imunomarcagem de antígenos de superfície celular ou intracitoplasmáticos. A imunofenotipagem auxilia fortemente na execução de diagnósticos clínicos, determinação de progressão da doença, monitoramento da resposta ou eficácia de tratamento; separação de células com determinado fenótipo para ensaios celulares funcionais *in vitro*, transferência celular autóloga ou adotiva para animais isogênicos ou imunodeficientes e análises de expressão gênica, proteica e metabólica de uma subpopulação celular específica. Vale ressaltar que a grande expansão das metodologias em citometria de fluxo pode estar relacionada diretamente à introdução da técnica de produção de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas (Figura 4.2). Com a conjugação de fluoróforos 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 variedade de aplicações vem sendo introduzida, tanto no âmbito da pesquisa quanto da medicina diagnóstica (Figura 4.3).

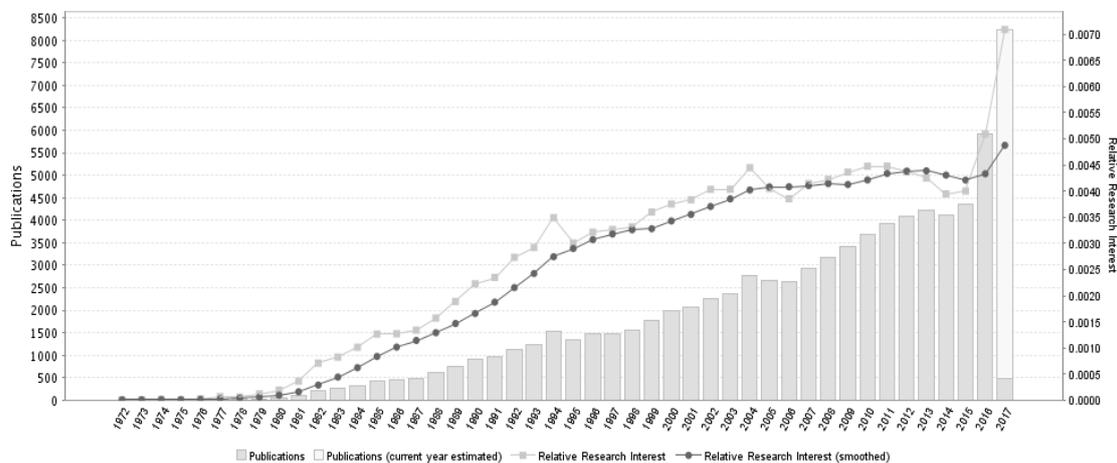


Figura 4.2 - Gráfico mostrando o número de artigos publicados utilizando a citometria de fluxo por ano, desde 1976 até 2016. Fonte: <http://www.gopubmed.com>

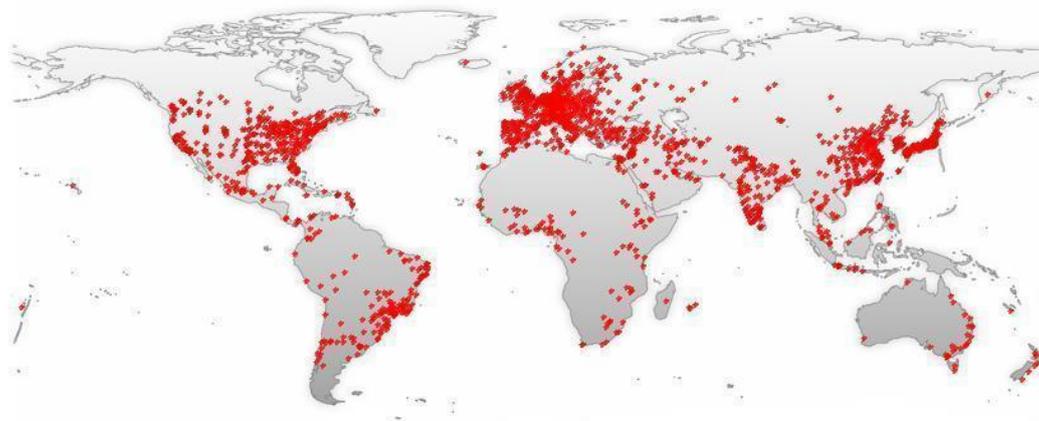


Figura 4.3 - Distribuição mundial (dados de 2017) da utilização da citometria de fluxo. Fonte: <http://www.gopubmed.com>

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 estar 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 hemoglobinúria 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. A 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 encontram ligados a plaquetas. Muitos marcadores de ativação plaquetária também têm sido avaliados e são de importância clínica, como nos casos de infarto de miocárdio, 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 úteis 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 têm 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 ao transplante), por exemplo. Entretanto, nessa etapa estas células geradas a partir de células pluripotentes induzidas são marcadas 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 (Tabela 4.1). Entretanto, a cada dia outras aplicações vêm sendo desenvolvidas em diversas áreas de estudo. A seguir, serão abordadas algumas destas outras aplicações.

Tabela 4.1 - Exemplos de aplicações clínicas frequentes da citometria de fluxo.

PRINCIPAIS APLICAÇÕES CLÍNICAS DA CITOMETRIA DE FLUXO		
ÁREA	APLICAÇÕES CLÍNICAS	MOLÉCULAS COMUMENTE AVALIADAS
IMUNOLOGIA	Histocompatibilidades por crossmatch	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
	Fenótipos de leucemias e linfomas	Antígenos leucocitários do sangue
HEMATOLOGIA	Contagem de células hematopoiéticas progenitoras	CD34
	Contagem de reticulócitos	RNA
	Enfermidades autoimune e aloimunes	IgG, IgM, Proteína do Complemento
BANCO DE SANGUE	Eritroblastose	Hemoglobina F, antígeno D
	Imunohematologia	Antígenos eritrócitos de superfície
	Contaminação leucocitária	Antígenos leucocitários de superfície
DESORDENS GENÉTICA	PNH	CD55, CD59
	Deficiência de adesão leucocitária	CD11, Complexo CD18

4.3. 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 4.2.

Tabela 4.2 - Corantes fluorescentes mais utilizados na marcação de DNA.

FLUORÓFORO	ABREVIÇÃO	EXCITAÇÃO (LASER)	EMIÇÃO
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 4.4).

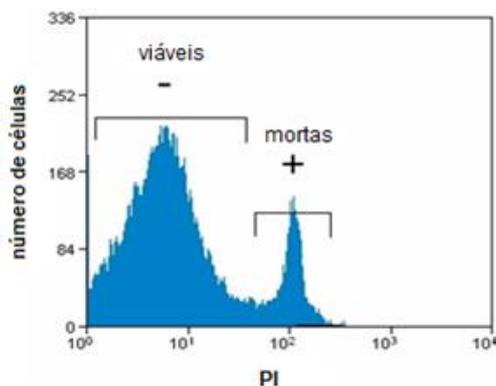


Figura 4.4 - Histograma citofluorimétrico de número de células vs. intensidade de fluorescência do PI em diferentes protocolos: para viabilidade celular.

Os protocolos utilizados para identificar as células em diferentes fases do ciclo celular necessitam de 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 4.4). É importante salientar que as escalas utilizadas nos histogramas para análise nos protocolos descritos acima devem ser logarítmicas e lineares, respectivamente (Figura 4.4 e 4.5).

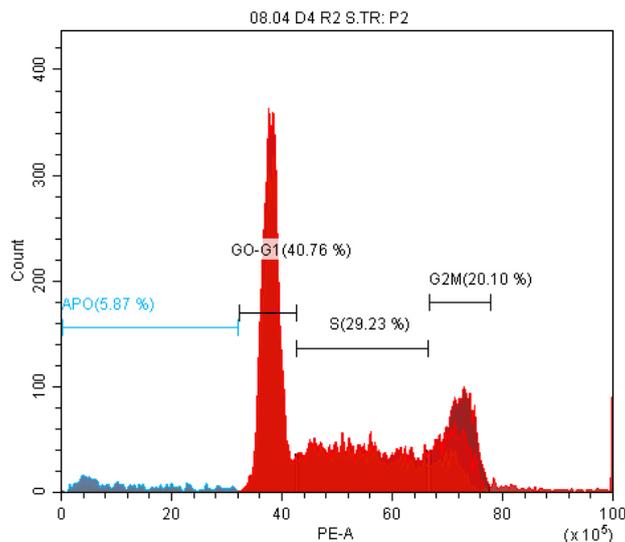


Figura 4.5 - Histograma citofluorimétrico de número de células vs intensidade de fluorescência para avaliação do ciclo celular. Fonte: Chometon & Bertho, 2017

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 fluoróforos 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 fluoróforo 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 4.6).

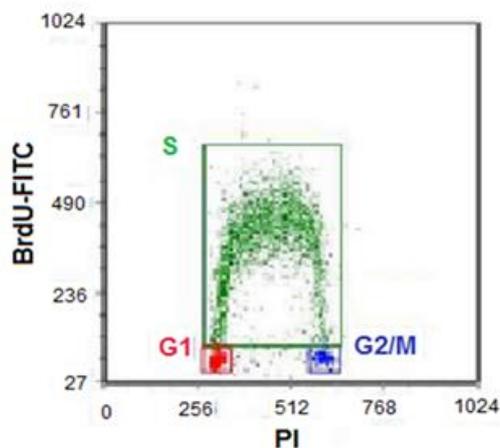


Figura 4.6 - Avaliação das fases G1, S, G2/M do ciclo celular através de *dot plot* da fluorescência de FITC (conjugado a BrdU) vs fluorescência do PI.

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 4.7).

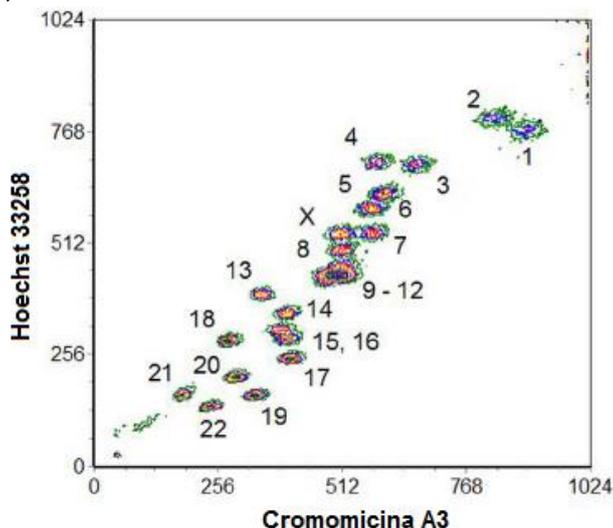


Figura 4.7 - Avaliação de cariótipo normal humano através de *dot plot* da marcação de Hoechst 33258 vs. cromomicina A3.

4.4. 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 4.8), 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.

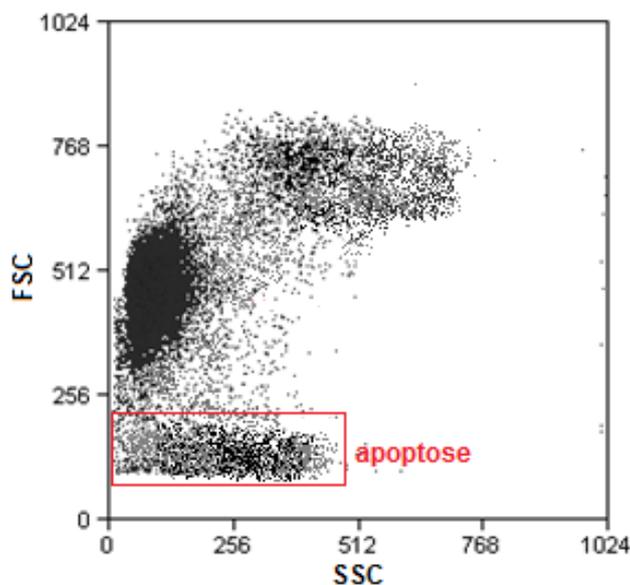


Figura 4.8 - *Dot plot* de tamanho (FSC) vs. granularidade (SSC) de uma amostra de células mononucleares de sangue periférico, no qual é possível observar as células que provavelmente se encontram em processo de apoptose, devido à diminuição de tamanho, como resultado do encolhimento celular, e aumento 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 fluoróforo. 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 4.9A). 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 4.9B).

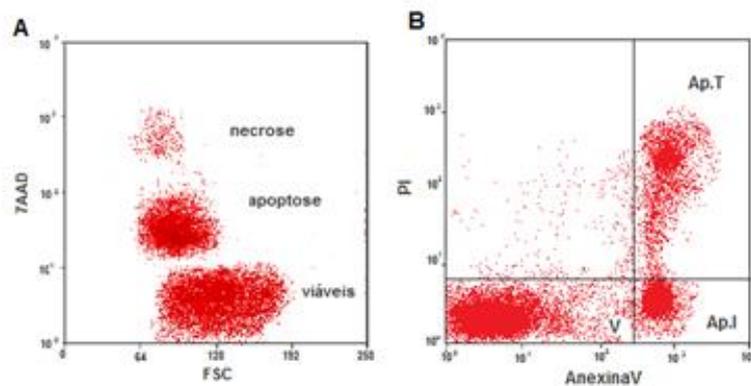


Figura 4.9 - (A) *Dot plot* de tamanho (FSC) vs a fluorescência de 7-AAD, permitindo a visualização de três populações: células viáveis, células em apoptose e células em necrose; (B) *Dot plot* da fluorescência do PI vs a fluorescência da Anexina V, diferenciando as células em necrose (N), em apoptose tardia e/ou necrose (Ap.T), em apoptose inicial (Ap.I) e as viáveis (V).

4.5. 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. 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 4.10).

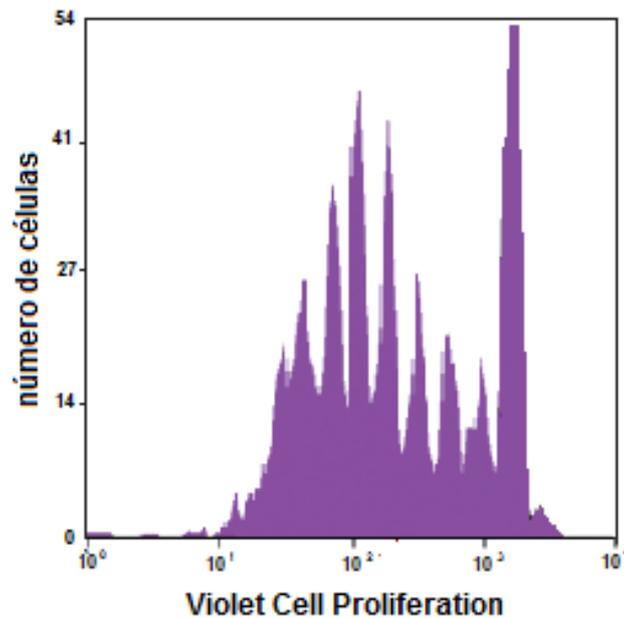


Figura 4.10 - Histograma da intensidade de fluorescência do *Violet Cell Proliferation*. Os picos representam sucessivamente, da maior para a menor intensidade, as divisões das células em análise. Adaptado de <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C34557>

4.6. 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 *fluo-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 experimentais 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.

4.7. *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 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 fluoróforos 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 4.11). Assim, quanto maior a concentração do analito, maior a marcação do anticorpo secundário e, conseqüentemente, o deslocamento do grupo de esferas no histograma (Figura 4.12). 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.

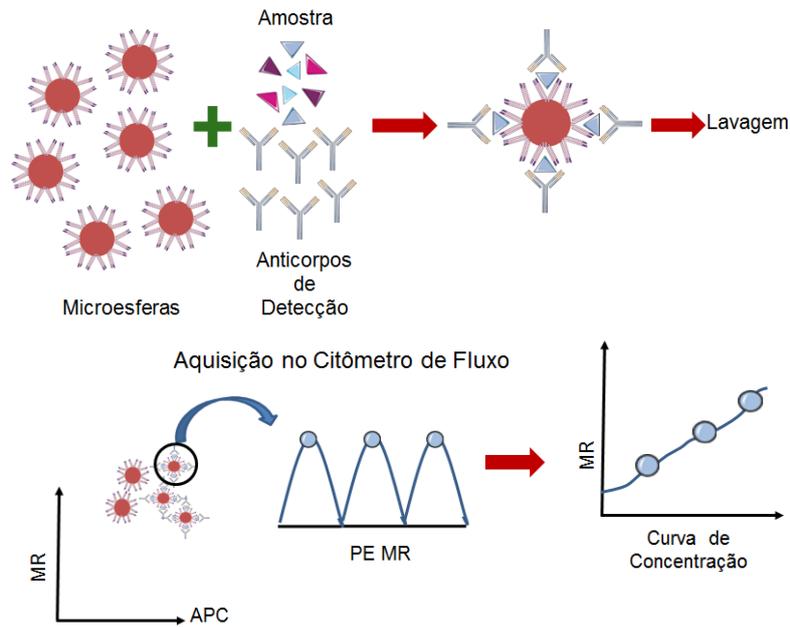


Figura 4.11 - Desenho esquemático do princípio da técnica de *Bead-based immunoassay*. Adaptado de http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Brochure_Intl.pdf por Renzetti, 2018

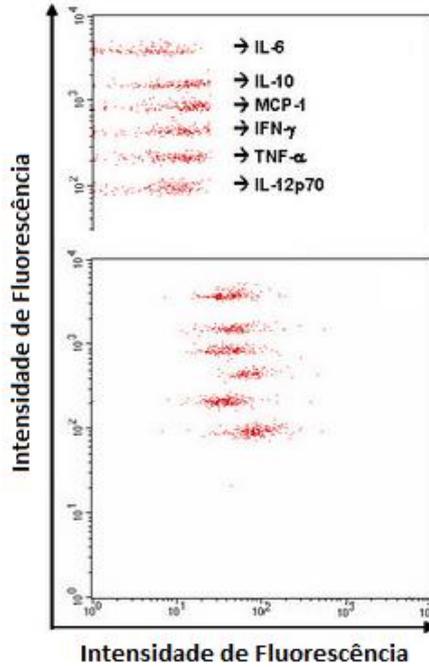


Figura 4.12 - Exemplo de *dot plots* de marcações para citocinas por CBA. O eixo X corresponde à intensidade de fluorescência das microesferas; e o eixo Y à intensidade dos anticorpos monoclonais. Adaptado de Hemdan, 2008.

4.8. Análises de Vesículas Extracelulares

As Vesículas Extracelulares (VEs) são estruturas liberadas pela membrana de diferentes tipos celulares sob diferentes aspectos fisiopatológicos. Atualmente, são classificadas de acordo com seu tamanho e processo de formação, variando entre 50 nm e 1000 nm (Van Niel, D'angelo & Raposo, 2018). Tais partículas 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 VEs, sendo que as plaquetas liberam a maior quantidade delas, correspondendo a 70%-90% do total de VE no plasma de indivíduos saudáveis.

Muitos estudos têm sugerido uma associação entre micropartículas e diferentes condições patológicas, como câncer, doenças 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 VE, 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 VEs 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 VEs 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 VEs 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 VEs para a posterior identificação por citometria de fluxo, não há um consenso ou um protocolo uniforme. As VEs 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 das VEs 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 VEs.

Por tratarem de moléculas muito pequenas é necessária muita cautela para caracterizá-las por citometria de fluxo. Geralmente *beads* de tamanhos já conhecidos são utilizados para auxiliar na identificação de diferentes de diferentes tamanhos (Figura 4.13).

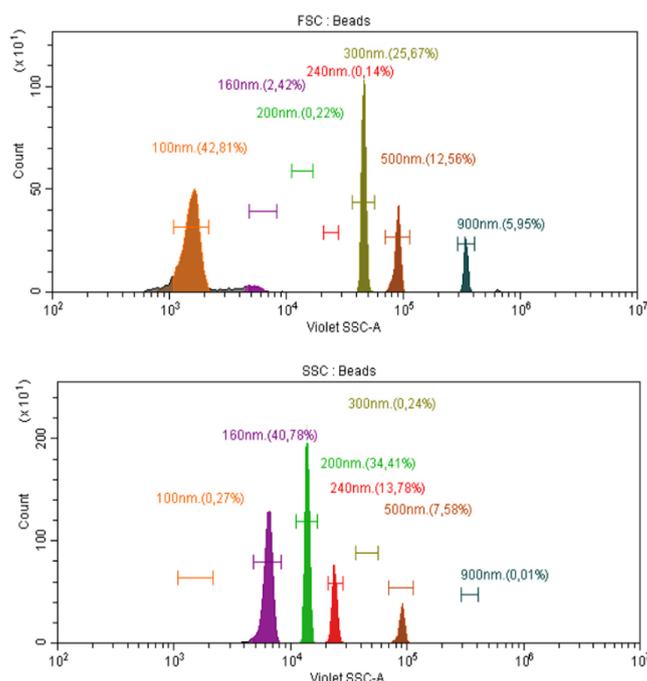


Figura 4.13 – Histogramas representando *beads* de diferentes diâmetros observadas por citometria de fluxo. Fonte: Costa & Chometon & Bertho, 2019

Além disso, diferentes marcadores como a calceína, anexina V são utilizados para identificar as VEs de maneira geral. A Calceína AM é uma substância não fluorescente que em partículas íntegras 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 íntegras. Enquanto a anexina V se liga à fosfatidilserina presente na membrana das VEs. As verdadeiras VEs são consideradas como os eventos duplo-positivos para anexina V e Calceína AM (Figura 4.14). Após a definição das VEs, essas vesículas podem ser analisadas e classificadas quanto à sua origem, utilizando diferentes marcadores (Tabela 4.3), como por exemplo, CD41 que analisa VEs

originadas pelas plaquetas, e CD235a que analisa as VEs originadas pelas hemácias (Figura 4.14).

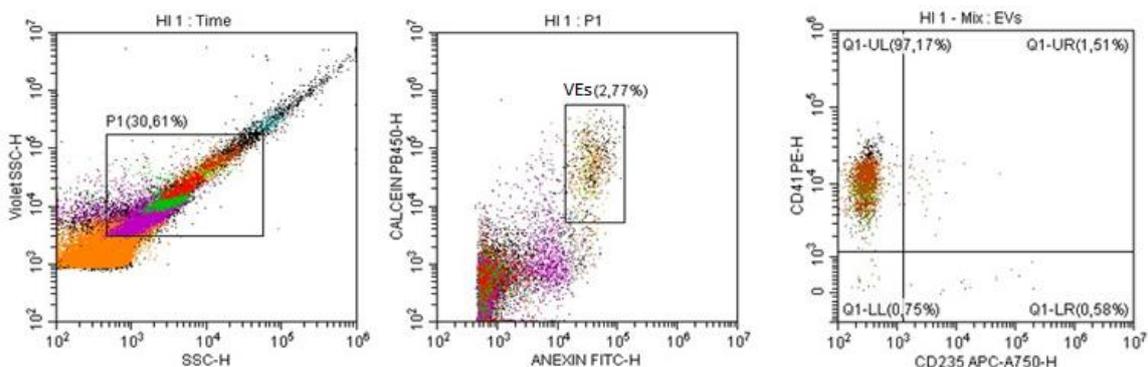


Figura 4.14 - Para definição de VEs após seleção da população pela morfologia (VioletSSC x SSC), todos os eventos positivos para a anexina-V e a calceína AM são definidos como eventos MP "verdadeiros". Após a definição de VEs, analisamos suas possíveis origens, como por exemplo, VEs derivadas de plaquetas (CD41) ou hemácias (CD235a). Fonte: Costa & Chometon & Bertho, 2019.

Tabela 4.3 - Principais marcadores utilizados para identificação da origem das VEs.

ORIGEM DA VE	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	CD62 e/ou CD144
Granulócitos	CD66b
Eritrócitos	CD235a
Neutrófilos	CD15

4.9. Nanopartículas

Nas últimas décadas, estudos em nanotecnologia vem crescendo tanto em investimento em pesquisas básicas, quanto no desenvolvimento tecnológicos, diagnósticos e em tratamentos, sendo utilizados na formação de fármacos. A base da nanomedicina é o estudo sobre nanopartículas, em que não possui uma definição concreta, entretanto, segundo o resumo do documento “*Publicly Available Specification*” - PAS71, que foi elaborado na Inglaterra, descreve: “Uma nanopartícula é um corpo contendo uma dimensão da ordem igual ou menor de 100nm”. As nanopartículas podem ser feitas de “*Bulk*” (conjunto de partículas sólidas), ouro, prata, carbono e magnéticas.

