

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Férias/Verão - 2012

**Citometria de Fluxo:
Imunofenotipagem e Avaliação da Produção
de Citocinas**

Autores: Clarissa Ferreira Cunha
Fernanda Heloíse Côrtes
Geane Lopes Flores
Juan Camilo Sánchez-Arcila
Raquel Ferraz
Tatiana Pereira da Silva

Coordenadores: Dr. Álvaro Luiz Bertho
Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp

AUTORES

CLARISSA FERREIRA CUNHA: Biomédica formada pela Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ. Mestranda do Programa de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, bolsista CNPq. Atua na área de Imunologia e Patogenia, desenvolve a dissertação intitulada "Influência da Citotoxicidade na Imunopatogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana", no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Álvaro Luiz Bertho.

GEANE LOPES FLORES: Graduada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (2010). Mestranda do programa de Pósgraduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, bolsista CNPq. Atua na área de Imunologia, com ênfase na imunopatogenia da infecção pelo HIV. Desenvolve projeto de dissertação intitulado "Avaliação da reconstituição imune em gestantes HIV+ submetidas à quimioprofilaxia para a prevenção da transmissão vertical", no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Mariza Gonçalves Morgado.

FERNANDA HELOISE CÔRTEZ: Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos, RJ. Mestrado em Ciências pelo Programa de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Doutoranda do Programa de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, bolsista do CNPq. Desenvolve projeto de tese intitulado "Avaliação da antigenicidade de peptídeos sintéticos correspondentes a regiões imunodominantes do HIV-1", no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dr^a Mariza Gonçalves Morgado e co-orientação do Dr. Gonzalo Bello.

JUAN CAMILO SÁNCHEZ-ARCILA: Graduação em Ciências Biológicas formado na Universidade Nacional de Colômbia. Mestrado em Ciências pelo Programa de Pósgraduação em Biologia Parasitária, área de concentração: Imunologia e Patogenia. Doutorando no Programa de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, desenvolve a tese "Influência das co-infecções com leishmaniose tegumentar americana e/ou tuberculose na resposta imune a antígenos candidatos a compor uma vacina antimalárica em populações naturalmente expostas à infecção no estado de Rondônia" no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação da Dra. Joseli Ferreira de Oliveira.

RAQUEL FERRAZ: Graduação em Biomedicina pela Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ. Mestrado em Ciências pelo Curso de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, área de concentração: Imunologia e Patogenia. Doutoranda no Curso de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, bolsista CAPES, desenvolve a Tese "Perfil Funcional dos Linfócitos T CD8⁺, Células NK e NKT na Imunopatogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana", no

Laboratório de Imunoparasitologia e Lab. Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação do Dr. Álvaro Luiz Bertho e da Dra. Alda Maria Da-Cruz. *Trainée* na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e *Sorting*, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, desde 2006.

TATIANA PEREIRA DA SILVA: Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), Rio de Janeiro, RJ. Mestrado em Ciências Médicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Doutoranda no Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, IPEC, FIOCRUZ. Desenvolve a tese intitulada “Avaliação do perfil de reconstituição imunológica de indivíduos HIV/TB submetidos a tratamento para tuberculose e Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) incluindo Efavirenz”, no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação da Dr^a Mariza Gonçalves Morgado e Dra. Valéria Cavalcante Rolla.

COORDENADORES

ÁLVARO LUIZ BERTHO: Bacharelado em Biomedicina pela Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO), Rio de Janeiro, RJ. Doutorado em Ciências, pelo Curso de Pósgraduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, área de concentração: Imunoparasitologia. Pesquisador Titular e Chefe Substituto no Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Professor Adjunto de Imunologia Clínica na Universidade Severino Sombra, Vassouras, RJ. Coordenador da Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e *Sorting*, do Instituto Oswaldo Cruz, FioCruz. Ex-Consultor Científico no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório Dr. Sérgio Franco (1996-2003). Primeiro Citometrista de Fluxo no Brasil.

CARMEM BEATRIZ WAGNER GIACOIA GRIPP: Bacharelado em Biomedicina pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP. Doutora em Ciências, pelo Curso de Pósgraduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, área de concentração: Imunologia. Pesquisadora Adjunta do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Coordenadora do Serviço de Referência em CD4/CD8, do Laboratório de AIDS, integrante da Rede de Laboratórios para as Contagens de CD4/CD8 do Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde.

PREFÁCIO

A citometria de fluxo é uma tecnologia que tem sido utilizada mundialmente em diversas instituições de pesquisas e em laboratórios de análises clínicas, aplicada a uma variedade de estudos, principalmente nas áreas da Imunologia, Hematologia e Imunogenética. A evolução e modernização da citometria de fluxo vem acompanhando o progresso do desenvolvimento tecnológico e da ciência mundial. Neste cenário, uma das aplicações mais utilizadas e estudadas pela citometria de fluxo - a imunofenotipagem - vem sendo acompanhada da avaliação da produção intracelular de citocinas com o intuito de avaliar o perfil funcional de determinadas populações celulares. Embora os cursos de graduação abordem amplamente os aspectos teóricos envolvidos no estudo das respostas imunes, os aspectos práticos relacionados à forma de obtenção deste conhecimento não são devidamente explorados. Esta apostila, juntamente com as aulas deste Curso, tem como objetivo apresentar alguns conceitos básicos da imunologia e da citometria de fluxo enfatizando a avaliação da produção de citocinas associada à imunofenotipagem. Espera-se que este material seja utilizado como ferramenta de estudo e que desperte no aluno de graduação interesse e novas idéias que possam ser abordadas em estudos posteriores.

Inicialmente fazemos uma pequena revisão sobre os mecanismos de resposta imune, abordando os principais aspectos da imunidade inata e adaptativa, e a aplicabilidade da citometria de fluxo neste contexto. A seguir, um breve histórico sobre a citometria de fluxo e os princípios básicos desta técnica são apresentados. Por fim, descrevemos também as principais aplicações da citometria de fluxo, enfatizando a imunofenotipagem e a avaliação da produção intracelular de citocinas.

SUMÁRIO

1. Noções Básicas de Imunologia	07
1.1 Introdução	07
1.2 Hematopoiese	07
1.2.1 Processo de formação, maturação e ativação dos linfócitos	07
1.3 Imunidade Inata	09
1.4 Imunidade Adaptativa	11
1.5 Produção de Anticorpos Monoclonais	18
2. Princípios da Citometria de Fluxo	21
2.1 Conceitos Básicos	21
2.2 Fluorocromos	22
2.3 Preparação das amostras para aquisição em citômetro de fluxo	27
2.4 Sistema ótico	28
2.4.1 Tipos de filtro	28
2.5 Princípios de Funcionamento	29
2.6 Sistema eletrônico	33
2.7 <i>Software</i>	33
2.8 Compensação de cores	36
2.9 Histórico da Citometria de Fluxo	37
3. Aplicações Gerais da Citometria de Fluxo	43
3.1. Avaliação do conteúdo de DNA	43
3.2. Imunofenotipagem	46
3.3. Morte Celular	50
3.4. Proliferação celular	52
3.5. Ensaio funcionais	53
3.6. Análise de microorganismos	54
3.7. Interação parasito-célula hospedeira	54
3.8. Microbiologia marinha	55
4. Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	56
4.1 Imunofenotipagem	56
4.2 Aplicações da Imunofenotipagem	57
4.2.1 Subpopulações de linfócitos T	57
4.2.1.1 Células T <i>naive</i>	57
4.2.1.2 Células T efectoras e células T de memória	58
4.2.1.3 Células T reguladoras	61
4.2.2 Imunofenotipagem na infecção pelo HIV-1	62
4.2.2.1 A infecção pelo HIV e a depleção de células T CD4 ⁺	62