Com isso, estudos envolvendo a resposta imune inata adicionados as nanopartículas em seus experimentos, apresentaram uma resposta favorável no que se diz respeito a não toxicidade por meio das nanopartículas e assim, pode ser observado a fenotipagem celular, das células em questão, que no caso foi os neutrófilos.

Os neutrófilos participam da primeira linha de defesa contra os patógenos intra e extracelulares, migrando imediatamente para os sítios de inflamação à infecção ou até mesmo a exposição de partículas. Quando ativados, fagocitam e liberam reativos de oxigênio para a destruição dos patógenos, além disso, liberam citocinas e quimiocinas que são primordiais para a resposta imune adaptativa. Os neutrófilos foram caracterizados como células efetoras homogêneas e diferenciadas terminais, no entanto recentemente, alguns estudos apontam para a sua heterogeneidade e diversidade fenotípica, que podem reconhecer as subpopulações por marcadores de superfícies específicos.

Para entender o mecanismo das funções das subpopulações de neutrófilos, um grupo de pesquisa, fizeram cultivo celular de neutrófilos juntamente com as nanopartículas de prata (AgNP) e Ag "Bulk" e analisaram pela técnica de citometria de fluxo a viabilidade de neutrófilos por coloração de Anexina-V e PI (Figura 4.15), nos quais, mostraram o aumento de neutrófilos em apoptose tardia, quando foram expostos ao AgNP.

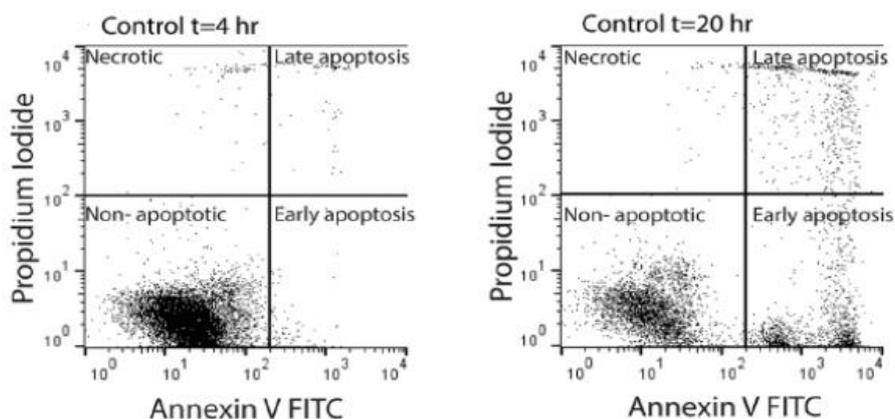


Figura 4.15 - Gráficos de *dot plots* que representam os neutrófilos marcados com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio-PI em cultura por 4 horas e 20 horas. Observa-se que neutrófilos em cultura por 20 horas, estimulam mais a apoptose inicial do que a apoptose tardia, enquanto a cultura de 4 horas, não foi possível observar esse fenômeno. Fonte: Fraser et al., 2018.

As subpopulações de neutrófilos foram analisadas por citometria de fluxo, identificando a diversidade dos fenótipos em: neutrófilos maduros (CD16bright/CD62Lbright), imaturos (CD16dim/CD62Lbright) e apoptóticos (CD16dim/CD62Ldim) (Figura 4.16). Quanto a exposição por AgNP, foi demonstrado

que essa nanopartícula pode estar associada ao estímulo da ativação e maturação dos neutrófilos. Por outro lado, o mesmo estudo relata que o AgNP realiza a ativação de neutrófilos sem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e necrose (Figura 4.17). Este estudo ainda sugere que, as partículas podem ser eliminadas sem causar inflamação prejudicial, já que nanopartículas de prata podem conferir toxicidade aos neutrófilos e assim desencadear reações inflamatórias.

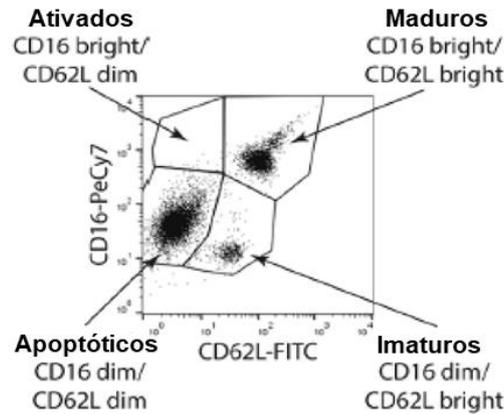


Figura 4.16 - Representação das subpopulações de neutrófilos marcados com anticorpos CD16-PeCy7 e CD62L-FITC em gráficos *dot plots*. As marcações identificadas como: CD16 bright/CD62L dim, são neutrófilos ativados; CD16 bright/CD62L bright, são neutrófilos maduros; CD16 dim/CD62L bright, são neutrófilos imaturos; CD16 dim/CD62L dim, são neutrófilos apoptóticos. Fonte: Fraser et al., 2018.

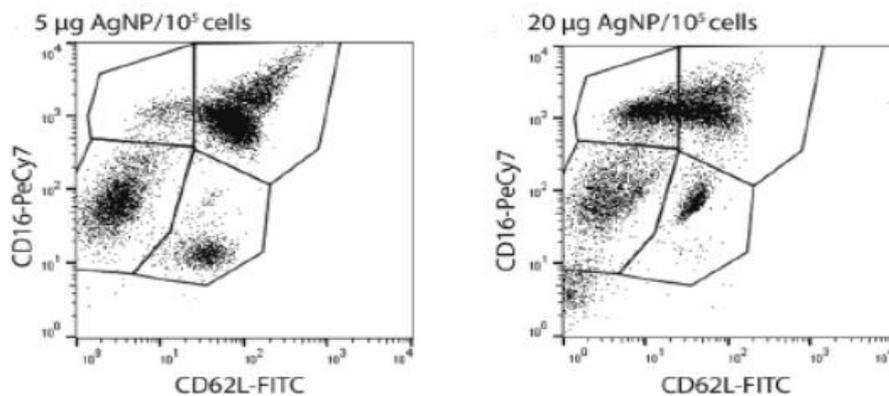


Figura 4.17 - Gráficos de *dot plots* que representam neutrófilos expostos a nanopartículas de prata - AgNP em diferentes concentrações 5ug AgNP/105 células e 20ug AgNP/105 células, nos quais observam-se as diferentes subpopulações de neutrófilos. Fonte: Fraser et al., 2018.

4.10. Análise de microrganismos

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 microrganismos torna 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 microrganismo, 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.

4.11. 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 4.18).

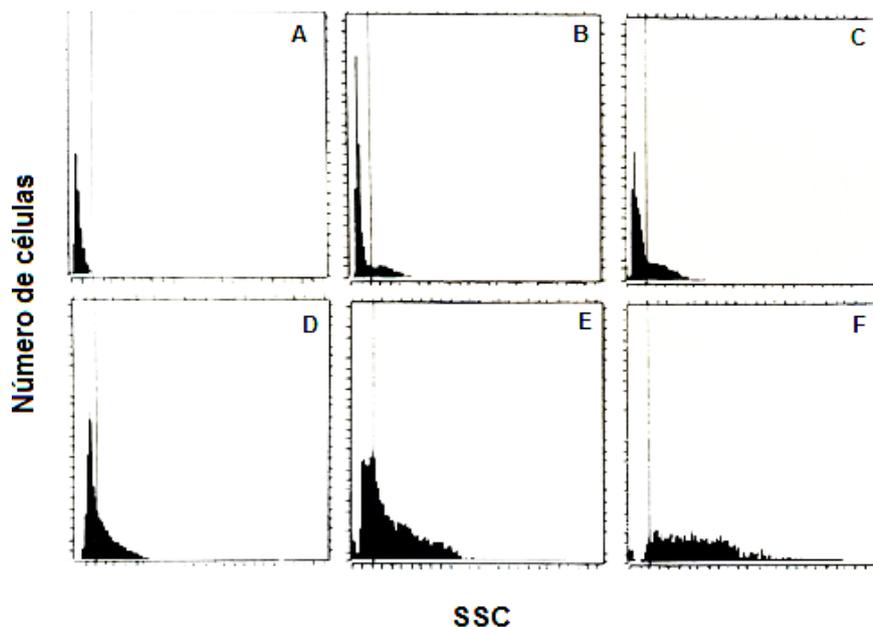


Figura 4.18 - Dot plots de número de células vs. granularidade (SSC) de uma cultura de macrófagos com *Leishmania* em diferentes momentos (A - tempo zero de cultura). É possível observar o aumento da granularidade ao longo do tempo de cultura, o que representa a invasão das *Leishmanias* nos macrófagos. Fonte: Bertho et al, 1992.

4.12. 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 microrganismos principalmente através da avaliação de tamanho e granularidade, autofluorescência e análise de DNA e RNA (Figura 4.19), 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 microrganismos presentes nos mananciais aquáticos, como oceanos, lagoas e rios, fornecem um monitoramento acurado da qualidade da água destes ambientes.

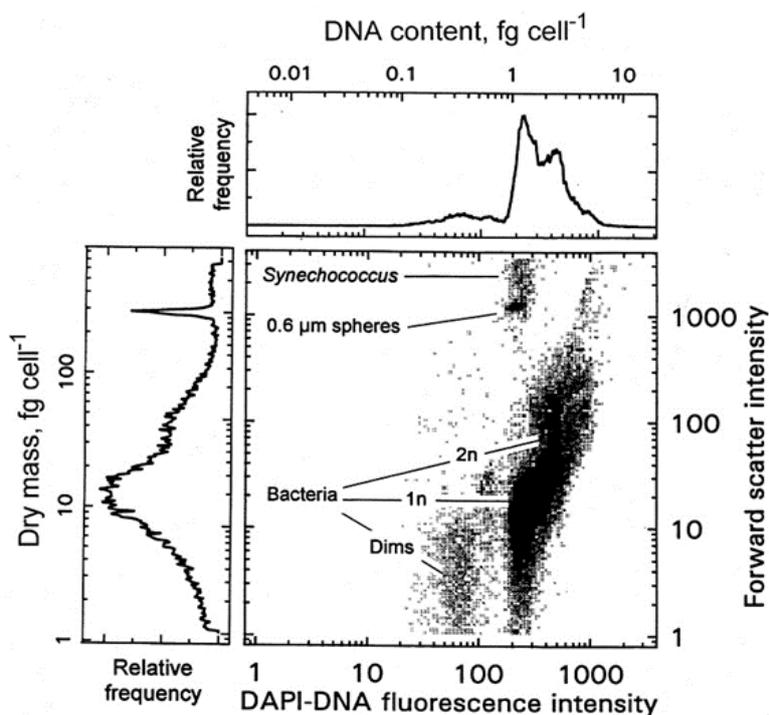


Figura 4.19 - Dot plot de bactérias marinhas em uma amostra de água coletada no Golfo do Alaska. A análise de células com baixa intensidade de incorporação do DAPI (*dims*), um agregado na posição semelhante de *Synechococcus*, e células 1n e 2n são indicadas. Avaliação do tamanho (FSC) e conteúdo de DNA (através da marcação com DAPI) de bactérias. Fonte: Button & Robertson, 2011.

4.13. Vacinas

A citometria de fluxo multiparamétrica é uma grande ferramenta laboratorial especializada e muito aplicada na clínica médica para o diagnóstico de câncer, imunodeficiências primárias e secundárias e prognóstico de pacientes com HIV e leucemias. Além disso, consiste em avaliar funções celulares, analisar as respostas imunes proporcionando o monitoramento de inúmeros marcadores de superfície celular e intracelular e identificação dos fenótipos, melhorando assim, a caracterização das respostas imunes.

Estudos sobre vacinas propõe-se cada vez mais a entender os mecanismos protetores cruciais em vacinas licenciadas e candidatas. Quase todas as vacinas licenciadas, consistiram em pesquisas baseadas em imunidade humoral, detecção de anticorpos, como fator de proteção. No entanto, a imunidade celular que também possui um papel protetor, são alvos de ensaios vacinais para Malária, Tuberculose, Leishmaniose e Aids. Em contrapartida, pesquisas relacionadas no desenvolvimento de vacinas enfrentam alguns desafios como: a identificação de antígenos que medeiam respostas imunes específicas ao patógenos, e o reconhecimento de biomarcadores a respostas protetoras e adversas (reatogênicas).

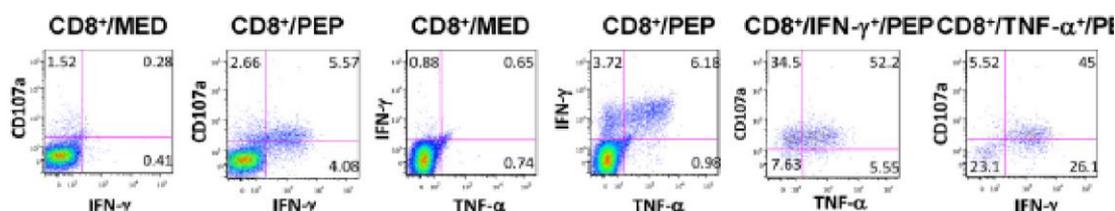
Para análise das respostas imunes induzidas pela vacina ou até mesmo alguma proteína e ou peptídeos, envolve a quantificação das frequências e avaliação das funções dos linfócitos T e B específicos ao antígeno em questão. Apesar de outras técnicas fornecerem essas informações, como a linfoproliferação por timidina e detecção de anticorpos; a citometria de fluxo multiparamétrica, possui uma capacidade de identificar simultaneamente outras características de respostas celulares específicas ao antígeno, como a imunofenotipagem.

A caracterização fenotípica da resposta imune frente a vacinas, devem produzir respostas de células T e B de memória, sendo aptos para responder ao antígeno, e assim, conferir resposta protetora humoral e celular de longa duração.

Nesse sentido, estudos em modelo murino por infecção de *Trypanosoma cruzi*, utilizando adenovírus humano 5 (HuAd5) primer-recombinante do DNA plasmidial como ferramenta de estratégia para estimulação da imunização, apresentou aspectos funcionais e fenotípicos de células T CD8 específico presentes 14 ou 98 dias após a última dose de imunização. Após estimulação *in vitro*, foi observado um declínio no percentual da frequência de células T CD8 multifuncionais (CD107a⁺, IFN- α ⁺ ou CD107a⁺, IFN- α ⁺ e TNF- α ⁺), e, por um aumento de CD107a simples positivo após 98 dias da última dose de imunização (Figura 4.20 A e B). Além disso, este estudo relata

que as células T CD8 de memória efetora está correlacionado com a proteção durante os dias de infecção pelo parasito.

A- pIgSPCI.9/AdASP-2 (14 d)



B- pIgSPCI.9/AdASP-2 (98 d)

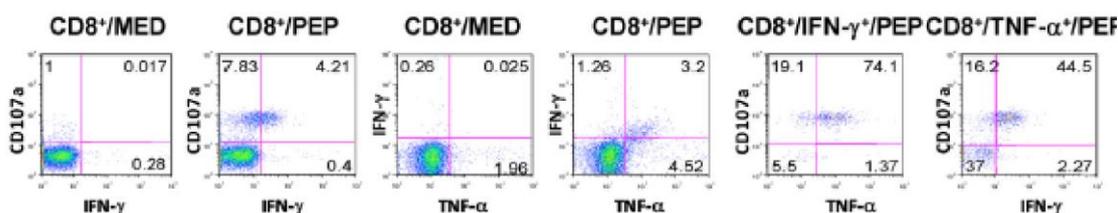


Figura 4.20 - Gráficos de *dot plots* que representam as intensidades de fluorescências das células que foram marcadas com anticorpos anti-CD8, anti-IFN- γ , anti-TNF- α e CD107a. Observa-se a expressão CD107a e citocinas intracelulares por T CD8⁺ específico que foram induzidas por DNA plasmidial recombinante, iniciando o esquema de vacinação HuAd5 14 (A) ou 98 (B) dias após a última dose da imunização. Fonte: Rigato et al., 2011.

Por outro lado, estudos envolvendo modelos experimentais murinos por infecção de *Leishmania major*, demonstraram a avaliação de células T CD4⁺ produzindo IFN- γ , IL-2 e TNF- α (células T multifuncionais) simultaneamente, em uma única célula, em que pode conferir proteção em camundongos quando imunizados (Figura 4.21). Além disso, a resposta das citocinas das células T CD4⁺, pode ser fundamental para estudos sobre vacinas em relação ao caráter de proteção, e pode ser utilizado como um indicativo prospectivo de vacinas baseadas em células T_H1 (do inglês T *helper* 1).

As células multifuncionais são consideradas células com uma ótima função efetora, pois produzem IFN- γ ⁺ e TNF- α ⁺, que atuam em sinergismo na ativação de macrófagos, além de produzir a IL-2⁺ que está relacionada com a manutenção e sobrevivência dos linfócitos (T CD4 e T CD8) podendo ser capazes de gerar memória.

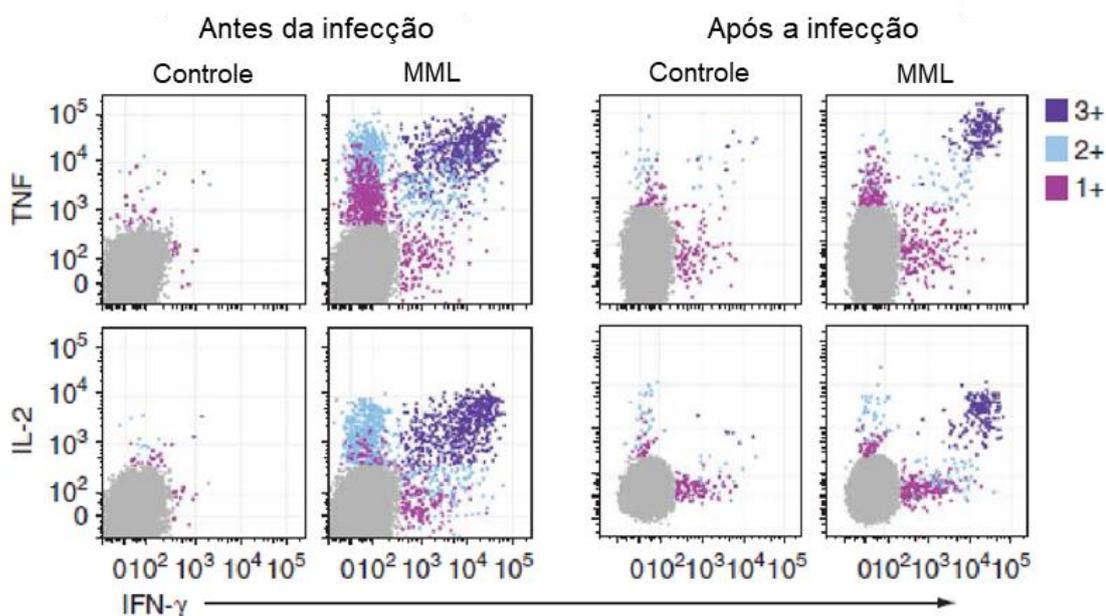


Figura 4.21 - Gráficos de *dot plots* que representam a intensidade de fluorescência que identificam as células multifuncionais (3+), células duplas positivas (2+) e células simples positivas (1+) em camundongos vacinados antes e após a infecção. Fonte: Darrah et al., 2007.

4.14. Citometria de Fluxo Espectral

A citometria de fluxo convencional é uma metodologia, eficaz e bastante utilizada, que permite a análise multiparamétrica de moléculas em suspensão. Apesar do vasto número de fluoróforos disponíveis no mercado, possibilitando a construção de painéis multicoloridos, a sobreposição de seus comprimentos de onda se torna um desafio ao montar painéis. Ao longo dos anos, houve muitos esforços para desenvolver citômetros capazes de captar um espectro óptico contínuo, dando origem a Citometria de Fluxo Espectral.

A citometria de fluxo espectral combina a citometria de fluxo convencional e espectroscopia de fluorescência para obter informações mais detalhadas sobre as partículas. Ao contrário da citometria de fluxo convencional, a citometria de fluxo espectral utiliza o espectrômetro, que é capaz de coletar todo o espectro de fluorescência emitido pelas amostras e separa os sinais de fluorescência sobrepostos, permitindo a análise simultânea de um grande número de fluoróforos (Figura 4.22).

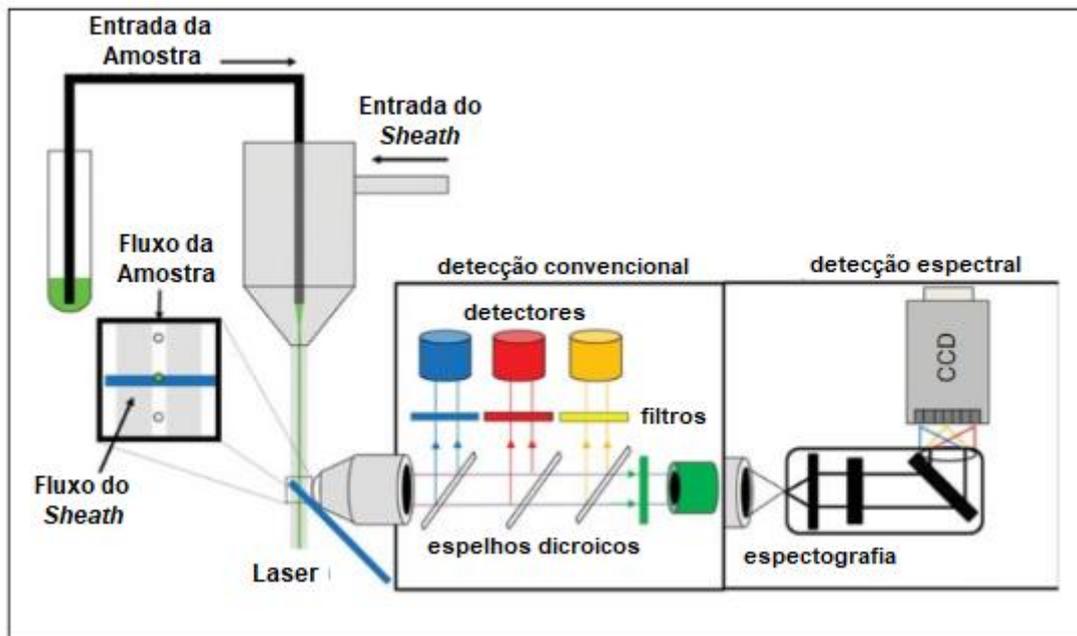


Figura 4.22 - Esquema comparativo mostrando a detecção da citometria de fluxo convencional e a citometria de fluxo espectral. Fonte: Nolan, 2013.

Uma das principais diferenças entre um citômetro de fluxo convencional e um citômetro de fluxo espectral é a dispersão. A óptica de um citômetro de fluxo convencional pode bloquear, refletir ou transmitir um fóton com base em seu comprimento de onda, enquanto os citômetros de fluxo espectral dispersam os fótons de acordo com o comprimento de onda.

Ao contrário da citometria de fluxo convencional, que utiliza filtros ópticos, prismas ou conjuntos de filtros para coletar apenas emissões de fluorescência em comprimentos de onda específicos, a citometria de fluxo espectral utiliza grades de difração para registrar o espectro de fluorescência completo das amostras. O sistema óptico é capaz de direcionar o feixe de laser para a amostra e coletar a luz dispersa e fluorescente gerada pelas partículas. Essa luz fluorescente é direcionada para as grades de difração, separando a luz em seus diferentes comprimentos de onda. Em seguida, a luz dispersa e fluorescente é direcionada para detectores de estado sólido, que captam a intensidade de cada comprimento de onda em uma resolução específica (Figura 4.22).

Outra grande diferença entre a citometria de fluxo convencional e a citometria de fluxo espectral é o detector. Ambos podem utilizar fotomultiplicadores (PMT) ou fotodiodos de avalanche (APD), sendo que os APDs possuem uma maior sensibilidade e eficiência quântica, melhorando o seu desempenho em comprimentos de onda superiores a 650 nm.