4.2.2.2	Quantificação de linfócitos TCD4 ⁺	65
	Sistema <i>FACSCount</i>	66
	Sistemas <i>TruCOUNT</i> e <i>Flow-Count fluorospheres</i>	67
4.2.3	Imunofenotipagem e as leucemias	68
5.	Citocinas	70
5.1	Origem do estudo das citocinas	70
5.2	Nomenclatura	70
5.3	O que são citocinas?	71
5.4	Como ocorre a sinalização mediada por citocinas	71
5.5	Propriedades e características das citocinas	73
5.6	Classes de Citocinas e suas funções	74
5.7	Papel das citocinas no controle de doenças parasitárias	76
5.8	Por que marcar citocinas na citometria de fluxo?	80
5.9	O uso de protocolos de marcação e função dos reagentes utilizados	80
5.9.1	Fixação	81
5.9.2	Permeabilização da membrana celular	83
5.9.3	Brefeldina	84
6.	Métodos para Detecção de Citocinas	85
6.1	ELISA (<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>)	85
6.2	<i>Cytometric Bead Array System – Kit CBA</i>	86
6.3	Protocolo de utilização do Kit CBA	90
7.	Literatura Recomendada	92

CAPÍTULO 1. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA

Geane Lopes Flores

1.1 Introdução

A imunologia é a ciência que estuda as respostas do nosso organismo a agentes que são reconhecidos como não-próprios, com o objetivo de protegê-lo. O sistema imunológico dos organismos superiores, em especial de aves e mamíferos, possui uma organização complexa de tecidos, células e mediadores químicos que interagem entre si para produzir a resposta imune.

Esta resposta pode ser classificada, de acordo com suas características e mecanismos de ação, em inata e adaptativa. A resposta inata é a primeira linha de defesa, e como o próprio nome diz o indivíduo já nasce com ela pronta para agir, sendo assim mais rápida, porém, não específica, respondendo da mesma forma aos diversos antígenos distintos todas as vezes que ocorre exposição. Já a resposta adaptativa precisa “se adaptar” frente ao estímulo para desenvolver seus mecanismos efetores, mas possui especificidade e memória para respostas subseqüentes, o que a torna mais eficiente e mais duradoura.

1.2 Hematopoiese

1.2.1 Processo de formação, maturação e ativação dos linfócitos

A hematopoiese é o processo pelo qual os componentes do sangue como eritrócitos, leucócitos e plaquetas se originam, ou seja, é a formação, desenvolvimento e maturação destas células. Desta forma, todas as células do sangue têm como precursor a célula-tronco hematopoiética pluripotente, localizadas na medula óssea do indivíduo. A atividade hematopoiética gera diversos tipos celulares, que podem ser divididos em linhagem linfóide, a qual dá origem aos linfócitos T, linfócitos B e células *natural killers* (NK); e linhagem mielóide, que gera outros diferentes tipos de leucócitos, como os monócitos, basófilos, neutrófilos e eosinófilos, além dos eritrócitos e os megacariócitos, sendo a partir destes a origem das plaquetas (Figura 1.1). Alguns tipos celulares completam a sua maturação fenotípica e funcional em outros tecidos e órgãos, como o timo, por exemplo, onde ocorre o desenvolvimento dos linfócitos T.

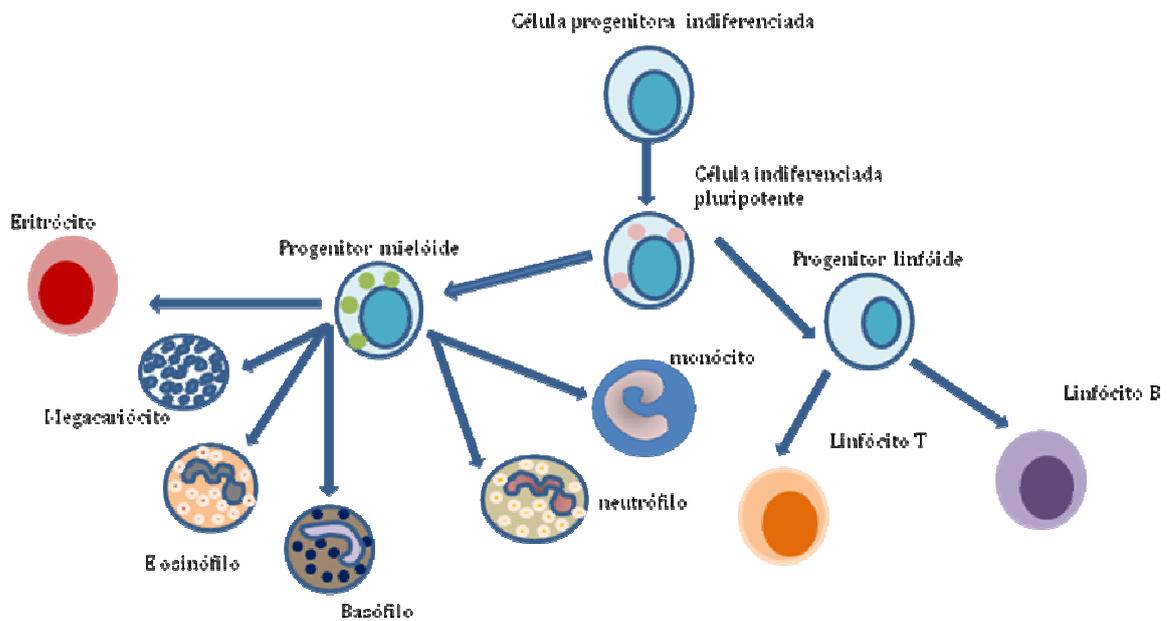


Figura 1.1: Hematopoiese, processo de formação celular.

As células que compõem o sistema imune estão localizadas principalmente, nos chamados órgãos linfóides, que podem ser divididos em órgãos linfóides primários e órgãos linfóides secundários ou periféricos. Os primários consistem dos órgãos geradores de linfócitos, onde ocorrem o desenvolvimento e a maturação dessas células, sendo eles o timo e a medula óssea.

A medula óssea, além de responsável pela origem dos diferentes tipos celulares que compõem o sangue, também é o órgão no qual ocorre o desenvolvimento completo dos linfócitos B. Aliás, a terminologia utilizada para denominar estas células vem de *Bursa de Fabricius*, órgão linfóide primário das aves, produtor dos linfócitos B, cujo correspondente nos mamíferos é a medula óssea (do inglês *bone marrow*). Para os linfócitos T, o processo de desenvolvimento ocorre no timo. Células oriundas da medula óssea, já pré-comprometidas com a linhagem T, migram para o timo, onde são submetidas a uma cascata de eventos, ao nível do genoma celular, que permitirão a produção de um número extraordinário de células capazes de, posteriormente, reconhecer e reagir a um número imenso de determinantes antigênicos, formando o repertório T. O mesmo ocorre para os linfócitos B na medula. Uma vez completada sua maturação celular, os dois tipos de linfócitos entram na corrente sanguínea e migram para os órgãos linfóides periféricos, entre os quais circulam, e re-circulam, desses órgãos para o sangue.

Os órgãos linfóides periféricos ou secundários são compostos pelos linfonodos ou gânglios linfáticos, que coletam antígenos dos sítios de entrada nos tecidos, pelo baço, que coleta antígenos do sangue, e pelos tecidos linfóides associados às mucosas, como as

amígdalas, placas de Peyer e apêndice, associados à mucosa do intestino, que recolhem antígenos das superfícies epiteliais do corpo.

Portanto, estes são os locais onde ocorre a ativação dos linfócitos após serem estimulados pelos antígenos e, conseqüentemente, onde tem início a resposta imune adaptativa, fornecendo sinais que sustentam a circulação dos linfócitos e a proliferação destas células. Os tecidos linfóides secundários são também os locais para onde os antígenos são encaminhados, por meio de macrófagos e células dendríticas especializadas. Após serem fagocitados por estas células, em seus locais de origem ou de entrada no organismo, os antígenos são direcionados ao tecido linfóide mais próximo, através da migração celular, pelos vasos linfáticos. Durante este percurso, os antígenos são processados no interior destas células fagocíticas e os fragmentos são expostos em sua superfície. Já no linfóide secundário, estes fragmentos são, então, apresentados aos linfócitos que também estão presentes neste local, desencadeando todo o processo de resposta imunológica.

Os linfócitos T e B que se diferenciaram no timo e na medula, mas que ainda não tiveram contato com o antígeno, são chamados de linfócitos virgens ou *naive*. Estes circulam do sangue para os tecidos linfóides periféricos continuamente, por meio de interações adesivas, e retornam ao sangue através de vasos linfáticos ou, no caso do baço, diretamente ao sangue. No caso de uma infecção, os antígenos capturados pelas células dendríticas são apresentados para os linfócitos T que estão re-circulando e que são capazes de reconhecer o agente infeccioso. Neste caso, estas células ficam retidas nos tecidos linfóides onde se diferenciam e proliferam como células efetoras, capazes de combater a infecção. As células B, após encontrarem o antígeno de sua especificidade, também são retidas e passam por um processo de proliferação e diferenciação em células secretoras de anticorpos, que deixam os linfonodos.

1.3 Imunidade Inata

A imunidade inata ou natural é a primeira linha de defesa contra os microorganismos invasores, que impede, controla ou até mesmo elimina algum tipo de infecção do hospedeiro. Todos os mecanismos da resposta imune inata têm início antes do desenvolvimento das respostas imunológicas adquiridas. O sistema imune inato é composto por barreiras naturais do organismo, tais como as superfícies epiteliais (barreiras físicas) e suas substâncias antibacterianas (barreiras químicas), por células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) e células NK com atividade citotóxica, além de proteínas do sangue, incluindo algumas do sistema complemento e outras denominadas citocinas, que regulam várias

atividades das células do sistema imune inato. Quando um microorganismo invade algum tecido ele é imediatamente reconhecido por estas células, que os identifica como não próprio. Apesar de não possuir “memória” nem especificidade, como o sistema imune adquirido, o sistema inato é capaz de distinguir o próprio do não próprio. Embora esses dois braços do sistema imune possuam diferentes mecanismos de ação, eles estão inteiramente conectados, ou seja, componentes de um sistema influenciam o outro e vice-versa.

Quando um microorganismo como, por exemplo, uma bactéria, penetra a superfície epitelial do corpo pela primeira vez, ele é rapidamente identificado como não próprio por células e moléculas, podendo desencadear rapidamente uma resposta imune inata. O sistema imune inato utiliza receptores capazes de reconhecer determinadas estruturas associadas aos patógenos, e por isso, são chamados de Receptores de Reconhecimento Padrão (RRPs). Dentre os RRP, destacam-se os receptores do tipo *toll*, presentes na superfície de macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, entre outros. As estruturas reconhecidas pelos RRP e comumente encontradas na superfície de microorganismos, como lipopolissacarídeos (LPS), resíduos de manose e ácidos teicóicos, DNA não-metilado, RNA de fita dupla, entre muitos outros, consistem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), os quais não são encontrados nos organismos superiores como os mamíferos e, por isto, identificados como não próprios pelo sistema inato.

Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos efetores da imunidade inata (Figura 1.2). As proteínas do sistema complemento depositam-se na superfície dos microorganismos e promovem sua destruição, além de também marcá-los (opsonização) para que sejam reconhecidos pelos fagócitos, em especial os macrófagos e neutrófilos, que os fagocitam e os destroem. A função efetora dos macrófagos é muito importante para o sucesso da resposta imune inata, pois além da produção de substâncias microbidas e mediadores inflamatórios, promove também a ativação das células NK e induz a migração de células leucocitárias para o sítio inflamatório, desencadeando nesses locais os mecanismos da imunidade adaptativa. Isto porque os macrófagos também agem como células apresentadoras de antígenos (APCs), ao expressarem em sua superfície, associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, fragmentos do antígeno, que são apresentados às células T CD4+.

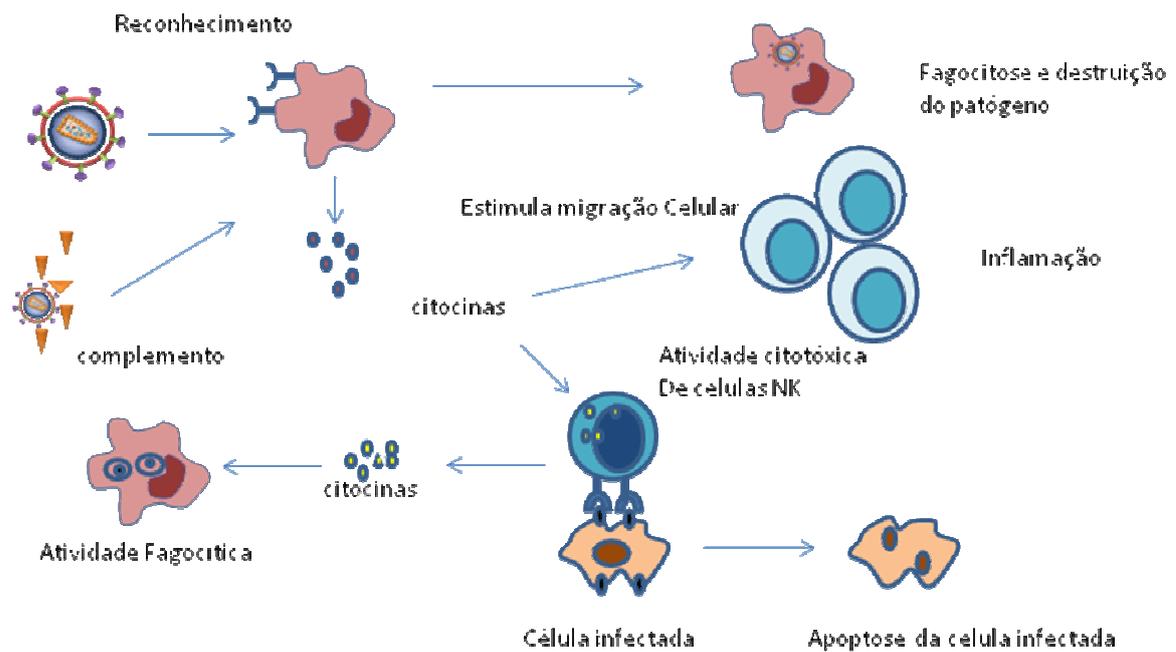


Figura 1.2: Resposta imune inata: componentes e vias efetoras de defesa contra microrganismos invasores.