Através da utilização de vários detectores para medir a emissão de espectro total de cada fluoróforo, usando diferentes *LASERS* no sistema, uma assinatura para cada

fluoróforo é criado, o que chamamos de assinatura espectral. O espectro detectado por cada grupo ou arranjo forma uma assinatura espectral (Figura 4.23). Enquanto a citometria de fluxo convencional usa compensação para corrigir a sobreposição de fluorescência entre os fluoróforos, a citometria de fluxo espectral usa a “desmistura espectral”, onde através de uma equação matemática, é possível diferenciar as assinaturas espectrais.

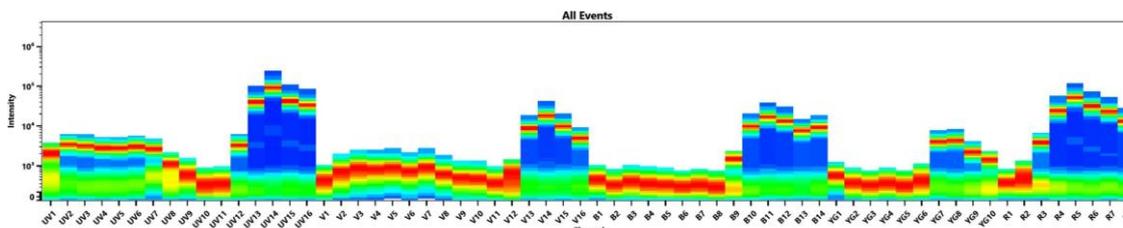


Figura 4.23 - Assinatura Espectral do corante BUV 737 no citômetro espectral Cytek Aurora (ThermoFisher).

A primeira demonstração de citometria de fluxo espectral foi demonstrada pelo Dr. Paul Robinson na Universidade de Purdue em 2004, e o primeiro citômetro de fluxo espectral foi criado em 2012 pela Sony Biotechnology, o qual utilizava PMTs como fotodetectores e prismas. Atualmente, um dos citômetros de fluxo espectral mais populares é o Cytek Aurora, da Cytek Biosciences, com configuração de 3 a 5 *LASERS* e visualização de mais de 40 cores (Figura 4.24).



Figura 4.24 - Citômetro de Fluxo Espectral Cytek Aurora (Cytek Biosciences).

4.15. Citometria de Fluxo de Imagem

A citometria de fluxo de imagem é um ramo da citometria convencional capaz de associar os princípios básicos da citometria com obtenção de imagens da microscopia, permitindo a captura de imagens de células únicas em alta resolução.

A configuração geral de um citômetro de imagem é bem similar ao citômetro convencional, a principal diferença consiste na utilização de um microscópio acoplado ao citômetro, o qual vai ser responsável pela obtenção das imagens. Esse microscópio pode ser confocal, de fluorescência invertida ou epifluorescência. Para a obtenção das imagens, as células são capturadas em uma lâmina revestida com uma matriz de poços, onde cada poço contém uma única célula, que é posteriormente visualizada individualmente pelo sistema de imagem microscópica acoplado ao citômetro de fluxo (Figura 4.25).

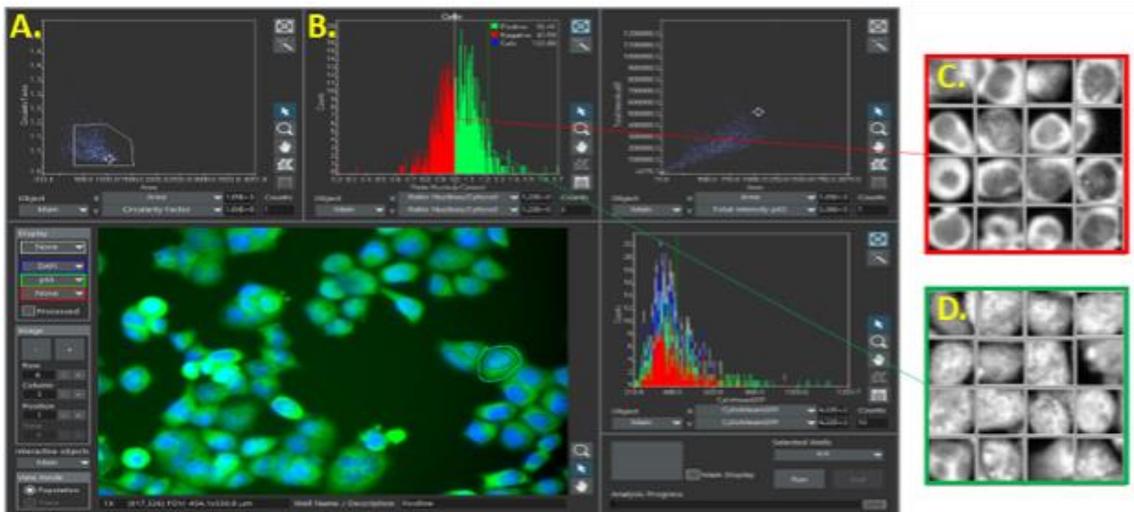


Figura 4.25 - Estratégia de *gate* e Imagem em alta resolução utilizando o software scanR, através da citometria de imagem. Fonte: Avi Smith, 2023.

Entre as diversas aplicações disponíveis, temos a avaliação da progressão do ciclo celular, medição da morte de células, ligação e comunicação entre células, e ainda aplicações na microbiologia marinha. Com auxílio dessa técnica, é possível monitorar a alteração em diferentes algas e microrganismos.

Atualmente, temos alguns equipamentos de imagem bastante utilizados na área da biológica e médica, entre eles: FlowSight (A), Image Stream X Mark II (B), Celligo (C), Cellometer (D) e Cellaca (E) (Figura 4.26), podendo variar sua configuração com 2 a 5 LASERs.

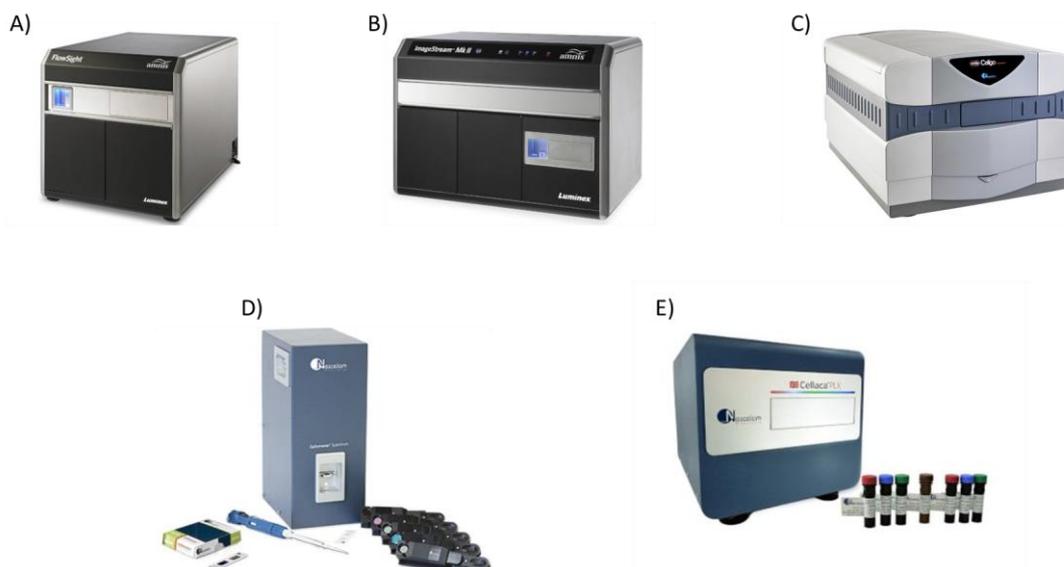


Figura 4.26 - Citômetros de Imagem FlowSight (A), Image Stream X Mark II (B), Celligo (C), Cellometer (D) e Cellaca (E).

REFERÊNCIAS

Baj-Kryworzeka M, Baran J, Szatanek R, Siedlar M. Intechopen [homepage na internet]. Application of Flow Cytometry in the Studies of Microparticles, 2012 [Acesso em maio de 2018.]. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/flow-cytometry-recent-perspectives/flow-cytometry-in-the-studies-of-microparticles>.

Bertho AL, Cysne L, Coutinho SG. Flow Cytometry in the study of the interaction between murine macrophages and the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. The Journal of Parasitology. 1992; 78(4).

Bolton DL & Roederer M. Flow cytometry and the future of vaccine development. Expert Review of Vaccines. 2009;8(6):779-789.

Brown, M & Wittwer, C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clinical Chemistry. 2000;46(8):1221-1229.

Button DK & Robertson BR. Determination of DNA content of aquatic bacteria by flow cytometry. American Society for Microbiology. 2001;67(4):1636-1645.

Cancino J, Marangoni VS, Zucolotto V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. Química Nova. 2014;37(3):521-526.

Darrah PA, Patel PD, De Luca PM, Lindsay RWB, Davey DF, Flynn BJ, Hoff ST, Andersen P, Reed SG, Morris SL, Roederer M, Seder RA. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine mediated protection against *Leishmania major*. Nature Medicine. 2007;13(7):843-850.

Downing J. The Lymphocyte Crossmatch by Flow Cytometry for Kidney Transplantation Christiansen, FT & Tait, BD (editors), Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice. Methods in Molecular Biology. 2012;882.

Errante PR, Kokron CM, Toledo-Barros M, Camargo MM, Rizzo LV. Alterações da imunidade celular associada à patogênese da Imunodeficiência Comum Variável Revista brasileira de alergia e imunopatologia. Revista Brasileira Alergia Imunopatologia. 2004;27(2).

Fraser JA, Kemp S, Young L, Ross M, Prach M, Hutchison GR, Malone E. Silver nanoparticles promote the emergence of heterogeneous human neutrophil subpopulations. Scientific Reports. 2018;8:7506.

Garner DL, Gledhill BL, Pinkel D, Lake S, Stephenson D, Van Dilla MA. et al. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing sperm of domestic animals by flow cytometry. Biology of Reproduction. 1983; 28:312-321.

Graff RJ, Buchanan PM, Dzebisashvili N, Schnitzler MA, Tuttle-Newhall J, Xiao H, Schadde E, Gheorghian A, Lentine KL. The Clinical Importance of Flow Cytometry Crossmatch in the Context of CDC Crossmatch Results. Transplantation Proceedings. 2010;42:3471-3474.

Gregor Holzner, Bogdan Mateescu, Daniel van Leeuwen, Gea Cereghetti, Reinhard Dechant, Stavros Stavrakis, Andrew deMello. High-throughput multiparametric imaging flow cytometry: toward diffraction-limited sub-cellular detection and monitoring of sub-cellular processes. Cell Reports. Volume 34. Issue 10. 2021.

Jentsch AM. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. Free Radical Biology & Medicine. 1996; 20:251-256.

Martins DM & Gagliani LH. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. Revista UNILUS Ensino e Pesquisa. 2008;5 (8).

Modesto TM, Neves MAB, Brito AE, Araújo RCP, Santos NFG, Valgueiro MC, Machado CGF. Importância e vantagem da citometria de fluxo frente aos testes de triagem no diagnóstico da hemoglobinúria paroxística noturna. Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia. 2006;28(4):275-279.

Nolan, J. P., & Condello, D. (2013). *Spectral Flow Cytometry. Current Protocols in Cytometry*. doi:10.1002/0471142956.cy0127s63

Reeves PM, Sluder AE, Paul SR, Scholzen A, Kashiwagi S; Poznansky MC. Application and utility of mass cytometry in vaccine development. The FASEB Journal. 2017;32(1):1-15.

Rigato PO, Alencar BC, Vasconcelos JRC, Dominguez MR, Araújo AF, Machado AV, Gazzinelli R, Romero OB, Rodrigues MM. Heterologous Plasmid DNA Prime-Recombinant Human Adenovirus 5 Boost Vaccination Generates a Stable Pool of Protective Long-Lived CD8 T Effector Memory Cells Specific for a Human Parasite, *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity. 2011;79(5).

Rouphael LI S, Duraisingham S, Romero-Steiner S, Presnell S, Davis C, Schmidt DS, Johnson SE, Milton A, Rajam G, Kasturi S, Carlone GM, Quinn C, Chaussabel D, Palucka AK, Mulligan MJ, Ahmed R, Stephens DS, Nakaya HI, Pulendran B. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. Nature Immunology. 2014;15:195-204.

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

Sales MM & Vasconcelos DM. Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa. São Paulo> Editora Atheneu, p. 3-19, 2013.

Samsel L & McCoy JP. Imaging flow cytometry for the study of erythroid cell biology and pathology. Journal of Immunological Methods. 2015;423:52-59.

Spectral Flow Cytometry Fundamentals available
<<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/flow-cytometry-learning-center/flow-cytometry-resource-library/flow-cytometry-methods/spectral-flow-cytometry-fundamentals.html>> acesso julho de 2023

Stewart CC & Nicholson JKA. Editors. Immunophenotyping. John Wiley & Sons; 2000.

Thammanichanond D, Athimang W, Paisooksantivatana K, Mongkolsuk T, Ingsathit A, Worawichawong S, Kitpoka P, Jirasiritham S, Kantachuvesiri S. Cytotoxic Flow Cytometric Crossmatch in Renal Transplantation: A Single Assay to Simultaneously Detect Antibody Binding and Cytotoxicity. Transplantation Proceedings. 2012;44:62-65.

CAPÍTULO 5. CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA AO ESTUDO DAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Andressa Cazote, Katherine Kelda Castro, Melissa Ponte, Vanessa Costa

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 indicarão 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.

5.1. AIDS e Infecção pelo HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o retrovírus causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (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 T CD4⁺ 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 quimiocina 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 5.1). 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% das pessoas vivendo com HIV (PVHIV) 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.

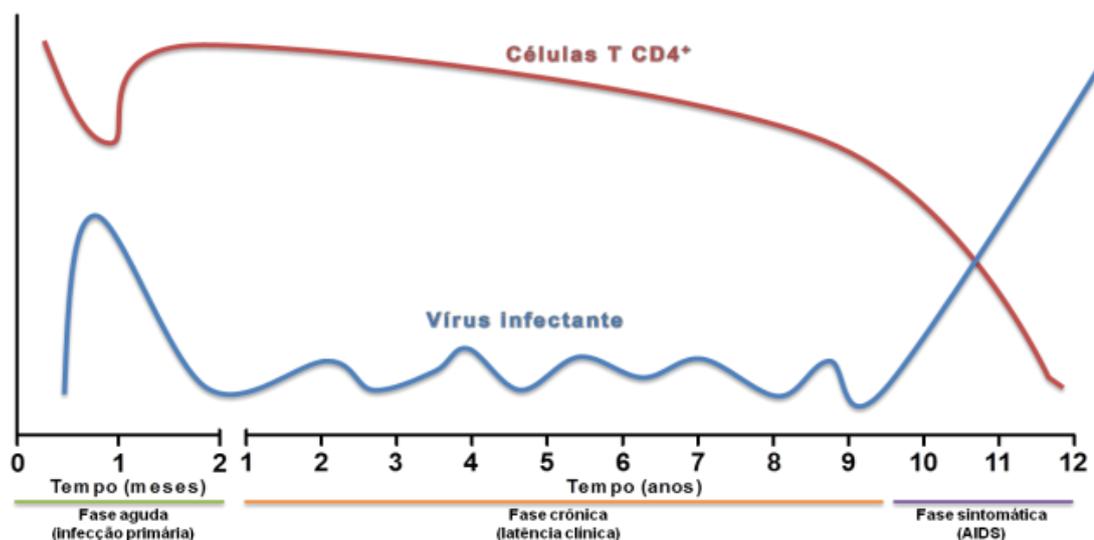


Figura 5.1 - Curso natural da infecção pelo HIV.

No curso da infecção pelo HIV e dependendo do número de células T CD4⁺, os primeiros sintomas inespecíficos podem ser observados; como episódios curtos de febre, diarreia, fadiga, perda de peso e letargia (sintomas chamados de complexo relacionado à aids - CRA). Quando a imunodeficiência progride, e a contagem de células T CD4⁺ é menor que 300/ μ L, o indivíduo está suscetível a infecções oportunistas e neoplasias, pela debilidade da resposta imune (German Advisory Committee Blood, Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood', 2016).

Patógenos frequentemente oportunistas em infecções pelo HIV são: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Pneumocystis jirovecii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spec.*, *pneumococcus*, poliomavírus humano JC, citomegalovírus (CMV) e vírus do herpes simples (HSV). As neoplasias típicas observadas são: sarcoma de Kaposi associado com vírus do herpes tipo 8 (HHV-8), linfoma não-Hodgkin, linfoma de célula B associado com vírus Epstein-Barr (EBV), e carcinomas de pênis, ânus e cérvix induzidos pelo vírus do papiloma humano (HPV) (German Advisory Committee Blood, Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood', 2016).

Dados na literatura sugerem que a co-infecção de HIV e *Mycobacterium tuberculosis* – MTB (patógeno da tuberculose), aumenta a progressão de ambas as doenças. Chetty e cols. (2015), avaliaram o impacto da co-infecção de *Mycobacterium tuberculosis* na função das células T CD4⁺ e CD8⁺ HIV-específicas utilizando citometria de fluxo. Maior carga viral de HIV é observada em pacientes com co-infecção, e a replicação do HIV aumentada ocorre em macrófagos infectados por MTB. Os maiores níveis de inflamação e ativação da resposta imune, como os encontrados na infecção

por tuberculose, podem proporcionar as condições ideais de citocinas para a replicação do HIV.

Foram utilizadas nesse estudo, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 13 indivíduos HIV positivos com TB ativa, 9 HIV positivos com TB latente (LTBI), 11 HIV positivos sem evidências de TB ativa ou latente. Todos os adultos com contagem de T CD4⁺ semelhantes e não se observou diferença significativa em relação a carga viral entre eles. A técnica utilizada foi a marcação intracelular de citocinas (ICS), para avaliar a funcionalidade das células T, pela investigação da capacidade de secreção das citocinas. As CMSPs foram estimuladas com um pool de peptídeos de Gag/HIV, pool de MTB e enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB). Os marcadores selecionados para a imunofenotipagem das células T secretoras de citocinas foram: anti-CD3, CD4, CD8, IFN- γ , TNF- α , IL-21, IL-27, IL-17 e um marcador de viabilidade celular (Figura 5.2).

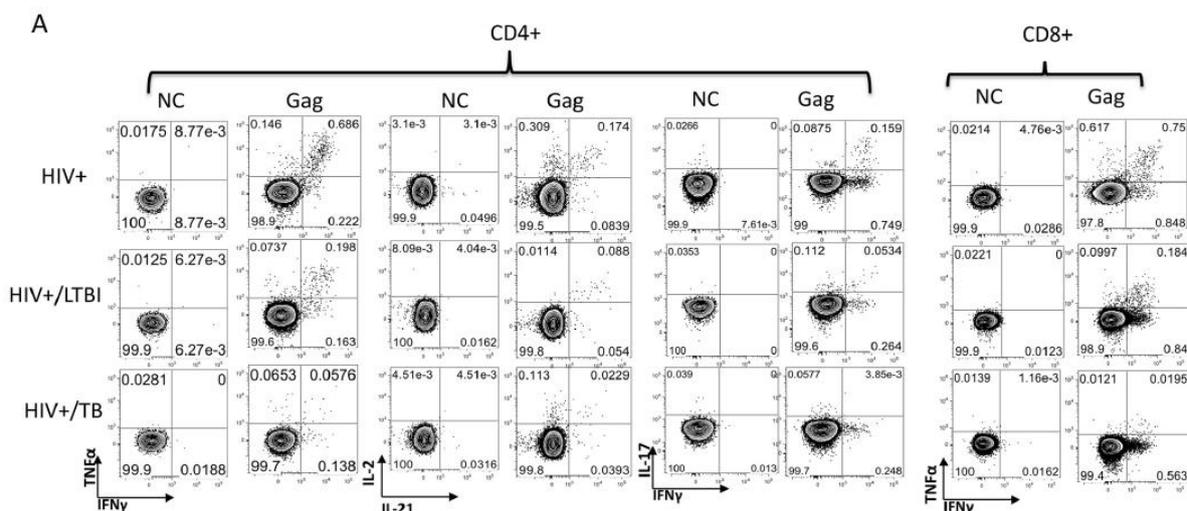


Figura 5.2 - Estratégia de *gate* para a avaliação da polifuncionalidade de células T CD4⁺ T CD8⁺ após estímulo com peptídeos de Gag/HIV. *Dot plots* de densidade tipo *contour* representativos de um indivíduo de cada grupo. NC – sem estímulo, LTBI – Tuberculose latente, TB – Tuberculose ativa.

O primeiro passo foi investigar a funcionalidade das células T HIV-específicas em indivíduos com co-infecção, após estímulo com pool de peptídeos de Gag (proteína do HIV). Eles observaram maior população de células T HIV-específicas nos indivíduos monoinfectados (somente infectados com HIV), o que indica que esses indivíduos possuem melhor resposta imune celular que os co-infectados (Figura 5.2). E a co-infecção de HIV e MTB foi associada com o decréscimo de secreção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Figura 5.3).

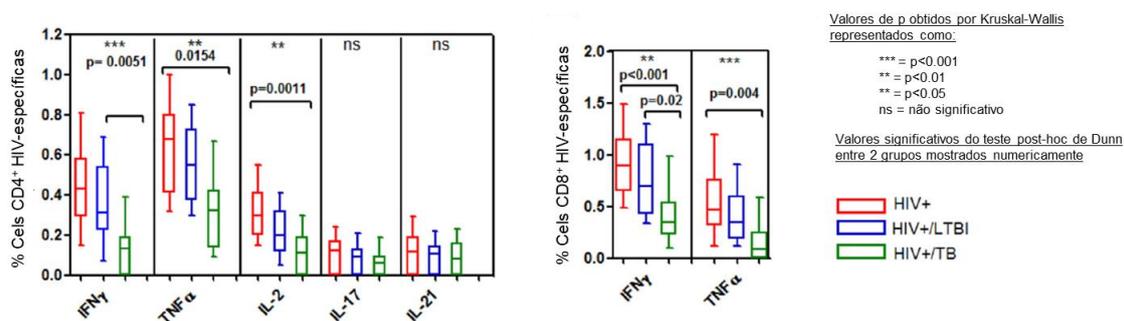


Figura 5.3 - Investigação da secreção de citocinas após estímulo com peptídeos de Gag/HIV. Porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ HIV-específicas secretoras de citocinas em indivíduos monoinfetados (HIV⁺), co-infetados com Tuberculose ativa (HIV⁺/TB) e com Tuberculose latente (HIV⁺/LTBI).

O mesmo experimento foi realizado em seguida, mas estimulando as células com um pool de peptídeos de MTB, para avaliar a funcionalidade das células T MTB-específicas em indivíduos com co-infecção. Foi observado um declínio em funcionalidade em relação às citocinas secretadas nos indivíduos HIV-TB (TB ativa) quando comparados com os HIV-LTBI (TB latente). E na avaliação da resposta não-específica, com estímulo de enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB), não houve diferença significativa entre os grupos, mas parece que as células T CD4⁺ HIV+/TB produzem menos citocinas.

Os autores concluíram que a infecção por MTB está relacionada com a baixa polifuncionalidade das células T CD4⁺ CD8⁺ HIV-específicas, e que como as células T são mais ineficientes na co-infecção de HIV e TB em relação a LTBI, a carga de micobactéria pode estar contribuindo para a perda da função das células T. E também, que o decréscimo da função das células T pode contribuir para o aumento da progressão da doença pelo HIV na co-infecção, já que as células T HIV-específicas funcionalmente ineficientes, podem ser menos capazes de controlar o HIV.

A citometria de fluxo também pode ser aplicada na investigação da resposta imune de possíveis candidatos e regimes vacinais. Freel e cols. (2010) estudaram o perfil fenotípico e funcional de células T CD8⁺ inibitórias do HIV geradas pela infecção natural e vacinação heteróloga de *prime/boost*. Os autores utilizaram um marcador de viabilidade chamado ViViD (*violet viability dye*), e o anti-CD14 (fluoróforo não citado) e CD19-Pacific Blue para identificar células B e monócitos, e excluí-los da análise. Para a maturação de células T, foram utilizados os marcadores CD45RO QD705, CD57 QD585, CCR7 Alexa 680 e CD28 PE-Cy5. E os marcadores de superfície para a identificação de células T; o anti-CD8 QD800, CD4 PE-Cy5.5 e o CD3 APC-Cy7. A

células T funcionais foram identificadas através da sua marcação com IFN- γ FITC, IL-2 APC, TNF- α PE-Cy7, MIP-1 PE e CD107a Alexa 680.