Portanto, as moléculas produzidas durante a resposta imune inata estimulam a imunidade adquirida e influenciam na natureza das respostas imunológicas, evidenciando que ambas as respostas agem em conjunto e contribuem para o equilíbrio homeostático do metabolismo do nosso organismo.

1.4 Imunidade Adaptativa

Quando os microrganismos conseguem escapar aos mecanismos da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa se faz necessária, pois esta tem como uma de suas principais características a especificidade, o que torna a resposta imune mais eficaz.

A principal diferença da resposta imune adaptativa para inata é o reconhecimento do antígeno de modo extremamente específico, sendo, por isso, também chamada de imunidade específica. Na imunidade adaptativa, diferentes fragmentos de um mesmo antígeno, os chamados epítopos ou determinantes antigênicos, são individualmente reconhecidos pelas células efetoras da resposta imune, os linfócitos T e os linfócitos B. Esta capacidade de reconhecer especificamente milhares de antígenos diferentes ocorre em função da alta diversidade do repertório de linfócitos, que possuem receptores em suas membranas capazes de reconhecer mínimas diferenças nos antígenos.

A resposta específica demora alguns dias para ocorrer, diferentemente da resposta imune inata, cujos mecanismos efetores podem ser observados algumas horas após a

exposição ao antígeno (Figura 1.3). Outra característica importante do sistema imune adquirido é a chamada “memória imunológica”, no qual uma vez exposto repetidamente a um determinado antígeno, as células o reconhecem e agem de forma mais rápida e mais eficiente contra ele, que no primeiro contato. Este sistema também tem tolerância a antígenos próprios assim como o sistema imune inato, prevenindo a ocorrência de doenças auto-imunes, embora estas possam ocorrer quando da falha dos processos imunes regulatórios. Os principais componentes do sistema imune adquirido são os linfócitos T e os anticorpos, responsáveis pela resposta celular e pela resposta humoral, respectivamente.

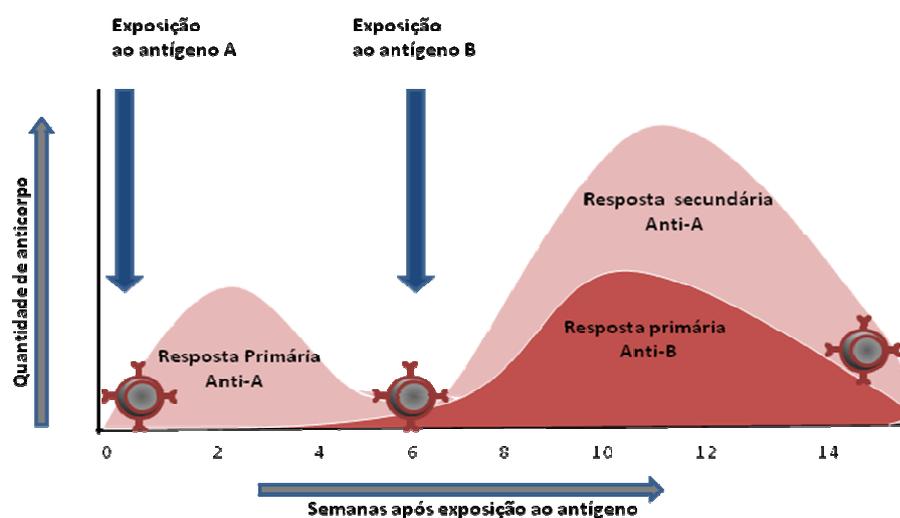


Figura 1.3: Resposta imune adquirida; especificidade (antígenos A e B induzindo a produção de diferentes anticorpos), memória (resposta secundária ao antígeno A mais rápida e de maior intensidade que a resposta primária) e autolimitação (os níveis de anticorpos diminuem ao longo do tempo).

Diferentes patógenos possuem ciclos de vida distintos e, portanto, são necessários diferentes mecanismos para assegurar não só a sua destruição e eliminação, mas também o seu reconhecimento pelo nosso organismo. Desta forma, no contexto do sistema imune adaptativo, existem dois diferentes tipos de receptores de antígenos: o receptor de antígeno das células B (BCR), cuja estrutura se assemelha à da imunoglobulina, presente na superfície dos linfócitos B, e o receptor de antígeno das células T (TCR), na superfície dos linfócitos T. As células B reconhecem apenas o antígeno presente no meio extracelular, como por exemplo, a maioria das bactérias, enquanto as células T são capazes de detectar tanto antígenos extracelulares como os intracelulares, como os vírus, embora todos necessitem ser previamente processados para que este reconhecimento aconteça.

As moléculas de imunoglobulinas (Igs) presentes no sangue são chamadas anticorpos, e estes são os mediadores da resposta imune humoral, que ocorre a partir dos linfócitos B, que produzem essas moléculas e as secretam em resposta a um estímulo

antigênico. Os anticorpos podem atuar como opsoninas, ativando o sistema complemento, que induz a lise do microorganismo, ou mesmo desencadeando o processo de fagocitose. A opsonização participa, então, dos mecanismos efetores da resposta imune humoral, sendo aqui, diferente da resposta imune inata, uma vez que, apesar de também marcar o antígeno para a fagocitose e ativar o sistema complemento, isto é feito de uma forma específica sobre o antígeno, com a participação da molécula de anticorpo. Além disso, a neutralização e a citotoxicidade celular dependente de anticorpo são os outros mecanismos efetores humorais (Figura 1.4).

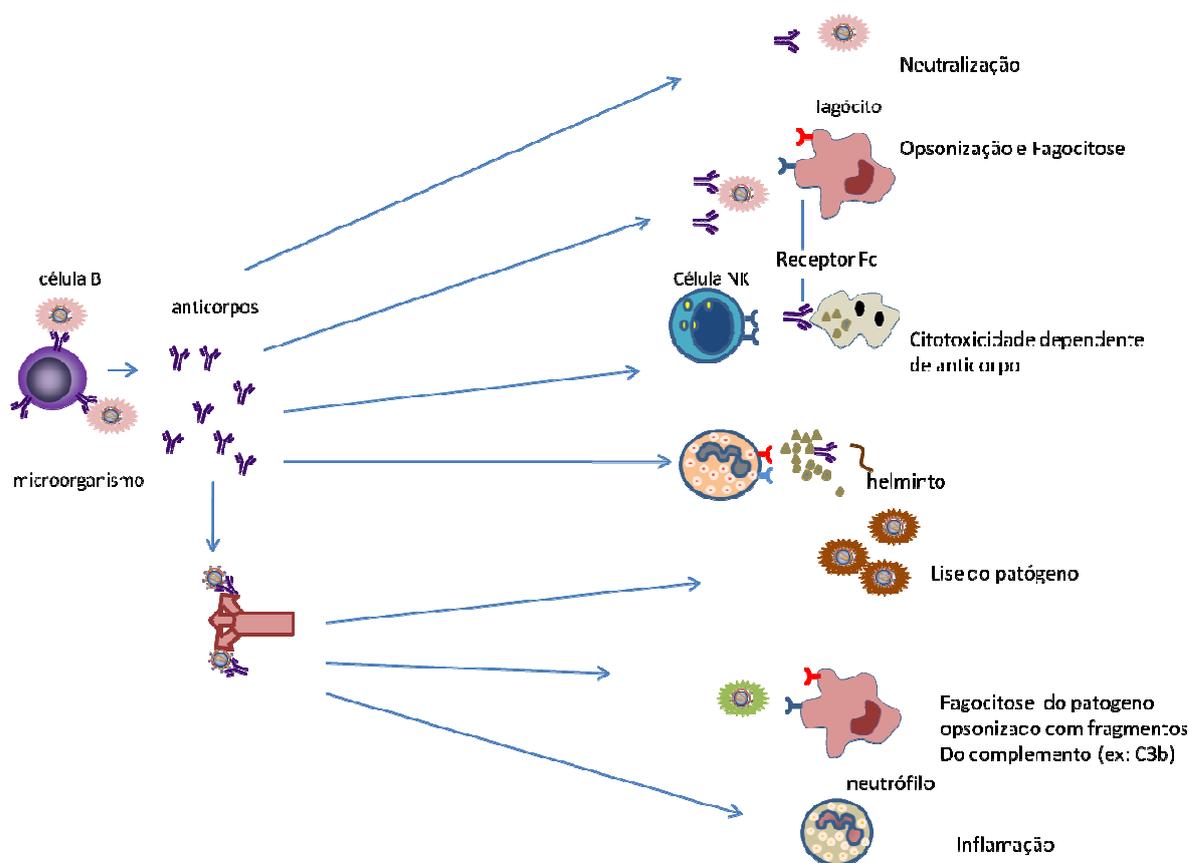


Figura 1.4: Mecanismos efetores da resposta imune humoral, mediados por anticorpos: neutralização dos agentes infecciosos, opsonização para a fagocitose ou para a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e ativação do sistema complemento.

Os anticorpos são encontrados, mais especificamente, no plasma e nos fluidos extracelulares. São moléculas em forma de Y, cujos “braços” (a região Fab) são compostos por duas cadeias leves e pela porção variável das cadeias pesadas (Figura 1.5). Essa porção da molécula é responsável pelo reconhecimento e pela ligação ao antígeno, sendo, então, altamente variável, o que garante especificidade, característica necessária ao reconhecimento do antígeno. A parte do “tronco” do Y é denominada região Fc, a qual define a classe do anticorpo e suas propriedades funcionais, sendo composta pela porção

constante das cadeias pesadas. Esta região interage com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, sendo responsável por definir as funções biológicas dos anticorpos. Existem cinco diferentes isotipos de Igs: IgA, IgG, IgE, IgD e IgM, cada uma capaz de ativar mecanismos efetores distintos para a eliminação do antígeno.

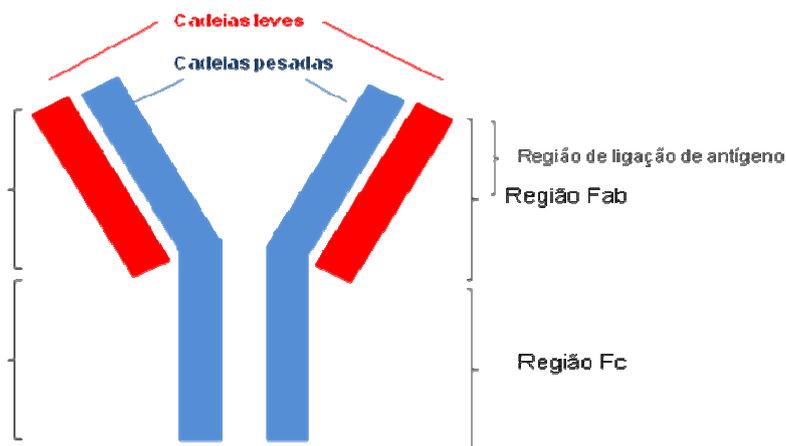


Figura 1.5: Estrutura molecular da imunoglobulina: formada por cadeias leves e pesadas, as quais apresentam porções variáveis, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, localizadas na região Fab. As porções constantes das cadeias pesadas constituem a região Fc, a qual interage com as células efetoras, definindo as diferentes funções biológicas dos anticorpos.

Durante a maturação na medula óssea, são produzidos linfócitos B com diferentes receptores de superfície, com diferentes especificidades e, por isso, capazes de responder a diferentes estímulos antigênicos na periferia. No entanto, todo linfócito B deixa a medula óssea carregando Igs, dos isotipos IgM e IgD, na forma dos BCRs, em sua superfície. O primeiro contato com o antígeno, na periferia, levará à produção de Igs da classe IgM, as quais formarão a primeira linha de defesa humoral. Então, em função da especificidade dos linfócitos B ativados e dos estímulos do microambiente criados em função dos estímulos antigênicos, ocorrerá nestas células a troca (*switch*) de classe ou isotipo funcional das moléculas de Igs produzidas, para IgG, na maioria das vezes, permitindo o desenvolvimento de um mecanismo efetor mais eficaz para eliminar o antígeno em questão.

Portanto, a resposta imune primária de anticorpos sempre é mediada por Igs da classe IgM, enquanto a IgG é a principal imunoglobulina produzida na resposta imune humoral secundária aos patógenos, a qual tem alta afinidade para neutralizar partículas virais, é a mais abundante no soro e a única Ig que atravessa a placenta. Devido a estas características, a IgG é o anticorpo mais utilizado como marcador em estudos de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Quando os patógenos estão no interior das células, os anticorpos não têm acesso a eles e, desta forma, a detecção destes microrganismos é tarefa dos linfócitos T,

responsáveis pelas respostas imunes mediadas por células, ou seja, a imunidade celular. As células T reconhecem os antígenos intracelulares através do seu receptor de membrana, o TCR, o qual também pertence à família de moléculas das imunoglobulinas, e que apenas interage com o antígeno exposto na membrana de uma APC, em associação com a molécula de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) (Figura 1.6). Portanto, todo antígeno, extra ou intracelular, precisa ser processado em pequenas sequências de aminoácidos, as quais são expostas nas superfícies das células em associação ao MHC, para que o linfócito T as reconheça e seja estimulado a responder ao antígeno: linfócitos T CD8⁺ reconhecem epítomos antigênicos no contexto do MHC de classe I e as células T CD4⁺ reconhecem estes epítomos no contexto do MHC de classe II. Deste processo também participam moléculas coestimulatórias, que auxiliam e são necessárias à ativação dos linfócitos T. Devido a esta característica, as células T só reconhecem antígenos associados à superfície celular e não respondem à antígenos solúveis ou “*in natura*”, como os linfócitos B. Os linfócitos T podem ser de dois tipos: os T auxiliares ou *helper* (Th), que expressam a molécula CD4 em sua superfície e os T citotóxicos (CTL), que expressam a molécula CD8. Estes marcadores fenotípicos, chamados CDs, são proteínas de membrana que identificam as diferentes populações linfocitárias, e sua distinção pode ser feita por citometria de fluxo, através de anticorpos monoclonais que se ligam a estas proteínas.