Os indivíduos receberam vacinação *prime* de vacina de DNA contendo Gag, Nef e Pol de HIV (genes do HIV), seguida de um *boost* com adenovírus recombinante tipo 5 (rAd5) carregando Gag, Pol e Env. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram coletadas para as marcações acima, após estímulo com peptídeos de Gag, Nef, Pol e Env. Os autores do estudo agruparam as células T CD8⁺ que responderam aos antígenos de HIV, em cinco categorias: *naïve-like* CD45RO⁻CCR7⁺CD28⁺; memória central CD45RO⁺CCR7⁺CD28⁺; memória transicional CD45RO⁺CCR7⁻CD28⁺; memória efetora CD45RO⁺CCR7⁻CD28⁻ e efetora terminal CD45RO⁻CCR7⁻CD28⁻.

Os resultados da imunofenotipagem foram relacionados com o ensaio de inibição viral por células T CD8⁺ (*VIA assay*). Os indivíduos vacinados e que possuíam atividade antiviral apresentaram um número maior de células em estágios iniciais de diferenciação, e indivíduos HIV⁺ apresentaram maior número de células em estágios finais de diferenciação. Entretanto, não houve associação significativa entre fenótipo de diferenciação e atividade antiviral antígeno-específica de células T CD8⁺. Esses dados sugerem que células T CD8⁺ em diferentes estágios de diferenciação, foram capazes de mediar a supressão viral, contanto que expressassem MIP-1 β ou CD107a (Figura 5.4).

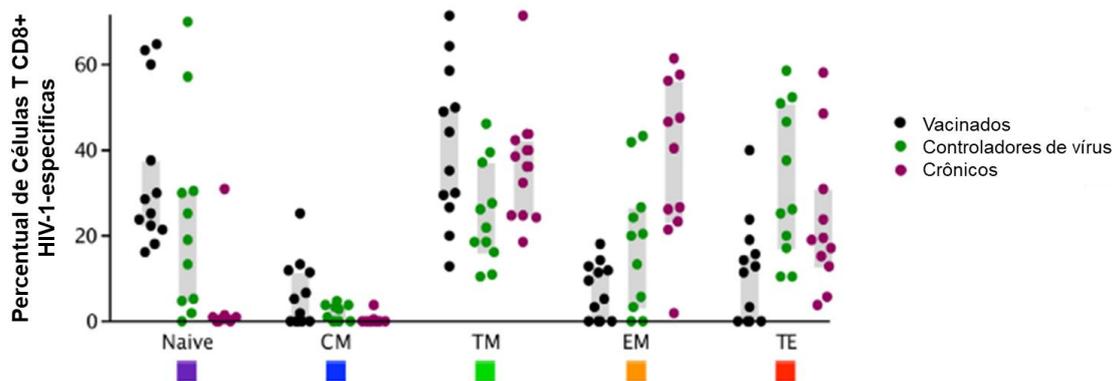


Figura 5.4 - Estado de diferenciação de células T CD8⁺ de indivíduos com atividade antiviral. Células T CD8⁺ de 15 indivíduos controladores de vírus, 15 com infecção crônica de HIV e 20 vacinados com atividade antiviral mediada por células T CD8⁺ foram analisados para a expressão de marcadores de diferenciação CD45RO, CCR7 e CD28. CM – memória central, TM – memória transicional, EM – memória inicial (*naïve-like*), TE – efetora terminal.

Na avaliação da função múltipla de células T CD8⁺ efetoras, de uma forma geral, a resposta foi maior nas células estimuladas com Env e Gag; com a resposta para Env correspondendo 60% da resposta total ao HIV (Figura 5.5). As respostas de CD107a,

MIP-1 β e IFN- γ se correlacionaram com a atividade antiviral. Não foi encontrada diferença significativa na porcentagem de células expressando IL-2 ou TNF- α nos indivíduos vacinados com atividade inibitória em relação aos vacinados sem atividade inibitória. Entretanto, a atividade antiviral foi fortemente associada com o maior número de células T CD8 $^{+}$ expressando CD107a ou MIP-1 β , depois do estímulo com Gag ou Env.

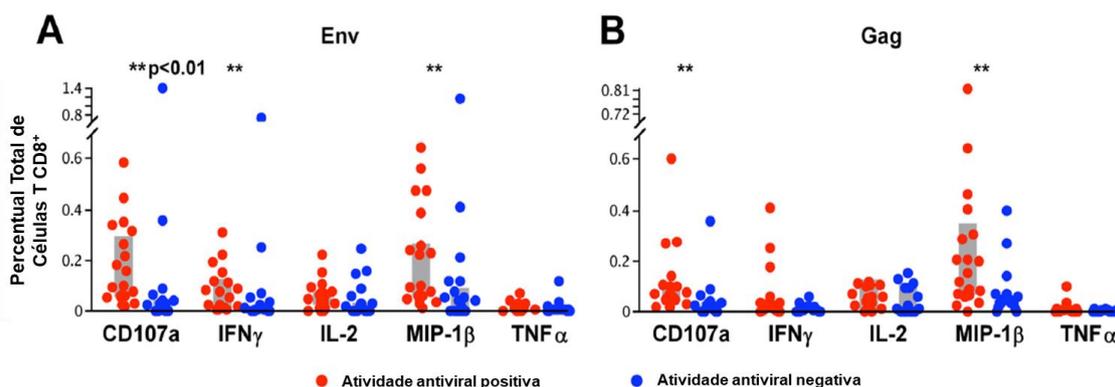


Figura 5.5 - Células T CD8 $^{+}$ Env e Gag-específicas nos vacinados se correlacionam com a inibição do HIV-1 *in vitro*. Expressão de citocinas e marcadores de degranulação foram mensurados por citometria de fluxo em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 40 vacinados. Resposta total de células T CD8 $^{+}$ para cada função é demonstrada após o estímulo com peptídeos de Env (A) e Gag (B). Os asteriscos mostram as funções que apresentaram diferenças significativas entre vacinados com atividade antiviral e sem atividade antiviral.

Os autores concluíram que a expressão de MIP-1 β e CD107a pelas células T CD8 $^{+}$ HIV-específicas, na vacinação ou na infecção natural, está relacionada a atividade antiviral. Em contraste, o fenótipo dessas células parece ser menos importante para essa atividade. Eles também observaram que, em relação a inibição viral, os vacinados podem estimular populações de células T CD8 $^{+}$ semelhantes em função a aquelas encontradas em indivíduos controladores de vírus.

5.2. Covid-19

A Covid-19 é uma infecção respiratória aguda e tem como agente etiológico o SARS-CoV-2 (Coronavírus-2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave), um vírus RNA fita simples da família dos coronavírus. Em dezembro de 2019, os primeiros casos da doença foram registrados em Wuhan, na província de Hubei, China, caracterizados como um surto de pneumonia com etiologia, até então, desconhecida. Rapidamente, o surto tomou proporções epidêmicas e, em março de 2020, foi declarado o *status* de pandemia pela OMS. O SARS-CoV-2 foi isolado em janeiro de 2020 e caracterizado como um novo tipo de coronavírus, e nomeado posteriormente pelo ICTV, em função

da sua semelhança genética entre ao coronavírus responsável pelo surto da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2003.

A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por via horizontal, principalmente pelo contato pessoa-a-pessoa, a partir da inalação gotículas respiratórias expelidas por indivíduos infectados, estejam esses sintomáticos ou não, ou, ainda, pelo contato com superfícies contaminadas. Intervenções preventivas como o distanciamento social, uso de máscaras e higienização correta das mãos foram empregadas a fim de evitar a disseminação do vírus. No entanto, o desenvolvimento de vacinas e a vacinação em massa foi o mecanismo mais efetivo na prevenção à infecção.

As manifestações clínicas da Covid-19 se assemelham às observadas em outras infecções respiratórias, especialmente àquelas causadas por influenza, e incluem febre, tosse e dispneia. Sintomas gastrointestinais, como diarreia, também podem ser observados, embora em menor frequência. Seu espectro clínico é extremamente variável, com ausência de sintomas em até 80% dos casos. As formas graves da doença correspondem a 5% do total de casos, nos quais são observados quadros de insuficiência respiratória, como parte da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), resultando na necessidade de suporte ventilatório. Nesses casos, o indivíduo apresenta inflamação pulmonar intensa, sepse e choque séptico, bem como outras complicações, que juntas podem levar o indivíduo à óbito.

No geral, o período de incubação da Covid-19 compreende 3 a 7 dias, a depender do estado imune do indivíduo infectado. Ao alcançar os pulmões, o SARS-CoV-2 invade, principalmente, as células do epitélio pulmonar e dá início à sua replicação, gerando sintomas respiratórios como consequência. A replicação viral medeia danos e induz uma resposta tecidual local, com recrutamento de células T *helper* e produção de citocinas como interferon(IFN)- γ , interleucina(IL)-2, IL-12. O recrutamento subsequente de células inflamatórias leva ao desenvolvimento da tempestade de citocinas, que pode acarretar em danos e falência de múltiplos órgãos, observado nas formas graves da doença. O processo inflamatório instaurado no parênquima pulmonar estimula as terminações nervosas responsáveis por iniciar o reflexo de tosse. Citocinas como Fator de Necrose Tumoral (TNF) α e IL-1 β aumentam a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão, recrutando ainda mais células do sistema imune. No entanto, esse aumento da permeabilidade vascular ocasiona o vazamento de líquido para o espaço intersticial e alvéolos, resultando em edema. Ainda, os alvéolos podem colapsar, em função da ação dos neutrófilos, que ao fagocitarem partículas virais e outros debris, produzem químicos que resultam no dano

tecidual dos arredores. Tanto o edema, quanto o dano tecidual, podem levar à dispnéia, oxigenação prejudicada ou hipoxemia. Pacientes com hipoxemia geralmente apresentam aumento da frequência cardíaca como resposta aos níveis reduzidos de oxigênio no organismo. Os leucócitos e as células epiteliais danificadas liberam mediadores inflamatórios que resultam em broncoconstrição e febre. A leucopenia e o aumento da proteína C reativa são achados comuns na Covid-19, sendo o último considerado um bom biomarcador para inflamação. Em suma, o dano no tecido pulmonar, o acúmulo de fluidos, a incompatibilidade entre a ventilação e a perfusão e a hipoxemia levam à SRDA, sendo esta considerada a principal causa de óbito na Covid-19.

São diversos os fatores de risco para o desenvolvimento das formas mais graves da Covid-19, sendo descritos como principais: a idade; histórico de doenças crônicas, especialmente as de caráter inflamatório, como diabetes mellitus, doenças cardíacas e hipertensão, e obesidade; e, por fim, casos de imunossupressão.

A citometria de fluxo atua como uma ferramenta de extrema importância na identificação de perfis de resposta imune associados aos diferentes desfechos clínicos observados na Covid-19. Um estudo realizado por Kumari e cols (2023) avaliou o perfil da resposta imune celular de indivíduos infectados, recuperados e vacinados, frente à Covid-19. Foram incluídos 136 participantes, divididos entre os seguintes grupos: indivíduos saudáveis não expostos à Covid-19 e não vacinados (HC) (N=11); indivíduos que se recuperaram da Covid-19 em isolamento domiciliar (HIR) (N=35); indivíduos hospitalizados que tiveram o óbito como desfecho clínico (D) (N=16); indivíduos não-vacinados e hospitalizados com infecção moderada, que tiveram recuperação como desfecho clínico (HP) (N=12); indivíduos vacinados (V) (N=46), com amostras coletadas em dois momentos (V1 e V2); indivíduos infectados e vacinados (inf + vac) (N=16). Todos os participantes tiveram amostras de sangue coletadas em momentos aleatórios, e aqueles hospitalizados tiveram sua coleta realizada no momento da internação (D0) e em mais dois momentos até a alta ou óbito (D7 e D14). As CMSP foram obtidas por centrifugação por gradiente de densidade, e incubadas com anticorpos específicos para as moléculas de interesse imediatamente.

As células imunes obtidas foram caracterizadas e suas subpopulações foram identificadas por citometria de fluxo. Ao avaliarem a frequência de linfócitos T e B circulantes (figura 5.6), os autores observaram redução (20 e 50%, respectivamente) durante os estágios iniciais da infecção em indivíduos hospitalizados com sintomas moderados de Covid-19. Ainda, ao avaliarem as amostras coletadas ao longo do curso

da infecção, observaram redução na frequência de linfócitos T e B em indivíduos que foram à óbito, frente àqueles hospitalizados por doença moderada. Adicionalmente, a expressão desses tipos celulares foi menor em ambos os grupos, indivíduos que foram à óbito e hospitalizados com covid-19 moderada, frente aos indivíduos recuperados em isolamento domiciliar. Em ambos os grupos hospitalizados foi descrita alguma comorbidade, 75% nos indivíduos que foram à óbito e 83% naqueles com doença moderada, incluindo diabetes mellitus tipo II, hipertensão, asma brônquica, doença arterial coronariana e hipotireoidismo; em consonância aos resultados observados para as células T e B, os autores sugerem que as comorbidades impactem no envolvimento da resposta imune celular naqueles indivíduos com manifestações mais graves da doença.

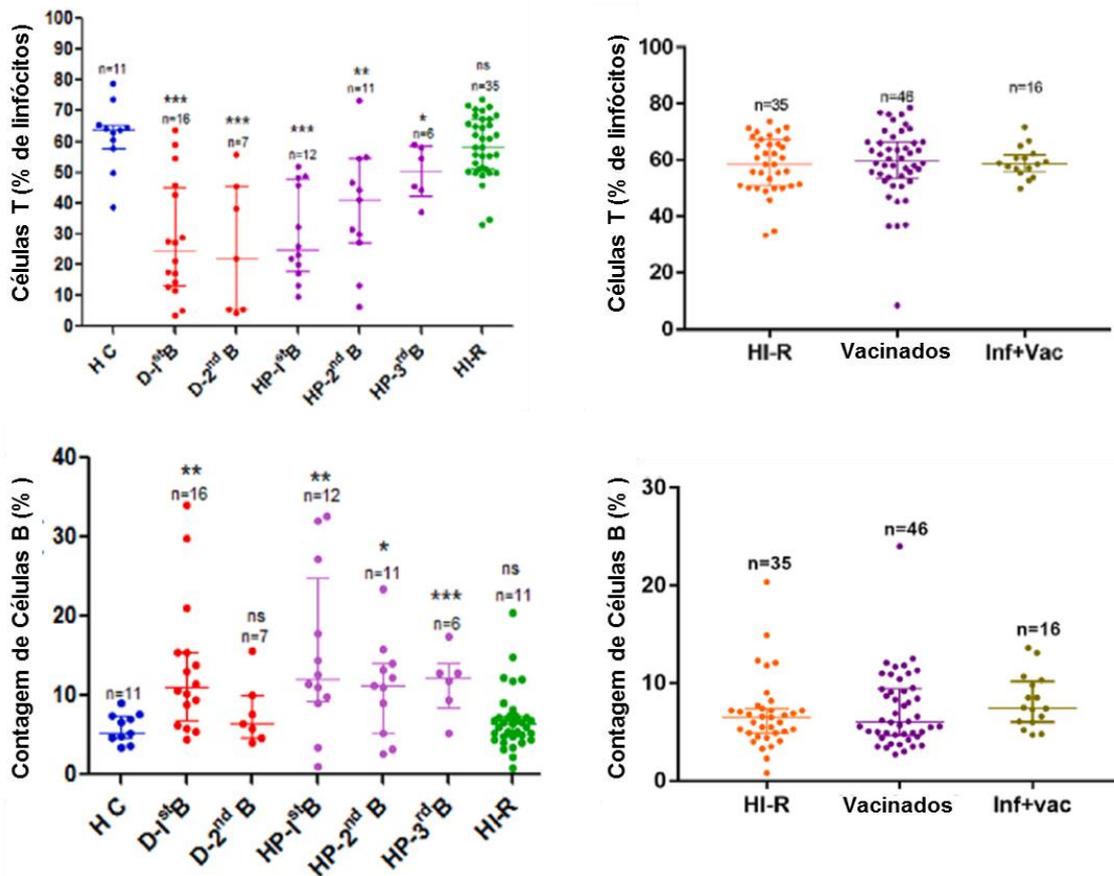


Figura 5.6 – Resposta de células T (gráficos superiores) e B (gráficos inferiores) nas coortes incluídas no estudo. Os gráficos da esquerda representam a comparação da expressão de células imunes entre os grupos D e HP frente HC e HI-R; os gráficos da direita representam a comparação entre os grupos HI-R, V e Inf+Vac. O valor de p representado no gráfico foi calculado em relação ao grupo HC; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Duas das principais subpopulações de linfócitos T, as células T CD4⁺ e T CD8⁺, foram consideradas pelos autores nas análises do estudo, uma vez que são componentes importantes no estabelecimento de resposta imune adequada frente infecções virais. As células T CD4⁺ auxiliares (*helper*) atuam na interação com células B, auxiliam células T CD8⁺, recrutam células imunes inatas e promovem reparo tecidual. As células T CD8⁺ (citotóxicas), por sua vez, são capazes de destruir células infectadas por vírus através da ação de perforinas e granzimas, que levam à apoptose da célula-alvo. Durante a covid-19, Kumari e cols. (2023) observaram alterações em ambas as subpopulações entre os indivíduos que foram à óbito frente àqueles hospitalizados por Covid-19 grave (figura 5.7).

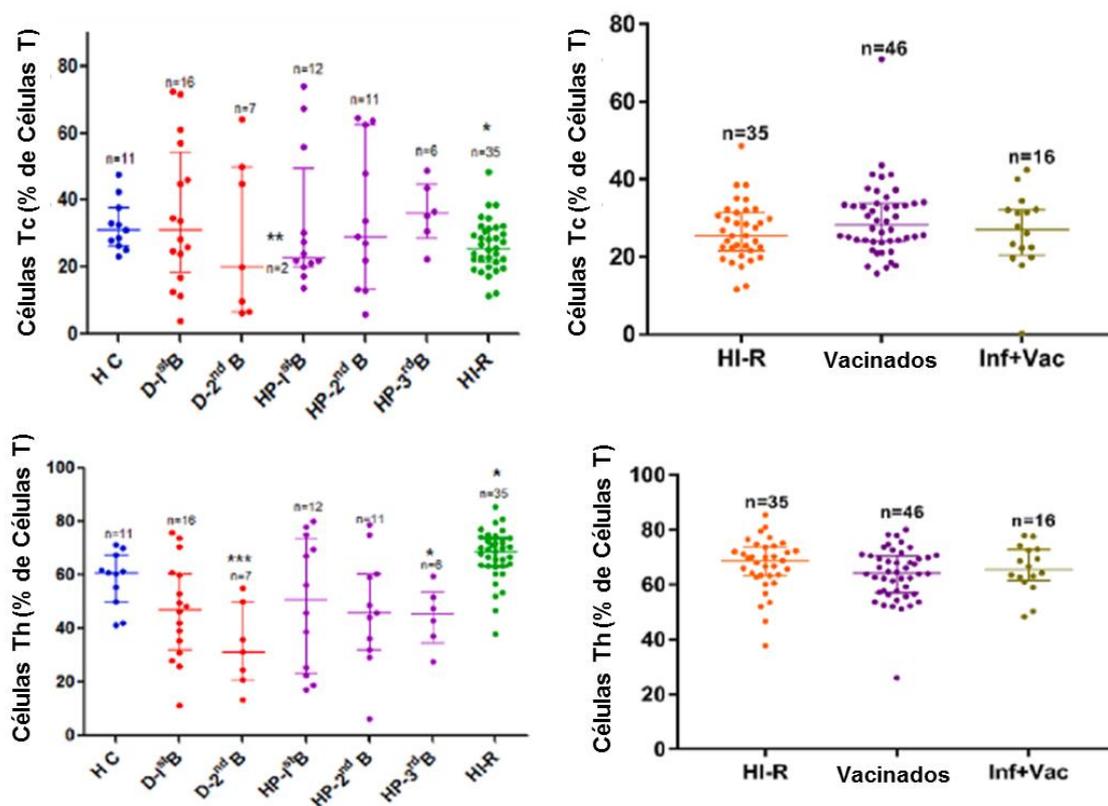


Figura 5.7 – Resposta de células T citotóxicas (gráficos superiores) e *helper* (gráficos inferiores) nas coortes incluídas no estudo. Os gráficos da esquerda representam a comparação da expressão de células imunes entre os grupos D e HP frente HC e HIR; os gráficos da direita representam a comparação entre os grupos HI-R, V e Inf+Vac. O valor de *p* representado no gráfico foi calculado em relação ao grupo HC; **p* < 0,05; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001, *****p* < 0,0001.

As células T_H17 possuem papel importante na inflamação e na resposta antiviral, como a observada na covid-19, portanto, os autores também consideraram sua avaliação. Como resultado, elevada expressão de células T_H17 circulantes foi observada em indivíduos que foram à óbito e naqueles hospitalizados por sintomas

moderados de Covid-19, corroborando com a inflamação exacerbada e patogênese observada nos casos mais graves da doença.

Por fim, os autores concluíram que indivíduos com histórico de comorbidade estão mais suscetíveis às formas moderadas e graves de Covid-19. Adicionalmente, indivíduos que apresentam quadros mais graves, que resultam em óbito, apresentam resposta imune celular comprometida, que não se recupera ao longo do curso da infecção, diferente dos indivíduos com quadros moderados.

Estudos que caracterizam o perfil celular ao longo do curso de infecções são fundamentais na compreensão de sua patogênese, além de atuarem como preditores para escolha de terapia adequada, reduzindo a mortalidade e melhorando o prognóstico da doença.

5.3. Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afetou 140.594 pessoas ao redor do mundo em 2022. O agente infeccioso, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), é capaz de infectar células de Schwann, macrófagos, células do endotélio vascular e epiteliais. Além disso, esse patógeno é extremamente difícil de ser estudado, de forma isolada, pois fatores como o seu longo período de incubação/crescimento, associado a não divisão em meio de cultura, torna um grande desafio a compreensão de sua fisiologia e dos mecanismos envolvidos na infecção e no curso da doença. Mesmo assim, sabemos que o *M. leprae* é capaz de provocar danos nos nervos periféricos, promovendo o aparecimento de lesões de pele com diminuição de sensibilidade, além de desencadarem alterações físicas incapacitantes, irreversíveis e muitas vezes sistêmicas.

De modo geral, a infecção é iniciada após a aderência do *M. leprae* em células da mucosa, das vias aéreas superiores, em indivíduos geneticamente susceptíveis. Após o desenvolvimento da doença, os pacientes podem apresentar diferentes formas clínicas, de acordo com o número de lesões. Assim, pacientes paucibacilares (PB) são aqueles com até cinco lesões espalhadas pelo corpo e os multibacilares (MB) possuem mais de cinco lesões. Esses critérios foram estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e seguidos pelo Ministério da Saúde (MS) para auxiliar na detecção dos casos e no manejo terapêutico. Desse modo, os indivíduos PB são tratados por seis meses e os MB por doze meses, seguindo os medicamentos indicados pela poliquimioterapia, ou seja, a rifampicina, clofazimina e dapsona, com doses diferentes de acordo com as características do paciente.

Para fins de pesquisa científica, Ridley & Jopling desenvolveram uma classificação baseada nas características histopatológicas e imunológicas observadas entre os pacientes. Dessa maneira, os indivíduos PB foram divididos na forma tuberculóide (TT) e *borderline tuberculóide* (BT) essas formas clínicas apresentam resposta imune celular, com a presença de células T *helper* 1 (T_H1), T_H17 , macrófagos com o perfil M1 que fomentam o baixo número de bacilos nas lesões de pele. Em contrapartida, os pacientes MB são divididos em *borderline borderline* (BB), *borderline lepromatoso* (BL) e lepromatoso (LL), esses apresentam resposta imune humoral, com produção de anticorpos, células T_H2 , T reguladoras (T_{reg}), macrófagos M2, gerando um perfil imunológico suprimido, provocando aumento da multiplicação bacilar e consequentemente no número de lesões.

Além disso, cerca de 50% dos pacientes com hanseníase podem desenvolver os episódios reacionais, que são originados a partir da agudização da resposta inflamatória no curso da infecção crônica. Essas reações podem ocorrer em qualquer momento da infecção, inclusive após o tratamento, e infelizmente provocam incapacidades físicas, surgimento de novas lesões ou ativação das preexistentes. Esse quadro clínico é dividido em dois tipos, a reação tipo 1 (T1R) ou reação reversa (RR) e tipo 2 (T2R) ou eritema nodoso leproso (ENL). A T1R pode acometer o paciente de qualquer forma clínica e provoca dano neural severo. Já a T2R, acomete exclusivamente os pacientes dentro do espectro multibacilar e desencadeia alterações sistêmicas como febre, lesões oculares e de pele, levando o paciente muitas vezes à internação e ao óbito.

Diversos grupos de pesquisa buscam entender os mecanismos envolvidos na gênese/manutenção dos episódios reacionais, além dos fatores que diferenciam os dois quadros clínicos. O maior entendimento do perfil celular envolvido nos processos reacionais é crucial, visto que até o momento, não há um biomarcador preditivo para ser correlacionado com a abertura dos episódios. Desta forma, diversos trabalhos caracterizam fenotípica e funcionalmente as células imunológicas e as suas subpopulações, provenientes do sangue periférico, visando encontrar um marcador preditivo, reduzindo o sofrimento do paciente.

Os linfócitos T reguladores são um grupo de células associadas à supressão de respostas exacerbadas no contexto de diversas doenças autoimunes e infecciosas. Para elucidar a participação destas células na gênese dos episódios reacionais, foram avaliados os linfócitos $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (Treg $CD4^+$) e $CD3^+CD8^+CD25^+FOXP3^+$ (Treg $CD8^+$) (Figura 5.8) do sangue periférico de pacientes

BL e LL recém diagnosticados e ainda não tratados, e pacientes BL na RT1 e LL na RT2, antes do início do tratamento específico. A metodologia experimental foi executada a partir da separação das células mononucleares de sangue periférico, por meio do gradiente de Ficoll-hypaque, seguida da incubação com anticorpos monoclonais, conjugados a fluoróforos específicos (com especificidade para as moléculas citadas anteriormente) e posteriormente os eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo.

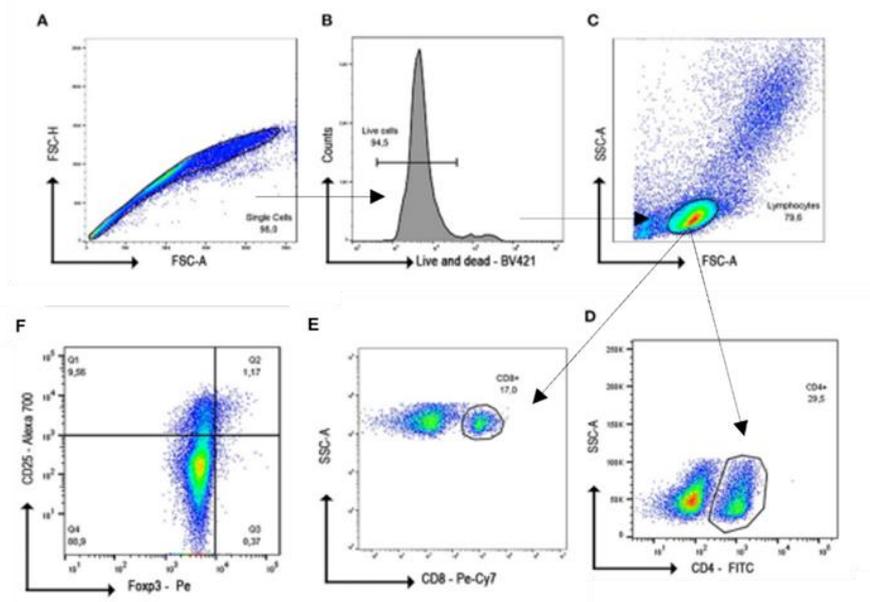


Figura 5.8. Estratégia de análise. Para a exclusão de *doublets* foi realizado um *dot plot* FSC-A vs FSC-H (A) e em seguida as células viáveis foram determinadas por meio da análise de um parâmetro único (histograma) (B). Posteriormente, a região de linfócitos foi determinada no *dot plot* SSC-A vs FSC-A (C), e dentro dessa população foram definidas as subpopulações CD4⁺ (D) e CD8⁺ (E), para posterior seleção de das células CD25⁺FOXP3⁺ (F). Castro KKG et al., 2022.

As análises dos resultados revelaram que as Treg CD4⁺ (Figura 5.9A) sofreram diminuição significativa durante os dois episódios reacionais, em comparação com as formas não reacionais. Já a população Treg CD8⁺ apenas é suprimida durante a T1R nos pacientes BL (Figura 5.9B).

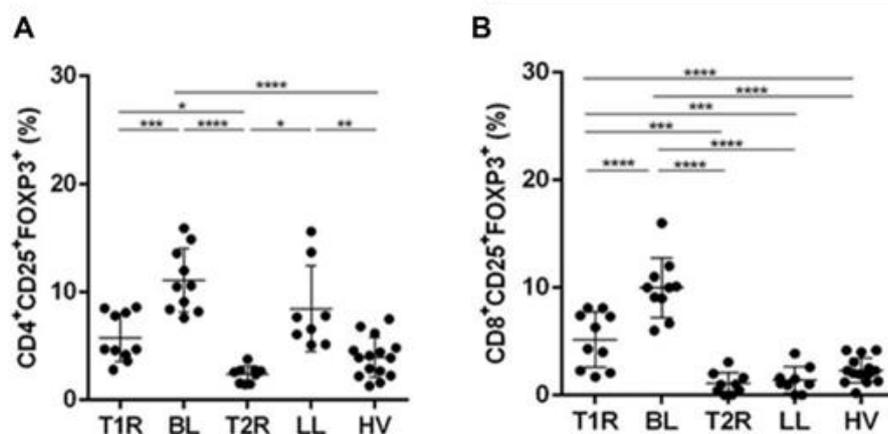


Figura 5.9 - Frequência dos linfócitos T reguladores. Representação gráfica das células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (A) e CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺ (B) em diferentes formas clínicas da hanseníase. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 e ****p ≤ 0,0001. HV, voluntários sadios. Castro KKG et al., 2022.

Durante esse estudo também foi avaliada a capacidade funcional desses linfócitos para a síntese de IL-10 e TGF-β. Para isso, durante o preparo das amostras, foi realizada a incubação das células com um inibidor de transporte de proteínas, responsável por paralisar a ação do complexo de golgi. Esse processo permite o acúmulo das proteínas a serem mensuradas por citometria de fluxo. Além disso, é fundamental tornar a membrana da célula permeável aos anticorpos que irão acessar o núcleo e o citoplasma da célula.

Os resultados revelaram que não foi observada diferença significativa entre as Treg CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-10 no sangue periférico durante a gênese dos episódios reacionais. Entretanto, foi identificado que a T2R apresenta um baixo número de células produtoras de IL-10 em relação a T1R, demonstrando que o gatilho que afeta esses pacientes é diferente (Figura 5.10B e C). Já a avaliação das Treg produtoras de TGF-β revelou que a queda dessa população celular está relacionada à gênese de ambos os processos reacionais. Ainda foi possível identificar que na T1R a queda de Treg CD8⁺TGF-β⁺ foi (Figura 5.10E) mais acentuada que na T2R e o contrário foi observado nas Treg CD4⁺TGF-β⁺ (Figura 5.10F). Esses dados sugerem que a diminuição das células Treg está relacionada com a abertura de ambos os episódios reacionais.

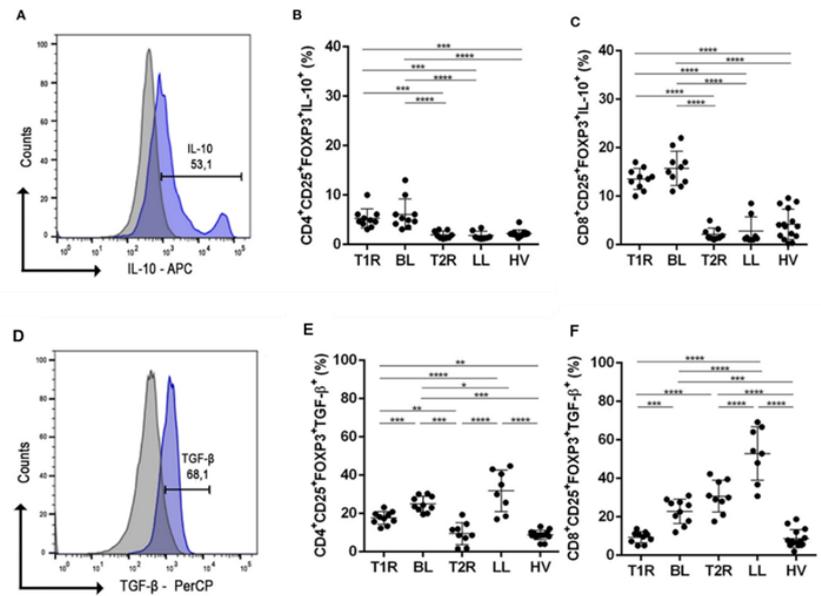


Figura 5.10: Linfócitos T reguladores produtores de citocinas. Histograma de uma análise representando a estratégia, utilizada para células produtoras de IL-10 (A) e TGF-β (D); Treg CD4⁺ produtora de IL-10 (B) e TGF-β (E); Treg CD8⁺ produtora de IL-10 (C) e TGF-β (F). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001 e ****p ≤ 0,0001. T1R, Reação Tipo 1; BL, paciente com a forma *borderline lepromatosa*; T2R, Reação Tipo 2; LL, paciente com a forma lepromatosa; HV, voluntários saudáveis. Castro KKG et al., 2022.

Outros trabalhos buscaram entender o balanço dos linfócitos de memória CD4⁺ e CD8⁺ produtores de citocinas durante a abertura dos episódios reacionais. Para isso, foram selecionados indivíduos logo após o diagnóstico das formas clínicas BL e LL, além de pacientes LL na gênese de RT1 e LL durante a T2R. Desse modo, amostras de sangue periférico também foram processadas incubadas com os respectivos anticorpos para a identificação do perfil de memória e da produção de citocinas. Existem várias formas de definir as subpopulações de memória ou o perfil de ativação celular. Neste estudo, utilizaram a expressão de CCR7 e CD45RA como base. Assim, células CCR7⁺CD45RA^{neg} são as de memória central (Tcm), CCR7^{neg}CD45RA⁺ célula efetora (Tef), CCR7⁺CD45RA⁺ células *naïve* e CCR7^{neg}CD45^{neg} células de memória efetora (Tem) (Figura 5.11). As Tcm possuem alta afinidade com os tecidos linfoides e rapidamente são capazes de ativação, as Tem permanecem em tecidos não linfoides e apresentam elevada ação citotóxica. As células efetoras estão presentes na fase aguda

da estimulação antigênica e as *naïve* ainda não foram ativadas.

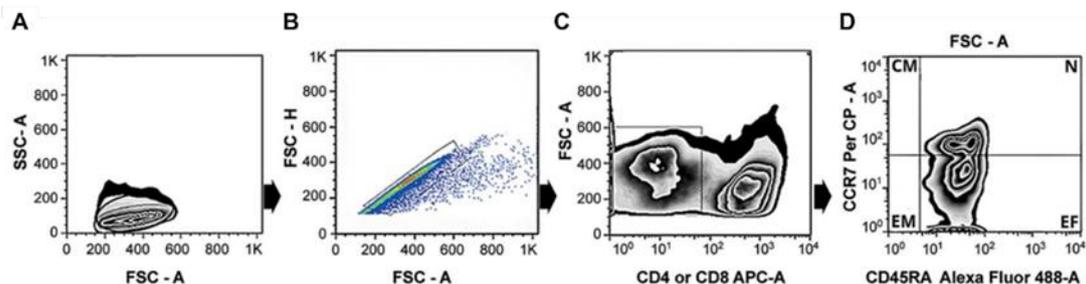


Figura 5.11. Estratégia de análise para a definição das subpopulações de memória CD4⁺ e CD8⁺. Inicialmente foi definida a região de linfócitos a partir do *dot plot* SSC-A vs FSC-A em cout(A) seguidamente pela exclusão de *doublets* FSC-H vs FSC-A (B). Posteriormente foi selecionada a região CD4⁺ ou CD8⁺ (FSC-A vs APC) e por fim, utilizando o *dot plot* para CCR7 e CD45RA foram estabelecidas as diferentes populações de memória. Dos Santos LN, et al., 2016.

Inicialmente, avaliaram o perfil dessas células no chamado tempo zero (T0), ou seja, sem a utilização de qualquer estímulo externo. De acordo com resultados, os linfócitos T CD4⁺ Tem e Tef estavam significativamente mais frequentes nos pacientes em T1R em relação aos BL (Figura 5.12A), esse perfil também foi observado entre os mesmos pacientes em relação às células CD8⁺ Tef (Figura 5.12B). Também foi identificado que os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, dos pacientes T1R, apresentaram maior capacidade migratória que os BL e os indivíduos sadios. Essa conclusão foi obtida após a análise de CLA (*Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*), realizada por citometria de fluxo (Figura 5.12C).

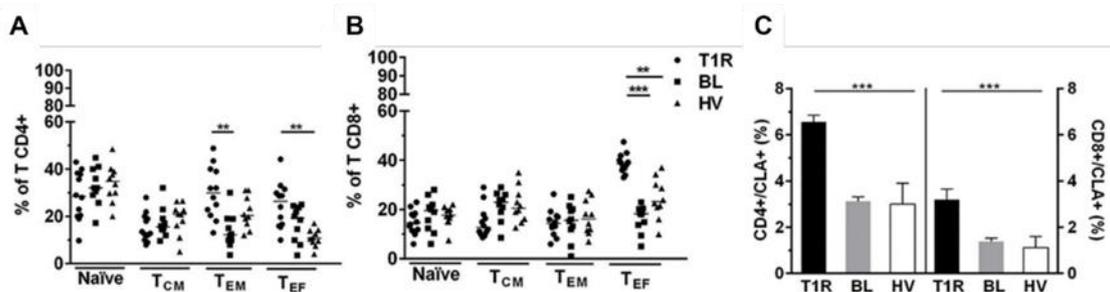


Figura 5.12 - População de memória e migração celular. Avaliação das células CD4⁺ (A) e CD8⁺ com o perfil de memória e o tipo atividade celular, bem como a identificação da capacidade migratória das populações (C). Os níveis de significância são apresentados pelos gráficos, sendo **p<0,01 e ***p<0,001. Dos Santos LN, et al., 2016.

Continuando os experimentos os pesquisadores, estimularam as células durante 6h com *Mycobacterium leprae* irradiado e sonicado para identificar a resposta específica ao antígeno em comparação com a enteroxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) que atua como controle positivo. E observaram que o estímulo específico provocou aumento na frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ TEF produtoras de IFN- γ nos T1R (Figura 5.13A e B), já nos BL ocorreu o aumento células CD4⁺ TEF IL-10⁺ (Figura 5.13C).

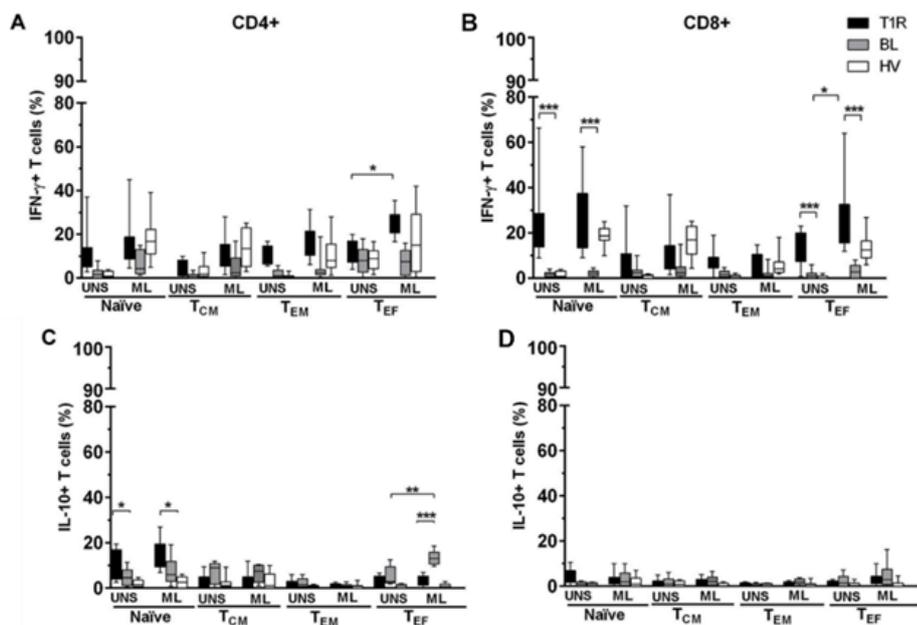


Figura 5.13 - Células produtoras de citocinas. Subpopulações de linfócitos CD4⁺ (A) e CD8⁺ produtores de IFN e IL-10 (C e D), respectivamente. Dos Santos LN, et al., 2016.

Para a avaliação dos pacientes na T2R foi utilizado o mesmo protocolo de obtenção das células mononucleares, estímulos e estratégia de análise (Figura 5.11). A análise dos resultados revelou que após estímulo específico com o *M. leprae* os pacientes reacionais apresentavam maior frequência de linfócitos CD8⁺ Tem e Tef produtores de TNF em comparação aos LL. E curiosamente, esses mesmos pacientes apresentaram modulação positiva em relação ao número de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ *naïve* e Tcm IL-10⁺ (Figura 5.14). Demonstrando que a dinâmica observada na abertura varia de acordo com o tipo de reação.

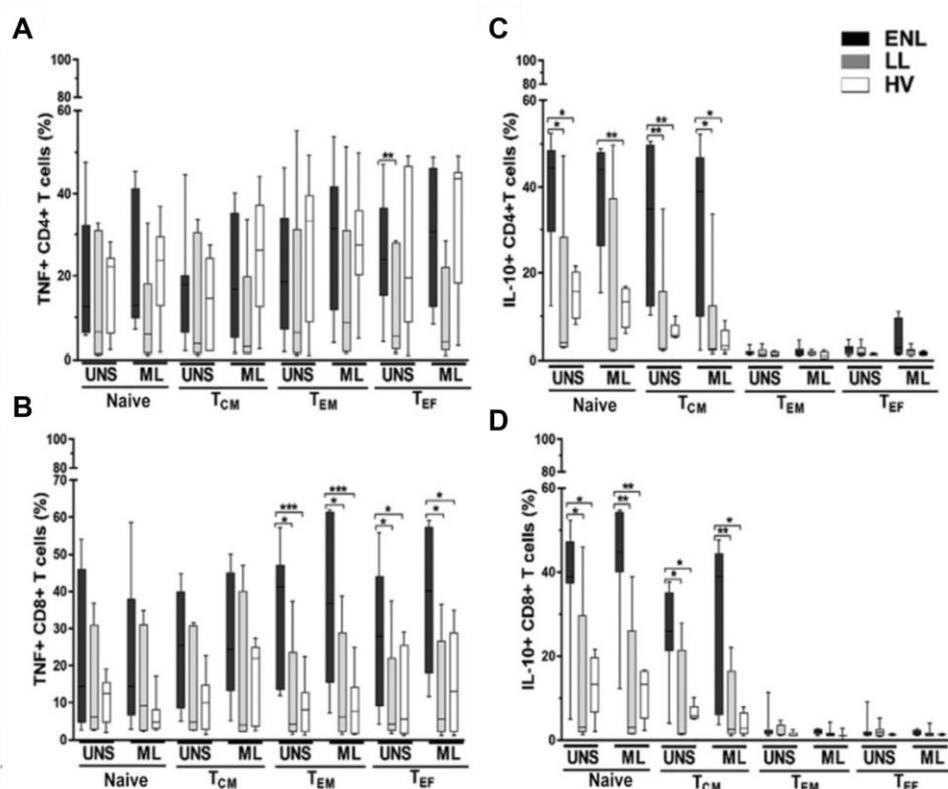


Figura 5.14 - Células produtoras de citocinas. Linfócitos T CD4⁺ (A, C) e CD8⁺ (B, D) produtores de TNF e IL-10, respectivamente. *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001. UNS, não estimulado; ML, *Mycobacterium leprae* irradiado e sonicado; LL Da Silva PHL et al., 2019.

5.4. Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada uma doença infecto-parasitária, de caráter zoonótico, sendo causada pelo protozoário do gênero *Leishmania spp*, e transmitida pelo inseto vetor, o flebotomíneo. O protozoário *Leishmania spp*. apresenta o ciclo 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 T_H1, com ativação das células efetoras, como macrófagos, que são ativados por citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), levando a produção de intermediários reativos de oxigênio (IROs) e intermediários reativos de nitrogênio (IRNs), para a destruição do parasito. Os macrófagos, assim como as células dendríticas, são células que fazem

parte do sistema fagocítico, onde o parasita consegue se multiplicar ativamente no pH ácido do interior do fagolissosomo. 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 o porquê que 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.

As células T CD4⁺ são cruciais para o controle da carga parasitária, no entanto, após a infecção, essas células migram para os sítios de lesões cutâneas, nos quais ativam os macrófagos através da produção de IFN- γ . Em contrapartida, estudos relacionados a microscopia de imagem intravital, demonstraram que as células T CD4⁺, não estão difundidas uniformemente nas lesões cutâneas, e que as células T não interagem com todas as células infectadas.

Neste sentido, através da citometria multiparamétrica e utilizando marcadores de superfície e intracelular específicos, foi possível avaliar a diferenciação heterogênea das células T CD4⁺T_H1, que dependendo do tipo e da intensidade do estímulo, podem gerar fenótipos de produção de citocinas que as classificam como células de memória central (IL-2⁺ouTNF- α ⁺), memória efetora (IFN- γ ⁺IL-2⁺eTNF- α ⁺ simultaneamente) ou células efetoras terminais (IFN- γ ⁺), que possuem um tempo de vida muito curto (Figura 5.15).

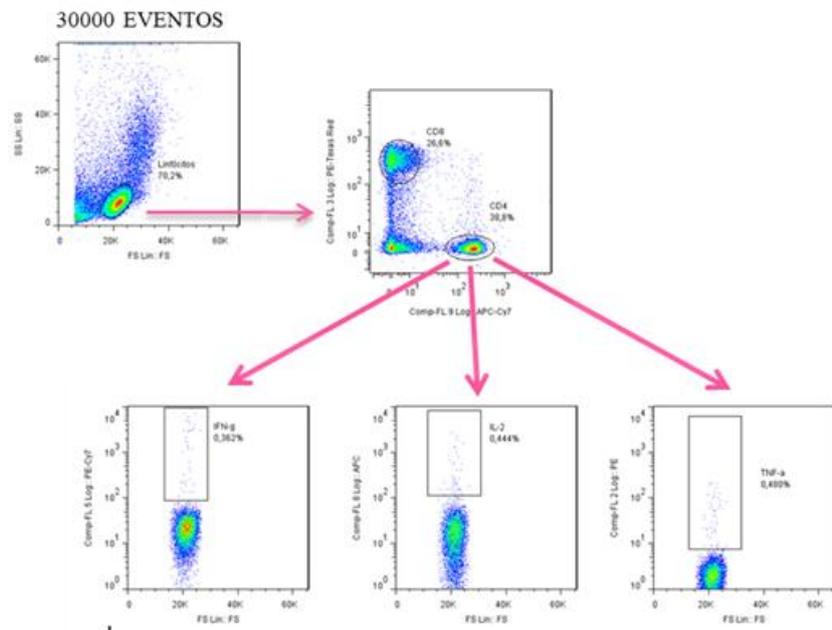


Figura 5. 15 - Protocolo de estratégia de *gates* de população de linfócitos T CD4⁺ e de células produtoras de citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α . Fonte: Esquematizado e cedido por Macedo, Renzetti & De Luca, 2014.

Em células de pacientes com leishmaniose cutânea, que foram estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, foi encontrado diferenças significativas do perfil de linfócitos T CD4⁺ e sua produção de citocinas (Figura 5.16). Com relação a qualidade da resposta de T_H1, observou-se maiores porcentagens de células T CD4⁺ multifuncionais (IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ simultaneamente) e células duplas positivas (IFN- γ ⁺ e IL-2⁺) em células de pacientes com leishmaniose cutânea estimulados com o antígeno de *L. braziliensis* quando comparados com o antígeno de *L. amazonensis*, que induziu maiores porcentagens de células simples produtoras de IFN- γ (Figura 5.17). Isso indica que esse tipo celular pode estar relacionado com formas de manifestações clínicas de pacientes com Leishmanioses.