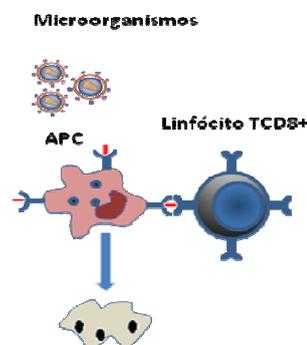


Figura 1.6: As células TCD8⁺ reconhecem peptídeos associados ao MHC de classe I e destroem células tumorais ou infectadas por vírus.

As células TCD8⁺ são capazes de reconhecer todas as células do organismo que se encontram infectadas por vírus, eliminando-as. Já as células TCD4⁺ respondem ao antígeno secretando citocinas e iniciando o processo inflamatório, ativando, assim, diversos tipos de células, entre elas os linfócitos B e os linfócitos T CD8⁺. Ao reconhecer o antígeno, apresentado através do MHC classe II na superfície de uma APC, os linfócitos TCD4⁺ são ativados e se expandem em vários clones, que se diferenciam para combater o antígeno. As células TCD4⁺ se diferenciam em 2 grupos distintos, um chamado Th1 e outro Th2, que nada mais são que grupos celulares que produzem citocinas distintas um do outro (Figura 1.7).

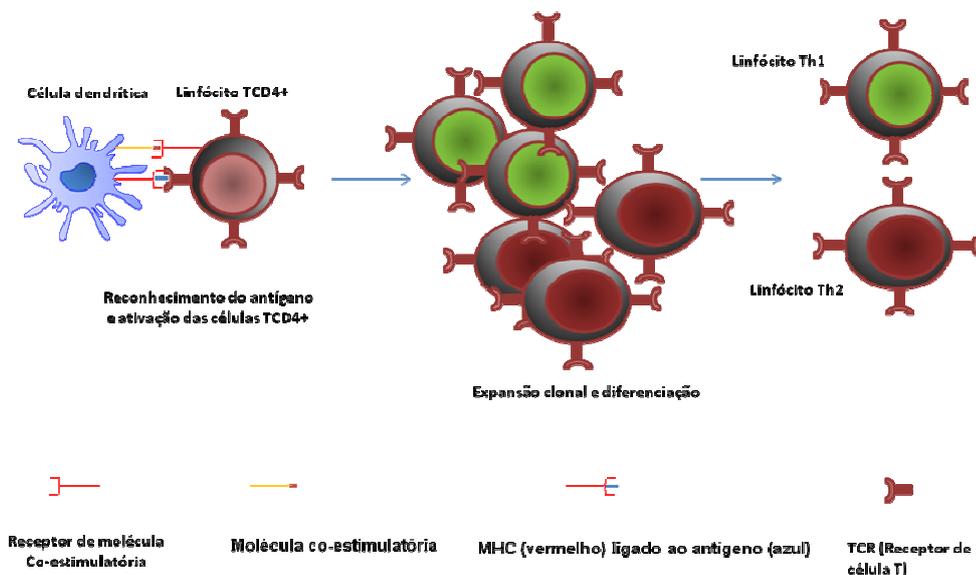


Figura 1.7: Diferenciação das células TCD4+ em subpopulações distintas (Th1 / Th2), em resposta ao antígeno, aos co-estimuladores e as citocinas presentes no microambiente.

Todas as respostas de células T CD4+, tanto Th1 como Th2, são muito importantes para a defesa do organismo. Porém, a resposta do tipo Th1 é mais específica contra microrganismos intracelulares, incluindo bactérias, protozoários e vírus, pois estimulam a ativação de células T CD8+ com função citotóxica, enquanto a Th2 é mais eficiente contra bactérias extracelulares e parasitas multicelulares, como os helmintos, por exemplo, pois também estimula a ativação de linfócitos B (Figura 1.8). A resposta tipo Th1 produz, principalmente, as seguintes citocinas: o fator de necrose tumoral (TNF), importante na ativação de neutrófilos e que, conseqüentemente, estimula o processo inflamatório, a interleucina-2 (IL-2) e o interferon-gama (IFN- γ), este último responsável pela ativação de macrófagos, necessária à destruição de microrganismos fagocitados, além de aumentar também a capacidade fagocítica destas células. Já os linfócitos Th2 secretam IL-4, que estimula a produção de IgE e que se liga a mastócitos, IL-5, que ativa eosinófilos, células com papel importante na resposta contra infecções helmínticas, e IL-10 e IL-13, que por sua vez, ativam linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos, as células produtoras dos anticorpos. Ambos os perfis Th1 e Th2 promovem respostas antagônicas, que modulam uma a outra, fazendo com que a resposta imune se estabeleça de forma balanceada.

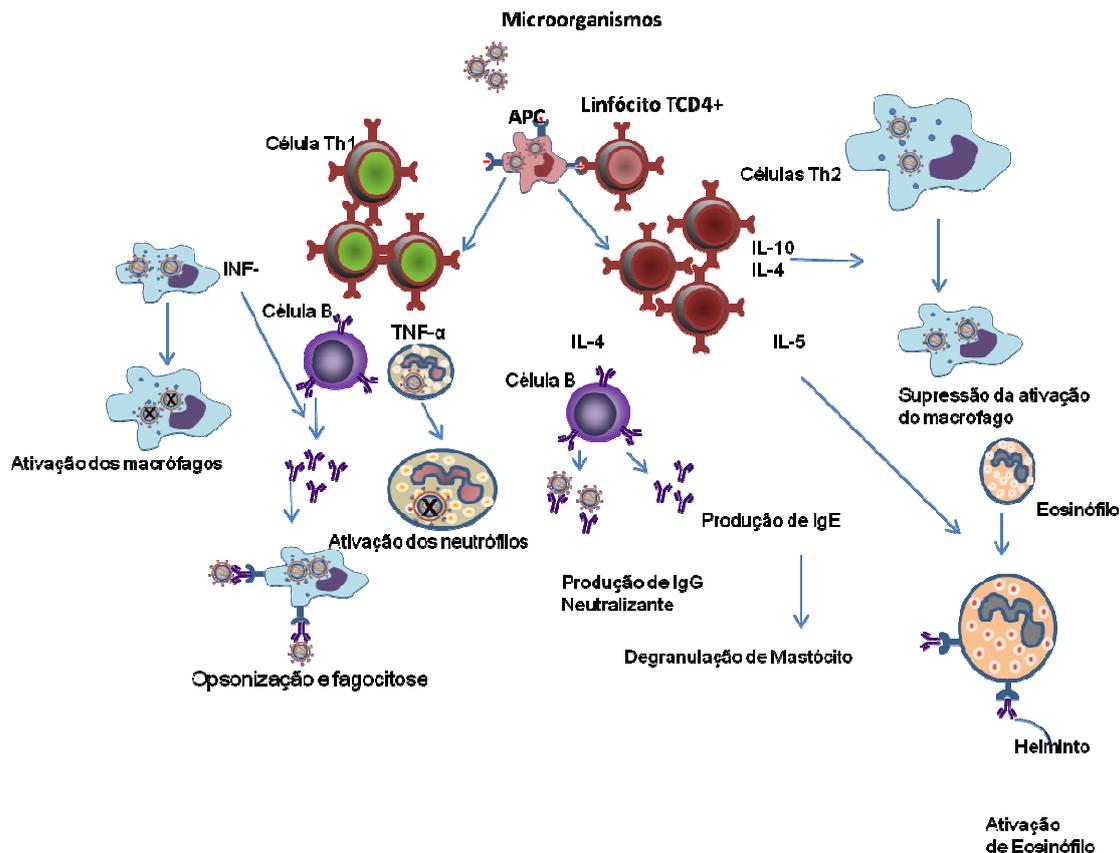


Figura 1.8: Funções das células Th1 e Th2, que produzem diferentes tipos de citocinas, e desencadeiam, assim, diferentes tipos de resposta imune. As Th1 ativam resposta contra microrganismos intracelulares, enquanto a resposta do tipo Th2 age em resposta a patógenos extracelulares.