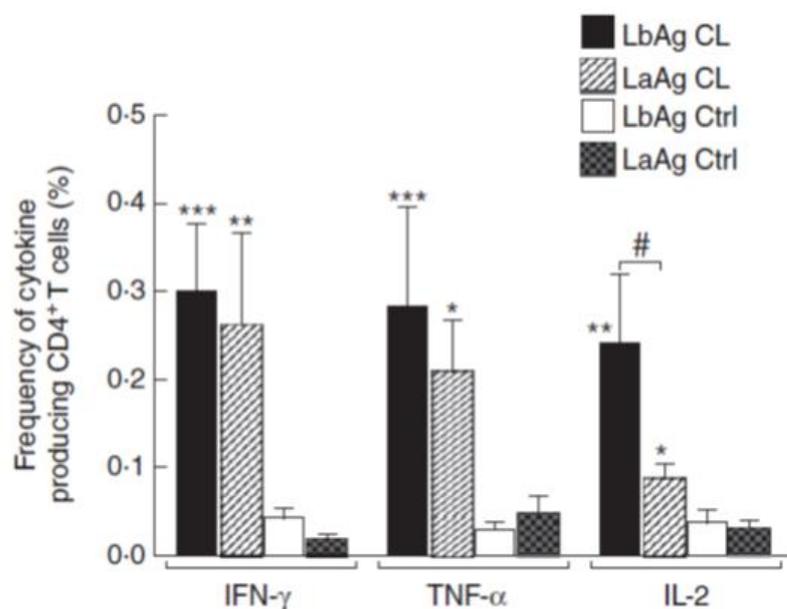


Figura 5.16 - Frequência de produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-2) por células T CD4⁺ após a estimulação com antígenos de *L. braziliensis* (LbAg) e *L. amazonensis* (LaAg) de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea (CL) e controles saudáveis (Ctrl). Fonte: Macedo et al., 2012.

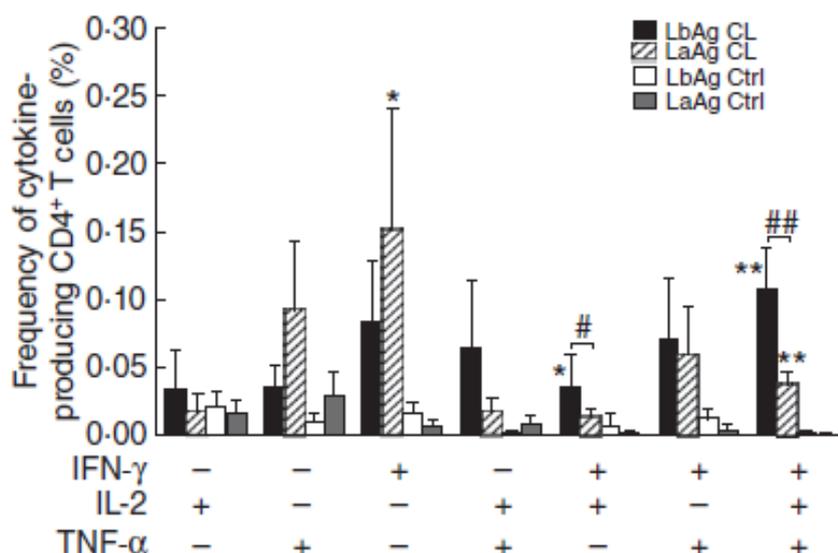


Figura 5.17 - Diferença na qualidade da resposta de células T CD4⁺ do tipo 1 (T_H1) após a estimulação com antígenos de *L. braziliensis* (LbAg) e *L. amazonensis* (LaAg) de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea (CL) e controles saudáveis (Ctrl). Foi utilizado a citometria de fluxo multiparamétrica para identificar a frequência de células apresentando cada uma das sete combinações de IFN- γ , TNF- α e IL-2. Fonte: Macedo et al., 2012.

Os linfócitos T CD8⁺ participam ativamente na resposta imune na leishmaniose, com função de citotoxicidade e produção de citocinas, principalmente pró-inflamatórias, sendo associados à cura da doença, principalmente em estudos de infecção por *L. 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 5.18), que pacientes sob a terapia apresentam maiores percentuais de apoptose dos linfócitos T CD8⁺ totais e efetoras, o que foi também observado após cultura de estimulação com antígeno de *L. braziliensis*. Também mostraram que quanto maior o tamanho da lesão, menor a frequência de linfócitos T CD8⁺ efetoras nos pacientes com doença ativa e sob tratamento; bem como uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ efetoras em apoptose e o tamanho da lesão nos pacientes durante o tratamento (Figura 5.19). Deste modo, as alterações nas frequências dos linfócitos T CD8⁺ efetoras, 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.

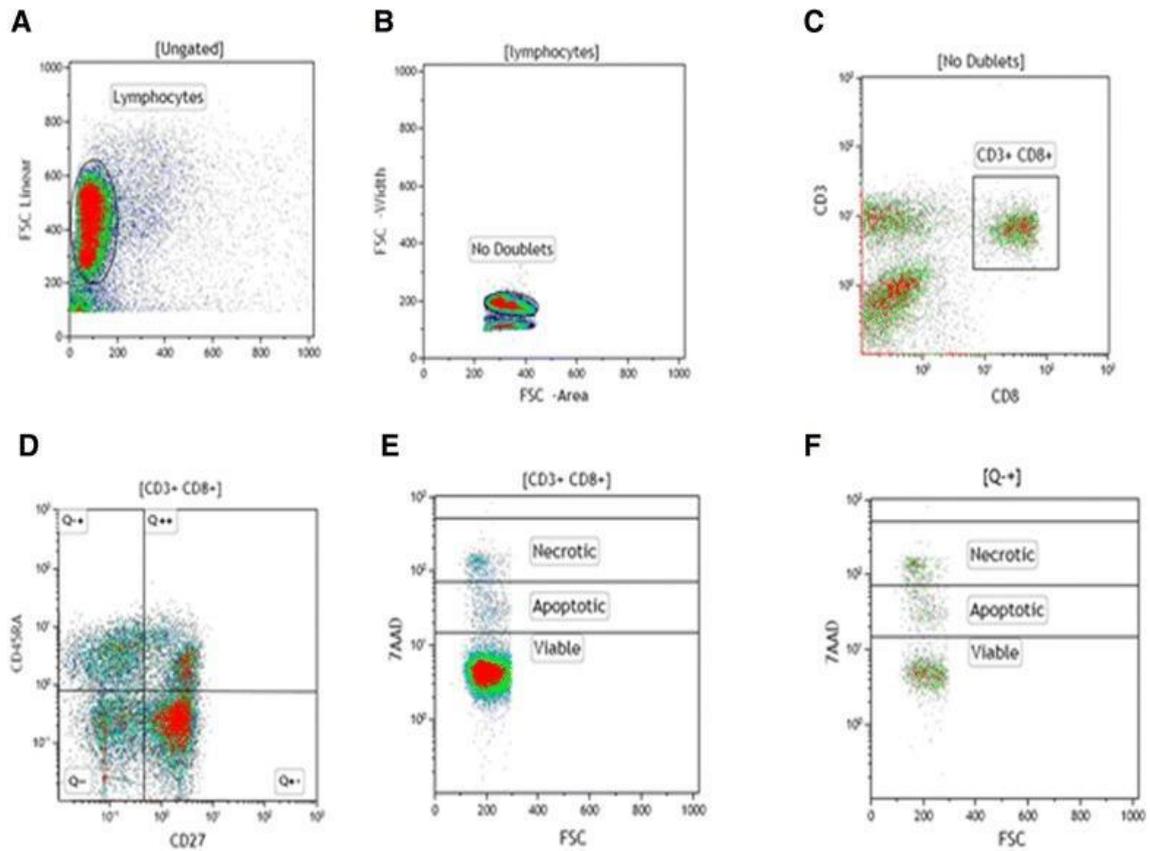


Figura 5.18 - Protocolo de citometria de fluxo para determinar as frequências de subpopulações de linfócitos T CD8⁺ e apoptose. Células do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea foram marcadas *ex vivo* e após serem cultivadas na presença de antígenos de *Leishmania*, com CD3-FITC, CD8-APC, 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 *gate* CD3⁺CD8⁺ (C) e usado para definir as frequências de linfócitos T CD8⁺ efetores e *naïve*. A frequência de células apoptóticas (7AAD^{low}) 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. Fonte: Ferraz et al., 2015.

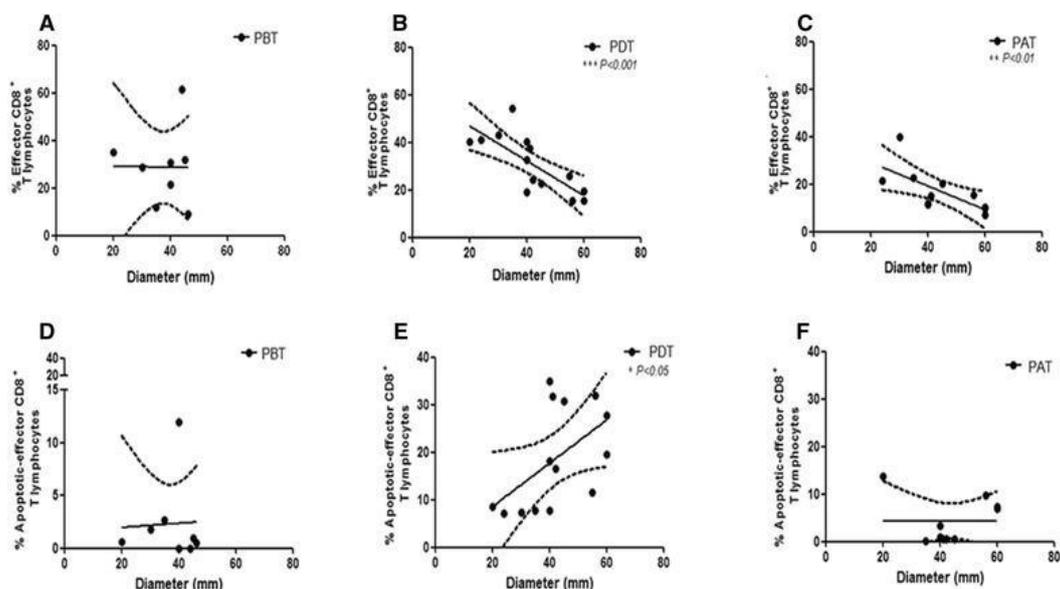


Figura 5.19 - Correlação entre o percentual de linfócitos T CD8⁺ totais (A, B, C) e linfócitos T CD8⁺ apoptóticos (D, E, F) com o diâmetro das lesões (mm). (A, D) PBT – pacientes antes do tratamento; (B, E) PDT – pacientes durante o tratamento; (C, F) PAT – pacientes após o tratamento. Análises estatísticas foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman. Resultados foram considerados significantes com $P < 0.05$. Fonte: Ferraz et al., 2015.

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 5.20).

O papel protetor dos linfócitos T CD8⁺ foi também demonstrado em relação à sua atividade citotóxica em infecções por *L. amazonensis* e *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. mexicana*, quando comparados com pacientes de LC.

Em outro estudo de Ferraz e cols. (2017), foi avaliado por citometria de fluxo diferentes populações de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ de lesões de pacientes com leishmaniose cutânea: linfócitos T duplos negativos (CD4^{neg}CD8^{neg}), linfócitos T duplos positivos (CD4⁺CD8⁺), células NK e células NKT expressando o marcador CD107a, que está associado com a citotoxicidade celular. Foi observado que a população de células NKT foi a segunda população de células que estão vinculadas na citotoxicidade nos macerados de lesões dos pacientes, enquanto, os linfócitos T duplos negativos (CD4⁻CD8⁻) citotóxicos, representam mais de 40% do total da subpopulação citotóxica, sendo ainda dez vezes maior do que as células T CD8⁺. Por outro lado, foi identificado um percentual elevado de células CD4⁺CD107a⁺ quando comparado às células citotóxicas T CD8⁺ e NK. Dessa forma, o estudo sugere que as células T CD4⁺ podem colaborar no controle da carga parasitária por meio de mecanismos de resposta à citotoxicidade nas lesões, além disso, o dano tecidual das lesões pode estar associado com o perfil de células NKT, os linfócitos T duplos negativos (CD4⁻CD8⁻) e as células T CD4⁺.

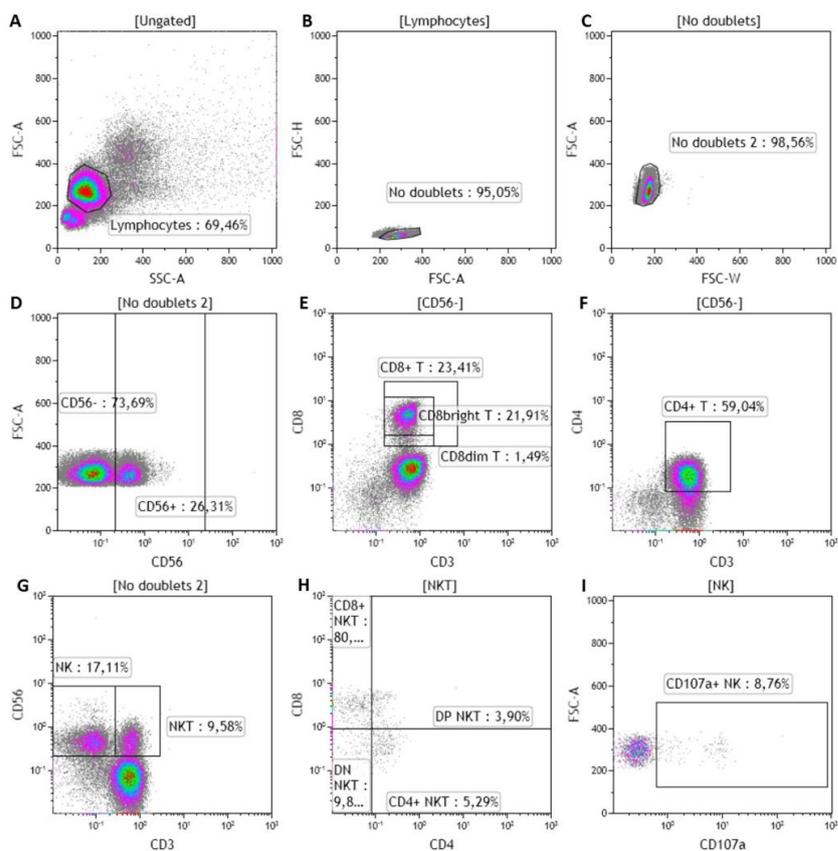


Figura 5.20 - Protocolo de citometria de fluxo para determinar as frequências de subpopulações de linfócitos T CD3⁺, células NK e NKT citotóxicas. Células do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 e anti-CD107a. (A) Os linfócitos 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) e CD4 vs CD3 (F) *dot plots*, baseados no *gate* CD56^{neg} criado no *dot plot* FSC vs CD56 (D), respectivamente. Células NK e 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). Fonte: Cunha et al., 2016.

Da-Cruz e cols. (2010) demonstrou 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 T_H1, 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.

Para que essa resposta imune seja eficaz e bem-sucedida, é necessário que as células consigam se comunicar de forma eficiente, e tal comunicação ocorre através de mecanismos como liberação citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e de vesículas extracelulares. Desse modo, Costa *et al.* (a publicar) investigou através da citometria de fluxo, o papel e a contribuição dessas vesículas extracelulares no plasma e sobrenadante de cultura celular, em pacientes com LTA em diferentes fases do tratamento.

O processo para análise de nanopartículas por citometria de fluxo é desafiador e requer cuidados desde a obtenção das amostras. Para isso, tubos de coleta com diferentes anticoagulantes foram testados a fim de descobrir a melhor opção para a caracterização dessas partículas no plasma. O tubo contendo citrato de sódio apresentou uma maior concentração de VEs e menor quantidade de debris, se tornando mais apropriado para a visualização das partículas (Figura 5.21).

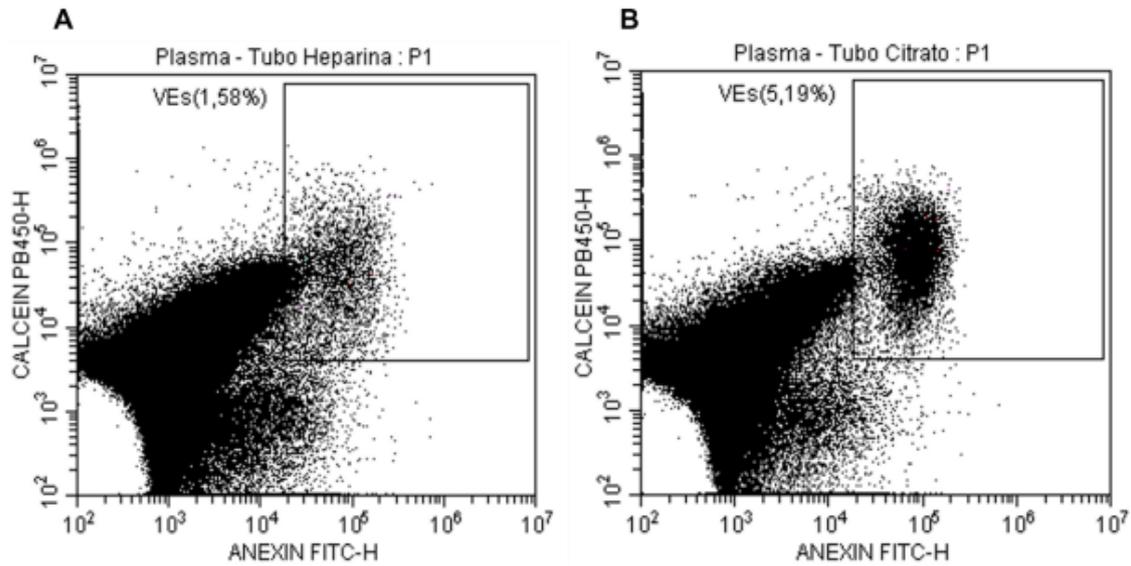


Figura 5.21 – Protocolo citofluorimétrico representativo para demonstrar as VEs na aquisição de plasmas coletados em tubo contendo heparina e citrato de sódio, marcados com Anexina V e Calceína no software CytExpert. *Dot plots* Anexina FITC (Anexina FITC-H) vs. Calceína PB450 (Calcein PB450-H) mostrando as VEs durante a aquisição do plasma coletado no tubo contendo heparina (A) e no tubo contendo citrato de sódio (B).

A fim de detectar as VEs no plasma de indivíduos sadios e pacientes com LTA, essas partículas foram marcadas com Anexina V e Calceína, sendo consideradas VEs as partículas que apresentaram marcação dupla-positiva. A Anexina é atraída pela fosfatidilserina, que está translocada na membrana externa durante o processo de formação de microvesículas, sendo considerada bom biomarcador. Ainda, a Calceína é responsável por mostrar a integridade da membrana da partícula, permitindo a visualização de VEs com a membrana íntegra. Com isso, foi feito um *gate* no quadrante duplo positivo para ambos os biomarcadores. Além disso, foi avaliado a origem dessas VEs, podendo ser de origem plaquetária (CD41⁺) ou eritrocitária (CD235a⁺) (Figura 5.22).

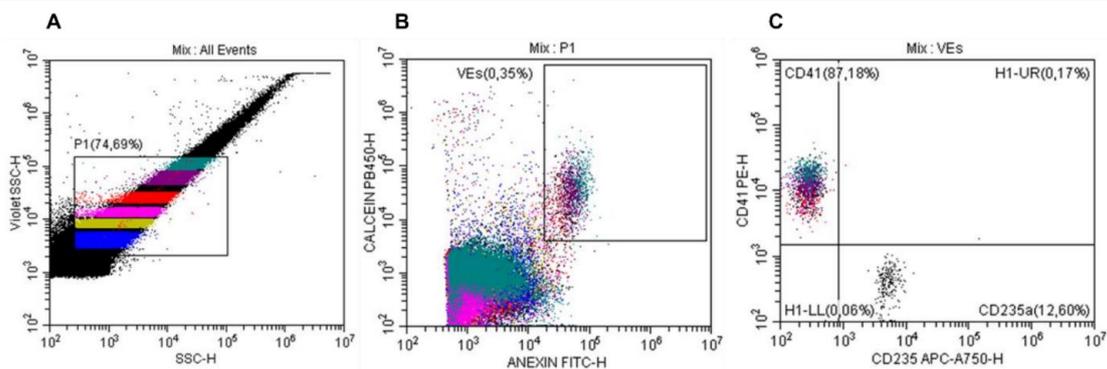


Figura 5.22 – Protocolo citofluorimétrico representativo para determinar a estratégia de *gate* utilizadas na detecção de vesículas extracelulares no plasma, no software CytExpert. (A) Dot plot Violet SSC-H vs. SSC Blue para visualizar todas as partículas. (B) *Dot plot* Annexin FITC-H vs. Calcein PB450-H para estabelecer as VEs. (C) *Dot plot* CD41 PE (CD41 PE-H) vs. CD235a AF750 (CD235 APC-A750-H) para verificar a origem plaquetária e eritrocitária das VEs, respectivamente.

Ao avaliar o plasma de pacientes com LTA e comparar com indivíduos saudáveis, Costa et al. (a publicar), observou que não houve alteração na frequência de VEs em pacientes em diferentes fases do tratamento. Entretanto, houve uma predominância de VEs derivada de plaquetas, cerca de 90%, em todos os grupos estudados (Figura 5.23).

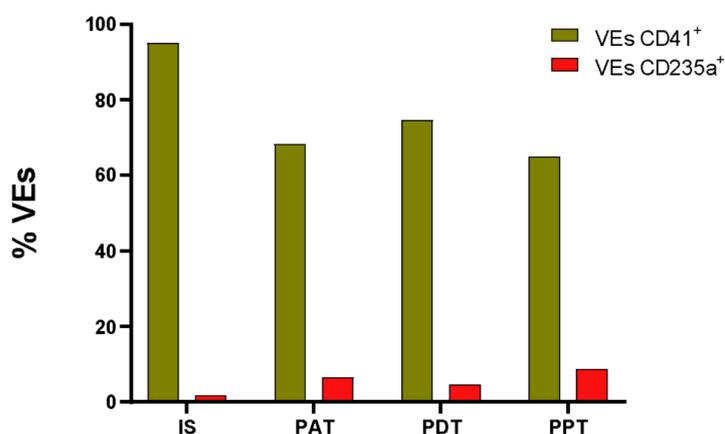


Figura 5.23 – Origem das VEs no plasma de indivíduos saudáveis e pacientes em diferentes fases do tratamento. Gráficos de barras mostrando a mediana do percentual de VEs derivadas de plaquetas (VEs CD41⁺) e derivadas de eritrócitos (VEs CD235a⁺) foi calculada em indivíduos saudáveis e pacientes em diferentes fases do tratamento (antes, durante e pós-tratamento, respectivamente).

As VEs de origem plaquetária participam da resposta imune em infecções promovendo recrutamento leucocitário ao local da infecção, e induzem a resposta de células B e a produção de IgG. O que corrobora com a imunopatogenia da leishmaniose cutânea humana, onde observamos uma resposta imune de linfócitos T CD4⁺, polarizada em T_H1 e T_H2, e T CD8⁺, podendo levar à cura ou à progressão da doença como mostram estudos de Bertho *et al.*, 2000; Ferraz *et al.*, 2015; 2017; e Cunha *et al.*, 2016; 2020.

A contribuição dessas VEs no sobrenadante de cultura celular de pacientes também foi investigada. Para isso, as células foram colocadas em cultura na ausência e presença de estímulo específico de *L. braziliensis* e posteriormente, para detectar e avaliar a origem dessas partículas, foram utilizadas marcações com Annexina V e Calceína, e para caracterizá-las, marcações com anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD14 para

analisar VEs derivadas de linfócitos T CD4, T CD8 ou monócitos, respectivamente (Figura 5.24).