Os mecanismos de defesa do sistema imune inato possuem receptores invariáveis, que reconhecem características comuns aos agentes patogênicos, mecanismos estes de suma importância, mas que são muitas vezes superados por vários patógenos, além de não possuem memória imunológica contra os agentes infecciosos já encontrados anteriormente. Portanto, outra característica fundamental do sistema imune adaptativo é a memória imunológica, que permite o reconhecimento específico e rápido de patógenos em casos de reinfecções, proporcionando uma proteção aumentada, mais eficiente e que se desenvolve mais rapidamente (Figura 1.3). É nesta propriedade da resposta imune adaptativa que se baseia o princípio das vacinas. Os receptores de antígeno específicos dos linfócitos são resultado da recombinação aleatória de segmentos gênicos variáveis e pelo pareamento de cadeias com diferentes porções variáveis. Este processo produz linfócitos com receptores distintos, de modo que o repertório total dos receptores seja capazes de reconhecer todo e qualquer antígeno. Através de um processo de seleção, se o receptor do linfócito for específico a uma molécula própria, ele será eliminado, ou seja, esta célula será morta, garantindo a tolerância ao próprio. Desta forma, todos os sinais recebidos pelo receptor durante a sua maturação fará com que todo o repertório selecionado seja funcional, num

processo chamado seleção clonal. Isto ocorre nos locais de desenvolvimento dos linfócitos, ou seja, no timo e na medula óssea, o que permitirá a saída para a periferia apenas de células não reativas ao próprio, embora algum escape possa ocorrer.

Quando um linfócito recirculante encontra o seu antígeno e o reconhece de modo específico, em um órgão linfóide periférico, ele é induzido a proliferar. Uns se diferenciam em células efetoras, que participam da destruição do antígeno, podendo eliminá-lo totalmente, sendo o caso dos linfócitos T efetores e dos plasmócitos secretores de anticorpos. Outros se diferenciam em linfócitos de memória, ou seja, nas células que irão reconhecer o mesmo antígeno contra o qual foram produzidas, e desencadear uma resposta rápida a este mesmo agente num próximo contato. Desta forma, o processo de proliferação dos linfócitos específicos é chamado expansão clonal, que ocorre nos tecidos de drenagem, onde os linfócitos *naïve* e as células apresentadoras de antígeno se encontram. Após esta expansão clonal e diferenciação celular, os linfócitos migram dos tecidos linfóides para a corrente sanguínea, onde estarão aptos para combater o foco da infecção e/ou reagir à reinfecções recorrentes.

1.5 Produção de Anticorpos Monoclonais

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

A utilização de anticorpos na terapia de doenças e na pesquisa foi revolucionada com a descoberta, em 1975, dos anticorpos monoclonais, por Köhler e Milstein, que descreveram a técnica de produção dos anticorpos monoclonais através da fusão de células e carcinoma e linfócitos B. Esta descoberta lhes concedeu o prêmio Nobel, juntamente com Niels K. Jerne, em 1984, pelas teorias sobre a especificidade no desenvolvimento e controle do sistema imunológico, e a descoberta do princípio para a produção de anticorpos monoclonais. Esta técnica, denominada hibridoma, consiste na produção de anticorpos que reconhece apenas um epítipo antigênico e, por isso, chamado anticorpo monoclonal, que é produzido e secretado por um único clone de linfócito B. Para a produção destes anticorpos comercialmente, utilizam-se células B de camundongos estimulados com um antígeno de interesse. Os anticorpos formados são chamados murinos, devido à sua origem em

camundongos. Estes anticorpos quando usados continuamente em terapias para humanos, podem gerar uma reação imune contra o próprio anticorpo. Em função desta problemática, técnicas modernas de engenharia genética foram desenvolvidas, as quais permitem a humanização destes anticorpos, isto é, que os genes responsáveis por estas proteínas sejam modificados de forma a evitar essa reação imunológica no organismo humano. Assim são gerados os chamados anticorpos monoclonais humanizados. O processo de humanização não deve alterar a afinidade do anticorpo com o respectivo antígeno, mas sim sua porção isotópica, possibilitando, assim, o seu emprego continuado em procedimentos terapêuticos.

Nos ensaios para a produção destes anticorpos monoclonais, os camundongos estimulados com um antígeno X produzem células B esplênicas, que são retiradas e cultivadas em presença de células de mieloma, em meio HAT, contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (Figura 1.9). Este meio bloqueia as vias normais de biossíntese de nucleotídeos e, desta forma, as células normais utilizam a via alternativa e as células tumorais, que não possuem esta via, morrem. Desta forma, somente as células tumorais fundidas às células B que reagem ao antígeno específico conseguem sobreviver e crescer neste meio de cultura. Os sobrenadantes contendo hibridomas são colhidos e submetidos a ensaios de imunodeteção de anticorpos. As células que reagem ao antígeno X utilizado são clonadas, e estes clones expandidos em escala industrial para produção de anticorpos monoclonais específicos. Estes anticorpos são utilizados na pesquisa básica e em aplicações terapêuticas como a identificação de marcadores fenotípicos únicos para determinados tipos celulares e, também, na definição de moléculas típicas de cada células; na análise funcional de superfícies celulares e moléculas secretadas. Outras aplicações são em diagnósticos de doenças infecciosas e degenerativas, através da circulação de anticorpos específicos e diagnóstico de tumores, onde anticorpos monoclonais específicos para cada tumor são utilizados para sua detecção.

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

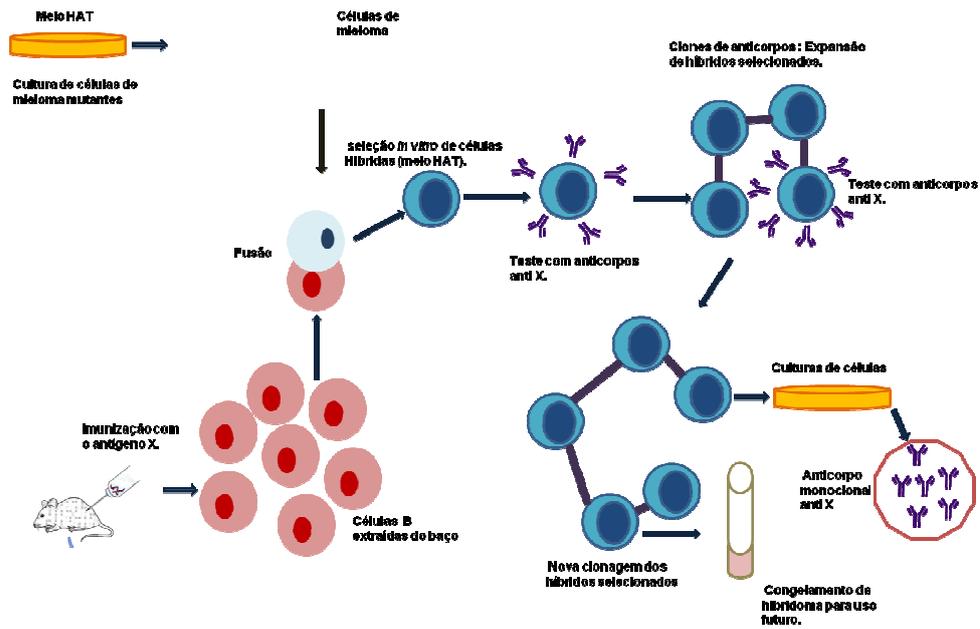


Figura 1.9: Produção de anticorpos monoclonais, a partir de culturas de hibridomas, constituídas por linfócitos B antígeno-específicos e células tumorais.