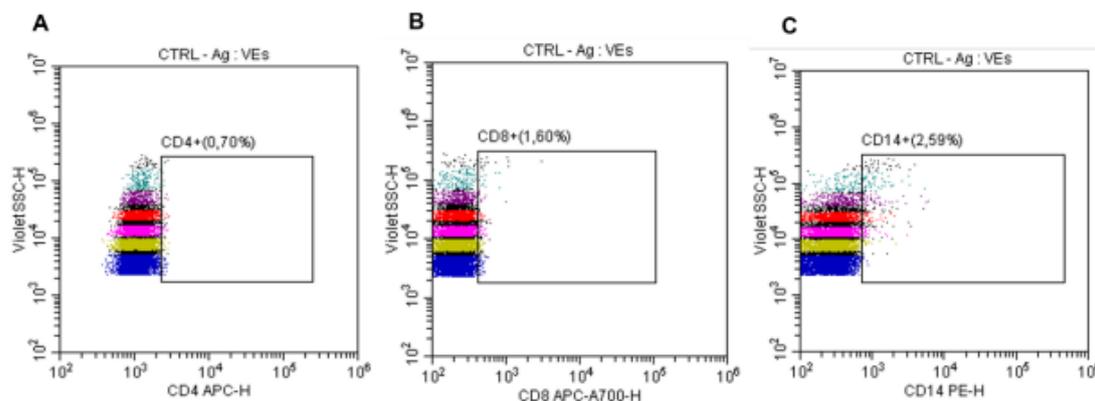


Figura 5.24 – Protocolo citofluorimétrico representativo para determinar a estratégia de *gate* utilizadas para detectar a origem de vesículas extracelulares no sobrenadante, no software CytExpert. Um *Dot plot* Violet SSC-H vs. CD4 APC-H foi criado para visualizar as VEs derivadas de linfócitos T CD4⁺ (A), um *Dot plot* Violet SSC-H vs. CD8 APC-A700-H foi criado para as VEs derivadas de linfócitos T CD8⁺ (B) e um *Dot plot* Violet SSC-H vs. CD14 PE-H foi criada para as VEs derivadas de monócitos.

A taxa de estimulação específica foi observada, e para isso o índice de estimulação (subtração entre os índices obtidos no *background* e com estímulo de *L. braziliensis*) foi calculado. Deste modo, um aumento estatisticamente significativo na frequência de VEs, em pacientes durante o tratamento quando comparados aos pacientes com a doença ativa foi constatado. Assim como, uma tendência ao aumento na frequência de VEs em pacientes após o tratamento quando comparado aos pacientes antes do tratamento (Figura 5.25). Durante a infecção por *Leishmania*, o tipo de resposta imune desencadeada dita a cura ou avanço da doença, sendo o perfil de resposta T_H1 ou T_H2, como mostra Da-Cruz et al. (2005). Visto isso, o aumento dessas VEs em pacientes durante o tratamento pode sugerir uma associação a potencialização de uma resposta imune específica pela terapia utilizada.

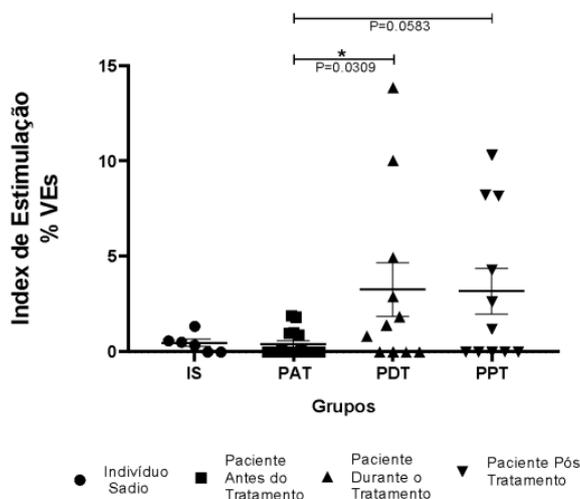


Figura 5.25 – Gráfico de dispersão com index de estimulação do percentual de VEs em cultura celular. As CMSP de indivíduos sadios e pacientes antes do tratamento, durante o tratamento e pós-tratamento foram submetidos a cultura celular sem estímulo (Bg) e estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* (Ag). Os dados são representados pela média e erro padrão. Cada ponto representa um indivíduo. As comparações estatísticas foram realizadas com o teste não-paramétrico Mann-Whitney. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

5.5. Malária

A malária é causada por parasitos do gênero *Plasmodium* e transmitida ao homem (na maioria das vezes) pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados. As principais espécies associadas à malária humana são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. De acordo com o último relatório mundial da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 247 milhões de casos de malária e 619 mil mortes por malária foram registrados em todo o ano de 2021. No Brasil em 2021, cerca de 99% da transmissão da malária se concentrou na região da Amazônia, sendo 33 municípios concentrando 80,0% dos casos. Do total de casos notificados no país 17,0% (23.408) são pelo *P. falciparum* e malária mista e 83,0% (114.449) foram de malária por *P. vivax* e outras espécies parasitárias.

Após a picada do mosquito (Figura 5.26), os esporozoítos são inoculados na pele do hospedeiro e entram na corrente sanguínea. Nos sinusóides hepáticos, eles penetram através das células de Kupffer no espaço perisinusoidal e vão invadir os hepatócitos para iniciar o ciclo hepático ou exo-eritrocítico. O esporozoítos se diferenciam em esquizontes maduros em estágio hepático com diversos merozoítos uninucleados circundados por uma membrana parasitófora. O hepatócito contendo esquizontes hepáticos maduros se rompe liberando merossomos, que serão transportados para a circulação sanguínea geral e clivam, liberando os merozoítos que irão invadir os reticulócitos (glóbulos vermelhos jovens), iniciando o ciclo eritrocítico ou de estágio

sanguíneo, dando início aos primeiros sintomas da malária. No *P. vivax*, há estágios de hipnozoíto hepático adormecidos, ou seja, ficam em estado de latência que podem reativar e levar a recaídas no estágio sanguíneo. Dentro do eritrócito, o merozoíto se diferencia no trofozoíto eritrocítico. Quando estiver totalmente maduro, o eritrócito infectado se rompe liberando os merozoítos, que então invadem novos eritrócitos, iniciando todo o ciclo de estágio eritrocítico, ruptura e reinvasão. Os ciclos eritrocitários repetem-se a cada 48 horas nas infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. Alguns merozoítos podem desenvolver gametócitos.

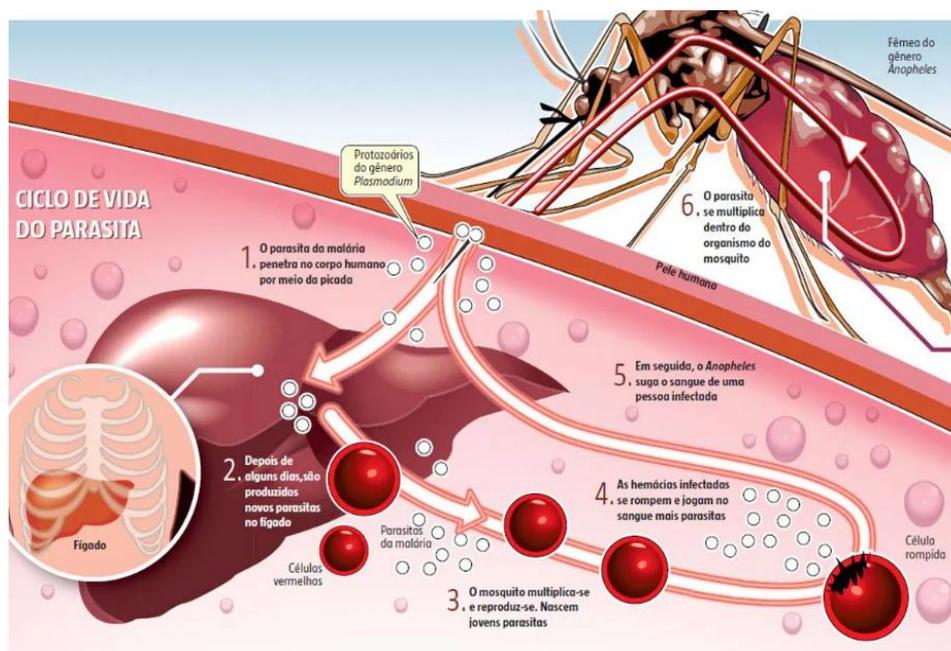


Figura 5. 26 – Ciclo de vida do parasita da malária. Fonte: Ilustração via Visual Hunt.

Por meio do repasto sanguíneo, num indivíduo infectado, o mosquito fêmea da espécie de *Anopheles* ingere os gametócitos e inicia a fase sexual do ciclo de vida. No intestino médio do mosquito, os gametócitos escapam dos eritrócitos e se tornam sexualmente estimulados, o gameta macho se funde com a fêmea e formam um zigoto diploide. O zigoto é transformado em um oocineto de estágio de parasita invasivo, atravessando a parede do intestino médio passando pelas células epiteliais e repousam adjacente à lâmina basal, onde se transformam em um oocisto que irá sofrer múltiplas divisões nucleares produzindo milhares de esporozoítos. Na maturidade o oocisto se abre e os esporozoítos são liberados na hemocele do mosquito, migrando e penetrando nas glândulas salivares. Nas glândulas salivares os esporozoítos tornam-se infecciosos para os seres humanos, completando o ciclo de vida

Os sintomas clínicos das infecções por malária são iniciados logo após a infecção inicial do estágio hepático transferida para a infecção sanguínea, na qual as formas de merozoíto de parasitas invadem as hemácias. Na infecção por *P. falciparum*, os eritrócitos são invadidos e a parasitemia pode exceder 20-30% e no *P. vivax* que possui a especificidade exclusiva de invadir reticulócitos, a biomassa parasitária é menor, raramente excedendo 2-3% de parasitemia. Acredita-se que a capacidade de *P. vivax* permanecer em circulação seja devido ao aumento da plasticidade dos reticulócitos infectados, observada à medida que os parasitas se desenvolvem, contrastando com o aumento da rigidez que ocorre para os eritrócitos infectados por *P. falciparum*.

Os anticorpos específicos da malária, produzidos pelas células B secretoras de anticorpos, desempenham um papel essencial na limitação da multiplicação do parasita durante o estágio sanguíneo e na redução da proporção de infecções que progridem para a doença completamente desenvolvida. Em áreas onde o *Plasmodium vivax* é endêmico, a imunidade clínica se desenvolve gradualmente após exposição repetida ao parasita. Tanto crianças quanto adultas em comunidades na região amazônica experimentam ataques de malária, porém uma proporção maior de infecções permanece assintomática em indivíduos com mais de 5 a 8 anos de exposição contínua à infecção por *P. vivax*. É interessante notar que a imunidade clínica contra o *P. vivax* parece se desenvolver mais rapidamente do que contra o *P. falciparum* em áreas onde ambos os parasitas da malária coexistem. Além disso, foi observado que uma alta expressão de anticorpos adquiridos naturalmente contra antígenos de estágios sanguíneos assexuados selecionados do *P. vivax* está associada a um risco prospectivamente reduzido de ataques de malária *vivax* em populações da Amazônia.

Uma vez adquirida, a imunidade clínica contra a malária requer reforço persistente ou frequente, e pode diminuir quando os indivíduos se mudam de comunidades com alta incidência de malária e permanecem não expostos por longos períodos. Foi observado que os níveis de anticorpos específicos contra o *Plasmodium falciparum* diminuem rapidamente em indivíduos não expostos, o que está de acordo com relatos anteriores sobre a memória defeituosa das células B na malária. No entanto, é interessante notar que, embora os anticorpos específicos contra o *P. falciparum* tendam a ter uma duração curta, suas células B de memória (MBCs) podem ser detectadas no sangue periférico de indivíduos expostos à transmissão em declínio, assim como em visitantes de curto prazo, vários meses ou anos após a última infecção

documentada. Isso sugere que as MBCs antígeno-específicas são mantidas independentemente das células plasmáticas de vida longa.

Em populações expostas ao *Plasmodium falciparum* em ambientes endêmicos na África e na Amazônia, foram observadas análises fenotípicas das células B circulantes, revelando uma expansão de MBCs "atípicas", cuja quantidade está diretamente relacionada à exposição vitalícia à malária. A funcionalidade dessas MBCs atípicas, que são caracterizadas como CD19⁺CD10^{neg}CD21^{neg}CD27^{neg}, ainda é motivo de debate. No entanto, análises recentes indicaram que as MBCs associadas à malária apresentam redução na função de sinalização e são incapazes de secretar anticorpos ou diferenciar-se em células B secretoras de anticorpos quando estimuladas por antígenos.

No estudo Soares e cols (2019) examinaram as alterações nos subconjuntos de células B e na resposta de anticorpos IgG a um importante antígeno de superfície do estágio sanguíneo, a proteína de membrana apical 1 de *P vivax* (PvAMA-1), após uma infecção aguda por malária *vivax* e durante um período de acompanhamento prolongado de seis meses após a eliminação do parasita. Assim, as células foram submetidas ao protocolo de coloração, utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD3 (clone Leu4) (BD Biosciences), anti-CD10 (clone ALB1) (Beckman Coulter), anti-CD19 (clone HIB19), anti-CD20 (clone 2H7), anti-CD21 (clone Bu32) e anti-CD27 (clone M-T271) (BioLegend). A 7-aminoactinomicina (7AAD) (Sigma-Aldrich) foi incluída no painel para exclusão de células mortas. As amostras foram adquiridas usando o citômetro de fluxo MoFlo Astrios (Beckman Coulter). Após a aquisição, determinamos as frequências de CD19⁺ Subpopulações de linfócitos B através de um protocolo de citometria de fluxo de 7 parâmetros criado usando Software Summit v.6.3.2 (Beckman Coulter). Usaram controles corados únicos para definir a compensação de cor e fluorescência menos um (FMO) e controles Ab com correspondência de isotipo para definir os *gates* para análise. Uma estratégia de *gate* foi definida da seguinte forma (Figura 5.27): de uma região baseada em perfis de dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) (Figura 5.27A), dois *dot plot* (FSC-H vs FSC-A e FSC-A vs FSC-W) foram criados para excluir agregados celulares das análises (Figura 5.27B e C). As células viáveis foram definidas por um *dot plot* (7AAD^{neg}) em FSC-A vs 7AAD *dot plot* (Figura 5.27D). Então, com base no *gate* 7AAD^{neg}, as populações de células de interesse foram definidas da seguinte forma: células B totais (Figura 5.27E); células B imaturas: CD19⁺CD10⁺ e células B maduras: CD19⁺CD10^{neg} (Figura 5.27F); *células naïve*: CD19⁺CD10^{neg}CD21⁺CD27^{neg}, células B de memória clássica (MBC): CD19⁺CD10^{neg}CD21⁺CD27⁺, células B de memória atípica:

CD19⁺CD10^{neg}CD21^{neg}CD27^{neg} (Figura 5.27G); plasmócitos: CD19⁺CD10^{neg}CD21^{neg}CD27⁺CD20^{neg}; e MBCs ativados: CD19⁺CD10^{neg}CD21^{neg}CD27⁺CD20⁺ (Figura 5.27H).

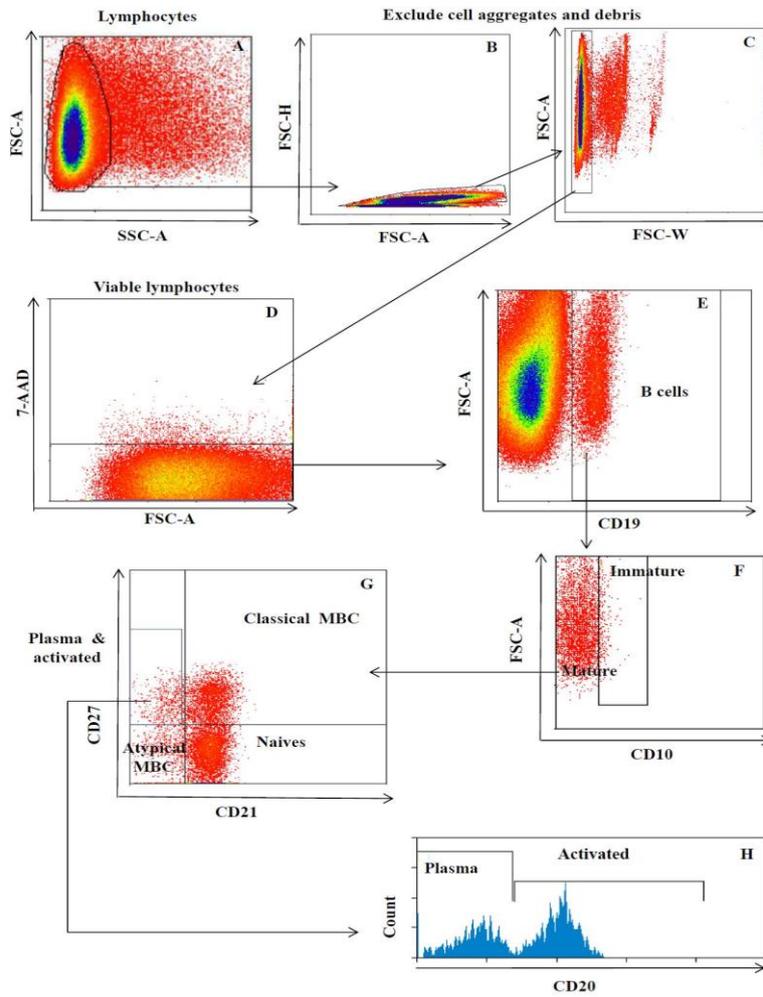


Figura 5.27: Estratégia de gate.

<p style="text-align: center;">Grupos de estudo</p> <p>AC – Malaria aguda por <i>P. Vivax</i> CV – Controle em periodo de coalescência</p> <p>Painel de anticorpos monoclonais</p> <p style="text-align: center;">anti-CD3 anti-CD10 anti-CD19 Anti-CD20 Anti-CD21 Anti-CD27 7AAD</p>

<p>Populações de interesse:</p> <p>(F) Immature B cells: CD19+CD10+; Mature B cells: CD19+CD10neg;</p> <p>(G) Naïve cells: CD19+CD10-CD21+CD27-; Classical MBC: CD19+CD10-CD21+CD27+; Atypical MBC: CD19+CD10-CD21-CD27-;</p> <p>(H) plasma: CD19+CD10-CD21-CD27+CD20-; activated MBC: CD19+CD10-CD21-CD27+CD20+</p> <p>MBC = Memory B Cell</p>
--

Dada a complexidade do parasito e seu ciclo biológico, a resposta imune do hospedeiro à malária é complexa e multifatorial, sendo os linfócitos e seus produtos essenciais na regulação da doença em ambas as etapas, a pré-eritrocítica (com a predominância de células T-CD8, NK e T-gamma delta) e a eritrocítica (T-CD4 e células B). Nesse contexto, a comunicação entre as células torna-se um mecanismo chave durante a evolução do ciclo biológico na malária, seja para o direcionamento de uma resposta eficaz no controle da infecção e manutenção da homeostase, ou na aquisição de memória para infecções subsequentes. Nos últimos anos tem sido evidenciado que comunicação pode ser realizada através de diferentes mecanismos, entre eles a formação e liberação de vesículas extracelulares (VEs). As VEs são definidas de acordo com seu tamanho e biogênese, sendo formadas e liberadas pela maioria das células nucleadas sob diferentes condições patológicas e fisiológicas, por isso têm sido

reconhecidas como importantes reguladores das funções celulares, mecanismos de patogênia e da resposta imune contra patógenos, tornando-as importantes biomarcadores das etapas clínicas de diversas doenças.

Vários estudos em humanos demonstraram que os VEs circulantes de várias fontes celulares são elevados durante a infecção por espécies de *Plasmodium* e que seus níveis plasmáticos estão associados à gravidade da doença. Acredita-se que as VEs liberados pelos glóbulos vermelhos infectados pelo *Plasmodium* e outras células hospedeiras durante a infecção pela malária desempenhem papéis-chave na patogênese da doença e sejam componentes vitais da biologia do *Plasmodium* spp. As investigações de VEs em parasitas patogênicos ganhou grande notoriedade, por desempenharem papéis importantes na imunomodulação e sobrevivência de parasitas, assim como serem alvos de aplicações promissoras no diagnóstico e tratamento de doenças parasitárias. Embora na malária por *P. falciparum* existam alguns estudos identificando a origem e o papel das VEs na malária grave em indivíduos residentes no continente africano, o conhecimento sobre a presença, origem e frequência destas VEs em indivíduos infectados por *P. vivax* e, ainda, residentes em áreas endêmicas brasileiras é praticamente inexistente.

REFERÊNCIAS

Agência Fiocruz de Notícias. "Malária." *Fiocruz*, Clarisse Bressan e Patrícia Brasil, portal.fiocruz.br/doenca/malária. Accessed 15 Dec. 2022.

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

Castro KKG, da Silva PHL, Dos Santos LN, Leal JMP, Mylena Masseno de Pinho Pereira MMP, Alvim IMP, Esquenazi D. Downmodulation of Regulatory T Cells Producing TGF- β Participates in Pathogenesis of Leprosy Reactions. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jul 18;9:865330.

Chetty S, Govender P, Zupkosky J, Pillay M, Ghebremichael M, Moosa MY, Ndung'u T, Porichis F, Kasproicz VO. Co-infection with *Mycobacterium tuberculosis* impairs HIV-specific CD8+ and CD4+ T cell functionality. *PLoS One*. 2015 Mar 17;10(3):e0118654.

Como é feito o diagnóstico da malária? Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pergunta/como-e-feito-o-diagnostico-da-malaria#:~:text=Existem%20dois%20tipos%20de%20teste>>.

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.

Cunha CF, Ferraz-Nogueira R, Costa VFA, Pimentel MIF, Chometon TQ, Lyra MR, Schubach AO, Da-Cruz AM, Bertho AL. Contribution of *Leishmania braziliensis* antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+CD56+NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. *PLoS One*. 2020 Mar 23;15(3):e0229400.

Da Silva PHL, Dos Santos LN, Mendes MA, Costa Nery JAC, Sarno EN, Esquenazi D. Involvement of TNF-Producing CD8+ Effector Memory T Cells with Immunopathogenesis of Erythema Nodosum Leprosum in Leprosy Patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2019 Feb; 100(2): 377–385.

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

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.

Dayananda KK, Achur RN, Gowda DC. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis*. 2018 Jan-Mar;55(1):1-8. doi: 10.4103/0972-9062.234620.

Dos Santos LN, da Silva PHL, Alvim IMP, Costa Nery JAC, Lara FA, Sarno EN, Esquenazi D. Role of TEFFECTOR/MEMORY Cells, TBX21 Gene Expression and T-Cell Homing Receptor on Type 1 Reaction in Borderline Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS One*. 2016 Oct 20;11(10):e0164543.

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.

Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, Lyra MR, Pereira-Da-Silva T, Schubach AO, Da-Cruz AM, Bertho AL. CD3+CD4negCD8neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a+ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors*. 2017 May 3;10(1):219.

Fuchs Antonio. "Malária: Região Amazônica Concentra 99% Dos Casos No Brasil – Ágora Fiocruz." *Ágora Fiocruz*, 25 Dec. 2019, stihealth2030agenda.fiocruz.br/2019/12/25/malaria-regiao-amazonica-concentra-99-dos-casos-no-brasil/. Accessed 18 Dec. 2022.

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Em: Coura, JR (ed.) *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Rio de Janeiro, RJ. Ed. Guanabara Koogan. 2013; p.1383-1394.

German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. *Transfus Med Hemother*. 2016 May;43(3):203-22.

Kumari D, Singh S, Kumari M, Gupta H, Chauhan D, Singh K, Eslavath MR, Bhushan B, Dogra V, Bargotyia M, Bhattar S, Gupta U, Hussain J, Jain S, Meena R, Varshney R,

Ganju L, Singh Y. Flow cytometry profiling of cellular immune response in COVID-19 infected, recovered and vaccinated individuals. *Immunobiology* 228 (2023) 152392.

Macedo AB, Sánchez-Arcila JC, Schubach A, Mendonça SM, Marins-Dos-Santos A, Madeira MF, Gagini T, Pimentel MIF, De Luca PM. Multifunctional CD4⁺T cells in patients with American cutaneous Leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2012 Mar; 167(3): 505–513

Mantel PY, Marti M. The role of extracellular vesicles in *Plasmodium* and other protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 2014 Mar;16(3):344-54. doi: 10.1111/cmi.12259.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 1.126 p.: il. Modo de acesso: World Wide Web: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed.pdf ISBN 978-65-5993-102-6

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998 Nov;40(6):363-370.

Nery JA, Sousa MDG, Esquenazi D. Lepra. In: Ocampo J & Lupi O. *Dermatologia: guias de actualizacion clínica.* 1st Edition ed. Brazil: GEN & AC Farmaceutica. 2015, p. 892.

Opadokun T, Rohrbach P. Extracellular vesicles in malaria: an agglomeration of two decades of research. *Malar J.* 2021 Nov 20;20(1):442. doi: 10.1186/s12936-021-03969-8.

Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik Jr F. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Review of Clinical Pharmacology.* Volume 14, 2021 - Issue 5.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338-381. Scollard DM. *International Textbook of Leprosy. Pathogenesis and Pathology of Leprosy.* National Hansen's Disease Programs, 2016.

Soares RR, Cunha CF, Ferraz-Nogueira R, Marins-Dos-Santos A, Rodrigues-da-Silva RN, da Silva Soares I, da Costa Lima-Junior J, Bertho AL, Ferreira MU, Scopel KKG. Apical membrane protein 1-specific antibody profile and temporal changes in peripheral blood B-cell populations in *Plasmodium vivax* malaria. *Parasite Immunol.* 2019 Sep;41(9):e12662. doi: 10.1111/pim.12662. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31271660.

Vasconcelos Júnior FCF, Mouta AAN, Aragão RV, Barbosa GSL, Lopes PF, Silva ACBS, Gândara BF, Beltrão BCR, Silva DFB, Beltrão RPL. Espectro clínico da infecção por COVID-19 nos organismos humanos: revisão bibliográfica. *Revista Eletrônica Acervo Saúde / Electronic Journal Collection Health | ISSN 2178-2091*

World Health Organization (WHO). Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission, 2022. Disponível em

<https://www.who.int/publications/i/item/whower9736-429-450> . Acesso em: 15 de janeiro de 2022.

World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

CAPÍTULO 6. CELL SORTING POR CITOMETRIA DE FLUXO – PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES

Katherine Kelda Castro, Alvaro Luiz Bertho

Ao longo dos anos, as tecnologias envolvidas no campo das ciências biológicas e médicas evoluíram de forma intensa. Principalmente a partir do advento das técnicas e de suas ramificações. Hoje em dia é possível visualizar grande parte da arquitetura de um tecido, evidenciando células, moléculas constituintes e elementos alterados, relacionados a alguma patologia ou não. Além disso, a descoberta da impedância celular, dos anticorpos monoclonais e a melhoria dos fluoróforos contribuíram para o avanço da citometria de fluxo, permitindo a análise fenotípica e funcional de diversas células.

Mesmo assim, por muito tempo, foi difícil compreender o papel das populações celulares frente a microrganismos, tumores e corpos estranhos de modo geral. Assim, para melhorar os estudos, cientistas desenvolveram metodologias de isolamento celulares. Essas técnicas são responsáveis pela separação de populações específicas, oriundas de uma inicialmente heterogênea e não uniforme (Figura 6.1), para a realização de diversas metodologias posteriores.

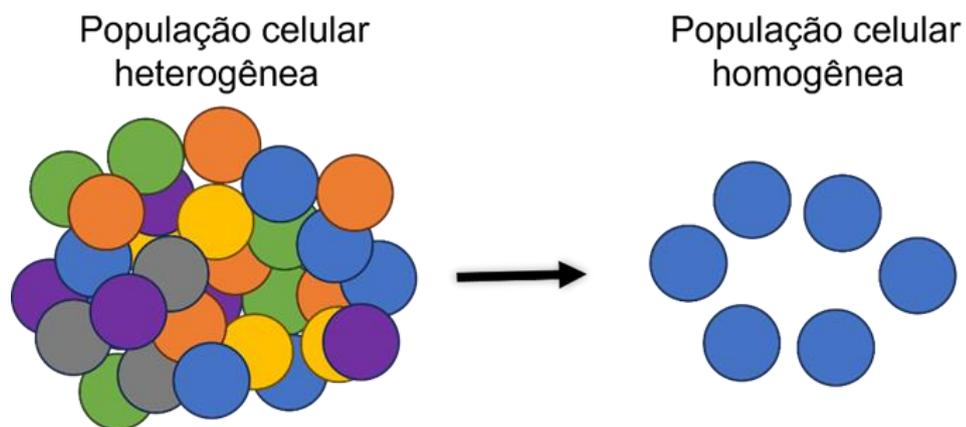


Figura 6.1 - Separação das células oriundas de uma população heterogênea.

Dentro desse escopo existem diferentes técnicas como o *cell sorting* por *beads* magnéticas (Magnetic Activated Cell Sorting - MACS), *cell sorting* por flutuação (Buoyancy Activated Cell Sorting – BACS) e *cell sorting* por fluorescência (*Fluorescence Activated Cell Sorting* – FACS). E independentemente da técnica é importante conhecer a eficiência, pureza e a taxa de recuperação fornecida pela metodologia em questão. Esses termos irão designar, respectivamente, o tempo necessário para ocorrer o

isolamento, a frequência de células obtidas e a relação entre a população inicial heterogênea e a final homogênea.

6.1. Exemplos de *cell sorting*

No isolamento por meio do magnetismo os anticorpos (lectinas ou enzimas), que caracterizam a população celular alvo, estão acoplados a *microbeads* de ferro (Figura 6.2). Assim, após o acionamento de um campo magnético é realizada a seleção e separação das células desejáveis. A taxa de isolamento costuma ser alta, entretanto, o uso do campo magnético pode afetar a integridade de algumas células mais delicadas.

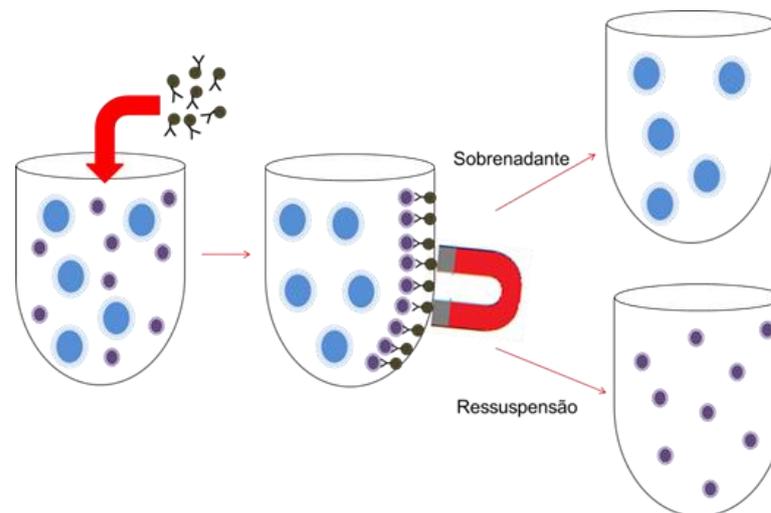


Figura 6.2 - Esquema representativo de separação de células por *beads* magnéticas

Na separação celular por meio da flutuação os anticorpos estão conjugados a microbolhas compostas por um centro gasoso revestido por albumina biotinilada (Figura 6.3A). Assim, ao encontrar a molécula alvo o complexo antígeno-anticorpo flutua para a superfície, enquanto o restante da população celular permanece no *pellet* (Figura 6.3B). Por separar com delicadeza, o método diminui os danos celular, entretanto, existe um limite de parâmetros que podem ser utilizados para selecionar a população de interesse.

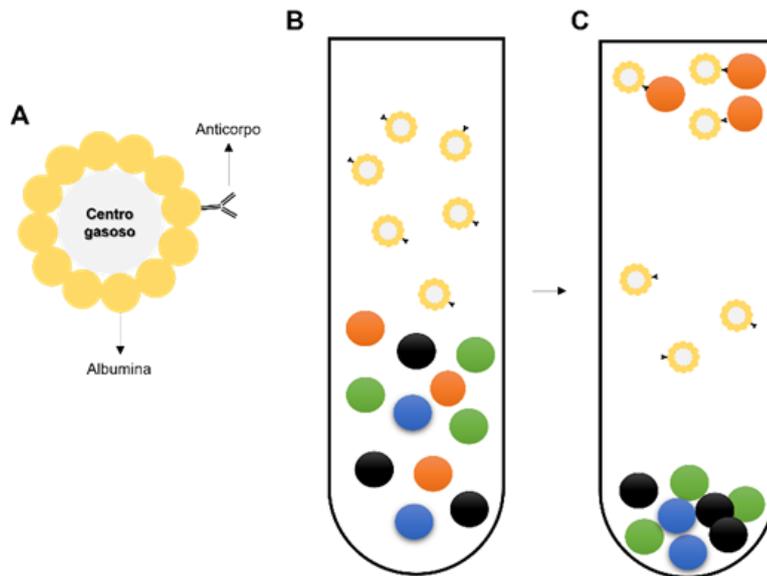


Figura 6.3 - Separação celular por meio da flutuação celular. A. Anticorpo acoplado a um revestimento composto por albumina, revestindo um núcleo gasoso. B. Os círculos coloridos representam células com características fenotípicas diferentes. Assim, de acordo com a afinidade do anticorpo com a respectiva molécula de superfície alvo, ocorre a ligação e consequentemente a flutuação celular, separando, dessa maneira, a célula de interesse.

E esse Já o isolamento por fluorescência, permite a identificação de perfis celulares complexos a partir da identificação e seleção de moléculas superficiais ou intracelulares que caracterizam o tipo celular. Garantido assim, maior entendimento daquela população no contexto do estudo. E para que essa técnica seja executada é necessário um citômetro de fluxo especializado nessa funcionalidade. E atualmente, existem diversas empresas que fabricam esses equipamentos como a Beckman Coulter, a Cytex, Bio-Rad e BD. Assim, cada modelo fornece um grau de biossegurança para manusear diferentes patógenos, bem como *LASERS* e filtros.

6.2. Princípios do *cell sorting* por citometria de fluxo

De forma resumida, o *sorting* ocorre quando o fluxo laminar (das células e solução salina) é transformado em gotas, individualizadas, que carregam a célula de interesse, que foi previamente identificada a partir do padrão de fluorescência. Em seguida, essas gotas são cobertas por uma carga de elétrons e então defletidas por meio de placas eletricamente carregadas para suportes contendo o meio de cultivo escolhido.

Agora, veremos em mais detalhes como esse processo ocorre. Primeiramente, antes de iniciar o processo de *cell sorting*, é necessário a aquisição e análise da amostra. Assim, após a escolha da população, a ser purificada, a amostra heterogênea (*pré-sorting*) é inserida no equipamento, seguindo todas as regras de biossegurança. Em seguida, as células são encaminhadas para a câmara de fluxo (*flow cell*) do

citômetro e direcionadas para a criação de um fluxo laminar envolvido por solução salina. Posteriormente, após deixar a câmara, as células são atingidas pelo laser, que excita os fluoróforos permitindo a identificação da população alvo. Esse sinal emitido pela molécula fluorescente é enviado aos respectivos detectores, a partir da passagem entre os espelhos e filtros. A seguir, o software instalado no computador permite a identificação inicial da amostra por meio da definição dos *dot plots* e/ou histogramas. Dessa maneira, as regiões de interesse (*gates*) são selecionadas, como visto no capítulo 3, e a purificação pode ser iniciada.

Durante o *sorting*, o fluxo laminar contínuo é interrompido por meio da vibração da *flow cell*, a partir da pizeletricidade. Assim, a energia para esse movimento é oriunda da compressão do cristal pizeletrico, localizado no topo da flowcell. Esse processo permite que o fluxo seja quebrado de maneira preditiva e padronizada, gerando diversas gotas (*droplets*), na região chamada *de break off point*. Nesse mesmo local, por carregamento de elétrons, cada gota selecionada recebe uma carga positiva ou negativa de acordo com o que foi programado no software.

Ademais, o 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, é fundamental para a calibração do citômetro de fluxo, essa é 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 deflexão, visando sempre atingir 100% de pureza de eficiência na separação homogênea das populações celulares.

Posteriormente, as gotas passam entre duas placas defletoras energizadas à 4000 volts e então são atraídas pela placa que possui carga elétrica oposta. Ou seja, de forma que as *droplets* 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 6.4).

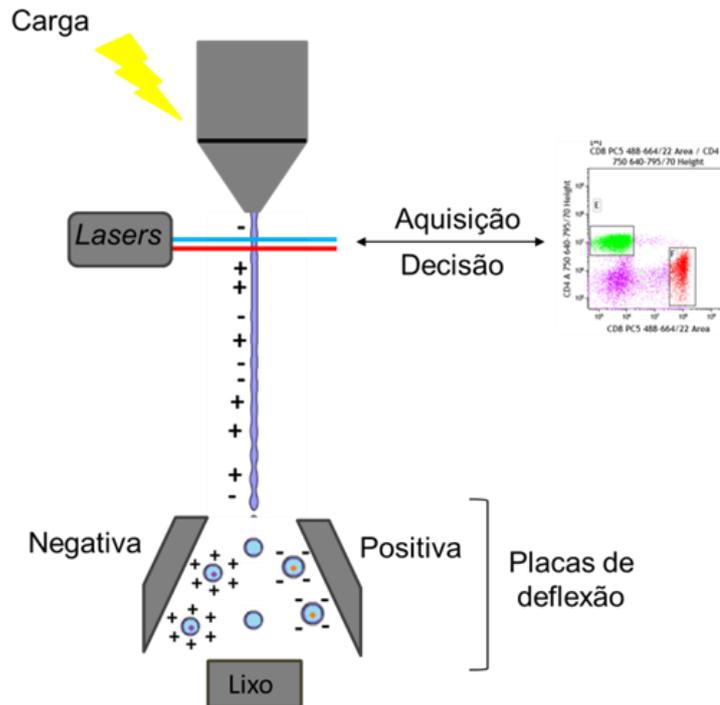


Figura 6.4 - Esquema representativo de um *cell sorting*. Imagem cedida por Chometon, 2018.

O *cell sorting*, por fluorescência, promove elevada taxa de pureza e a eficácia desse 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.

6.3. Aplicações do *cell sorting* por citometria de fluxo

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.

6.3.1. *Crossmatch*

Na clínica, hoje o *sorting* é utilizado no teste pré-transplante renal, conhecido como *crossmatch*, teste de reatividade cruzada ou compatibilidade cruzada, muito realizado 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.

6.3.2. Pesquisa científica

Na pesquisa científica o *sorting* pode ser utilizado em diversos contextos, como nos exemplos a seguir. Recentemente, isolaram bactérias pertencentes à microbiota humana, oriunda das fezes de indivíduos saudáveis. Para tal, antecedendo o isolamento, essas células foram expostas a oligossacarídeos conjugados a fluoróforos e o *sorting* foi estruturado com base nas células que conseguiram absorver esses metabólitos. Em seguida, o material genômico das células sorteadas foi investigado. Esse trabalho é um exemplo de *sorting* realizado a partir de um parâmetro único, entretanto, existem equipamentos que podem fazer a seleção de até seis populações celulares diferentes. Essa metodologia é executada partir do fornecimento de cargas elétricas mais ou menos positivas (ou negativas), e que fornecem diferentes graus de afinidade das gotas com as placas de deflexão como mostra a figura 6.5.

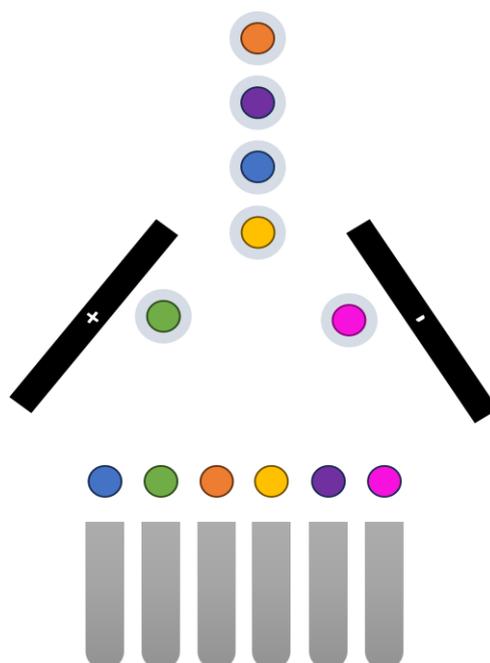


Figura 6.5. Exemplo de *sorting* realizado em seis vias

A utilização de anticorpos acoplados a fluoróforos é a forma clássica e mais utilizada para sortear células. Porém, a autofluorescência observada em algumas populações celulares também pode fornecer uma boa ferramenta para executar a técnica. Essa maneira de isolamento das células foi realizada para obtenção de protoplastos presentes nas folhas do vegetal *Catharanthus roseus* para a posterior análises de proteínas, metabólitos etc.

6.3.3. Sexagem de sêmen

A sexagem de sêmen 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 6.6). Para aferir a viabilidade dos espermatozoides é utilizado o FD&C Red N° 40 que funciona com um *quencher* da marcação do Hoechst 33342, o qual as células não viáveis, aparecem como negativas para a marcação com Hoechst 33342.

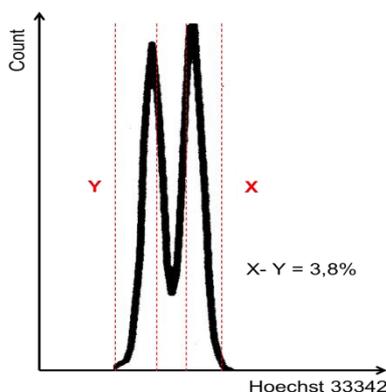


Figura 6.6 - Ilustração de um histograma típico de citometria de fluxo de esperma.

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 sem 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 6.7).

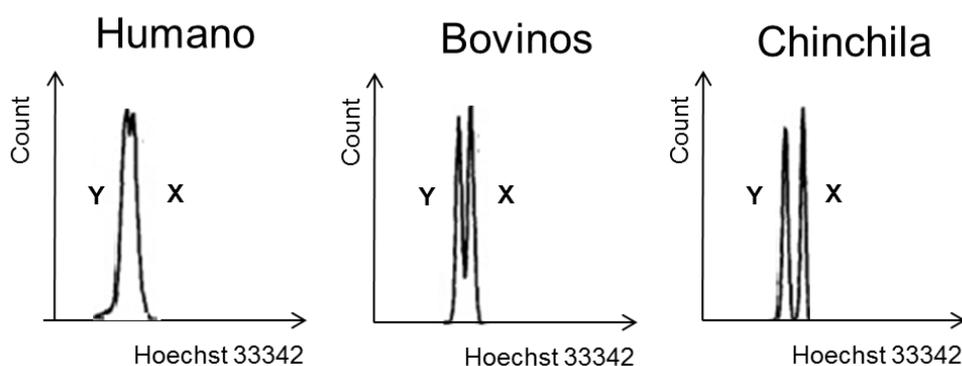


Figura 6.7 - Histogramas típicos de sexagem de sêmen por citometria de fluxo em diferentes espécies.

Para uma melhor eficiência na sexagem de sêmen, o citômetro 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 *tip* forçar os espermatozoides a passarem somente na orientação vertical quando interceptados pelo *LASER*. Além disso, para otimizar a captura da fluorescência os fotodetectores (PMTs) são situados a 0° e 90° do *LASER*. Essa mudança da posição dos PMTs auxilia a determinar se os espermatozoides estão na orientação correta (vertical) e uma mensuração mais precisa do Hoechst 33342. (Figura 6.8)

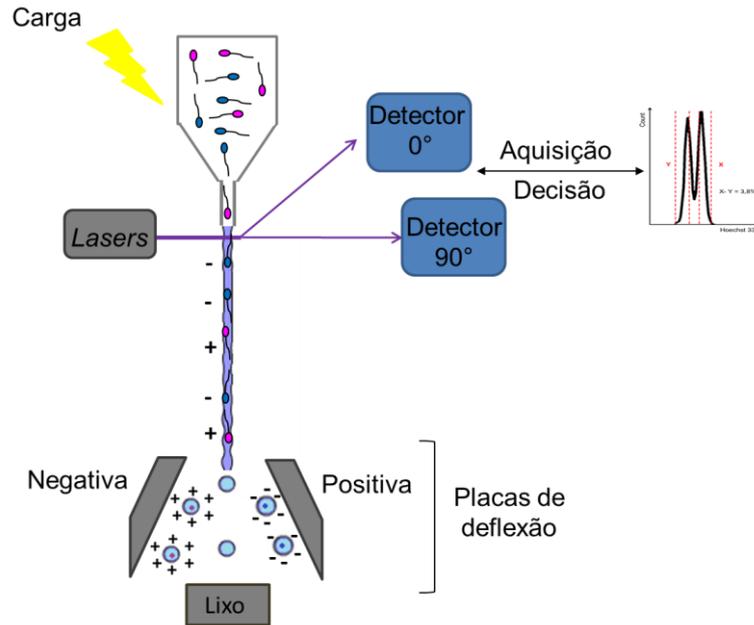


Figura 6.8 - Esquema de um citômetro-*cell sorter* modificado para sexagem de sêmen, mostrando que com a modificação da ponteira os espermatozoides passam sempre na orientação vertical. Imagem cedida por Chometon, 2018.

6.3.4. 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 (Figura 6.9), um software específico para calcular o direcionamento da mesma. A partir da única célula depositada no poço (*single cell sorting*), clones serão expandidos e podem ser submetidos a ensaios funcionais e de biologia molecular.

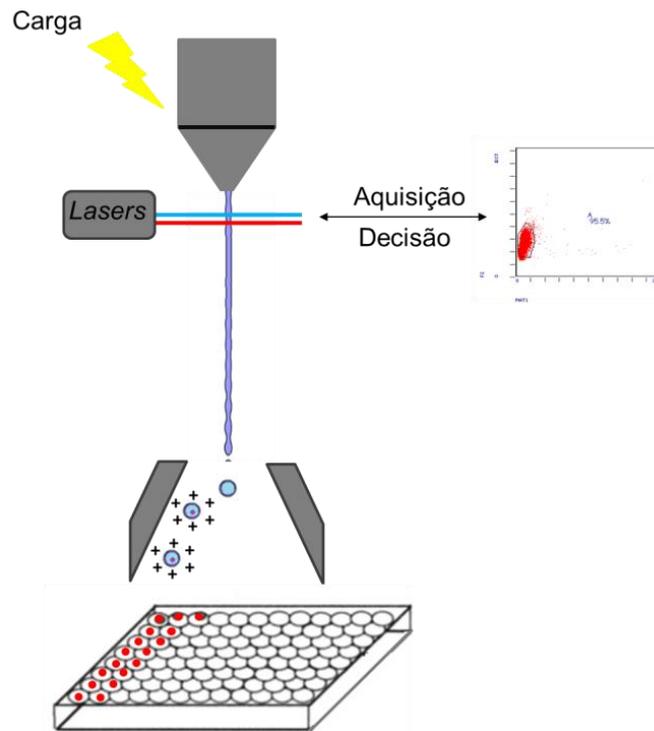


Figura 6.9 - Esquema de clonagem por citometria de fluxo. Placa de cultivo em movimento para que cada poço receba uma única célula. Imagem cedida por Chometon, 2018.

REFERÊNCIAS

Dridi L, Altamura F, Gonzalez E, Lui O, Kubinski R, Pidgeon R, Montagut A, Chong J, Xia J, Maurice CF, Castagner B. Identifying glycan consumers in human gut microbiota samples using metabolic labeling coupled with fluorescence-activated cell sorting. *Nat Commun* . 2023 Feb 7;14(1):662.

Garner DL, BL. 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*.1983;28: 312-321.

Garner DL, GE. Seidel J. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*. 2008;69:886-895.

Guedes JG, Guimarães AL, Carqueijeiro I, Gardner R, Bispo C, Sottomayor M. Isolation of Specialized Plant Cells by Fluorescence-Activated Cell Sorting. *Methods Mol Biol*. 2022;2469:193-200.

Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4: 116.

Johnson L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*. 2000 Jul 2;60-61:93-107.

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

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

Sharpe JC, Evans KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing *Theriogenology* 2009 Jan 1;71(1):4-10.