CAPÍTULO 2. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Raquel Ferraz

2.1 Conceitos Básicos

A citometria de fluxo é uma metodologia utilizada para o estudo morfológico, fenotípico e funcional de células através da detecção da dispersão da luz e da fluorescência emitida por moléculas (fluorocromos) ligadas às mesmas. Esta ferramenta é utilizada principalmente na área na imunologia, sendo aplicada em estudos de avaliação funcional e diferenciação de populações celulares; conteúdo de DNA e RNA; atividades enzimáticas; apoptose; produção de íons; citotoxicidade; modulação de receptores; distribuição populacional; produção de citocinas, entre outros.

A molécula ou função de interesse a ser avaliada deve ser marcada com anticorpos monoclonais (AcMo) acoplados à fluorocromos ou com fluorocromos que possuam a propriedade biológica de interesse. Assim, quando as amostras marcadas são adquiridas em citômetro de fluxo, estes fluorocromos são excitados por uma radiação *laser*, que intercepta cada célula, e emitem um comprimento de onda (cor) que é detectado por um sensor, chamado de tubo fotomultiplicador (*photomultipliers tubes* - PMTs). Quanto maior o número de sensores em um citômetro, maior o número de cores (e de moléculas de interesse) que se pode avaliar. Estes sensores são capazes de converter a luz captada em sinais eletrônicos, os quais são enviados ao computador, possibilitando, através de *software* específico, uma análise multiparamétrica dos resultados. Esta análise é realizada através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respectivas características morfológicas das células.

Os citômetros de fluxo são resultado da união entre uma variedade de ferramentas e a aplicação de técnicas desenvolvidas na área da computação; da biotecnologia (produção de anticorpos monoclonais e de fluorocromos); da tecnologia dos raios *laser*; e da eletrônica, o que possibilitou a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (humano, de animais, protozoários, fungos, ou bactérias). Os equipamentos são compostos por um ou mais *lasers* (fonte de luz)^a, que excitam os fluorocromos; um sistema contínuo de fluxo hidrodinâmico de solução salina^b, que transporta as células da amostra; uma câmara de fluxo (*flow cell*)^c, cuja estrutura força as células a passarem uma atrás da outra, para que cada uma seja individualmente interceptada pelo *laser* no foco hidrodinâmico^d; um sistema ótico, constituído por filtros^e; fotossensores^f que captam a luz dispersada pelo *laser* e pelo(s) fluorocromo(s), os quais são convertidos em pulsos eletrônicos^g; e um computador^h, onde os resultados são analisados (Figura 2.1).

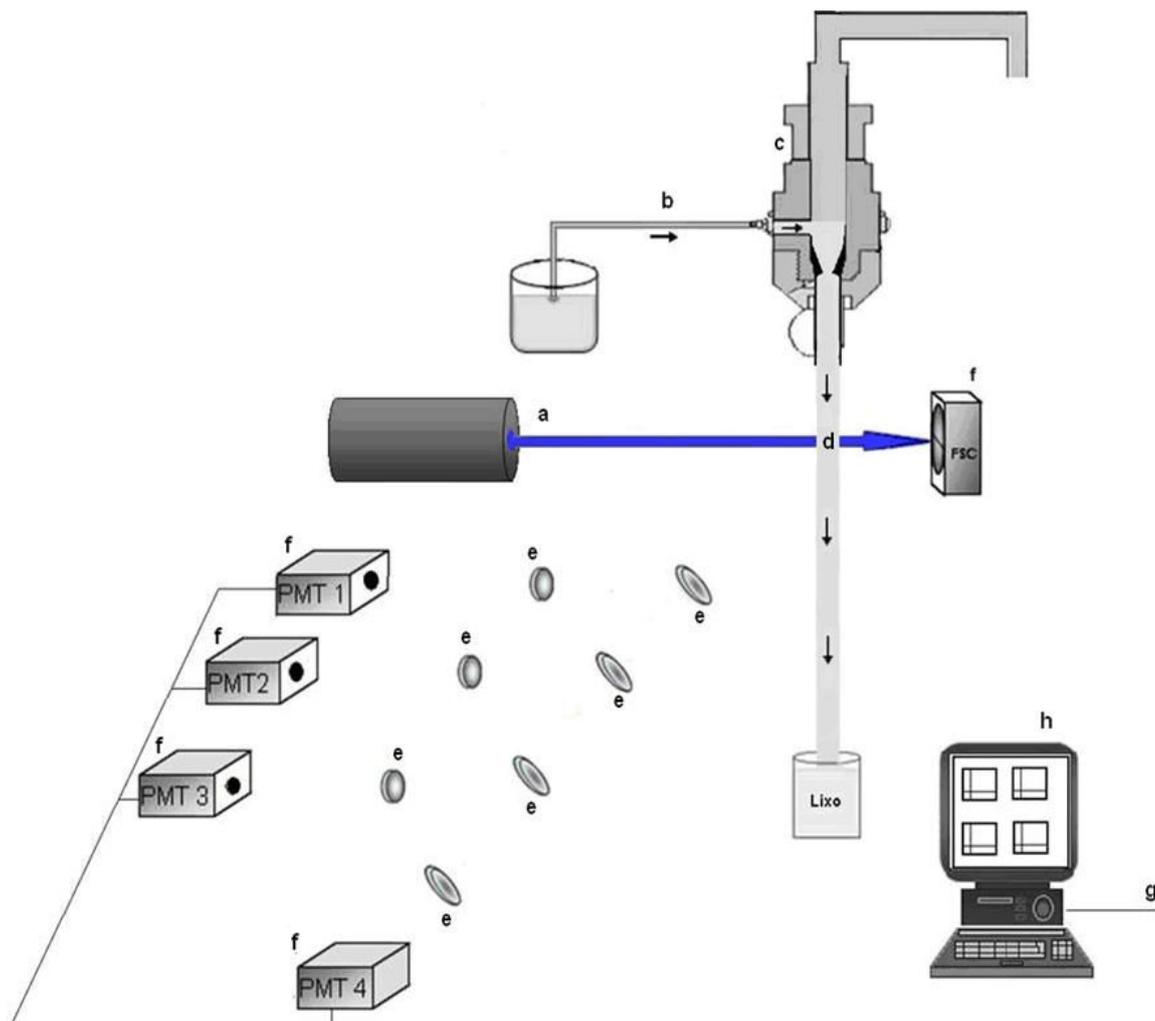


Figura 2.1: Representação gráfica da estrutura de um citômetro de fluxo. (a) *laser* azul (argônio); (b) solução salina, responsável pelo fluxo hidrodinâmico; (c) *flow cell* (Câmara de fluxo); (d) foco hidrodinâmico; (e) filtros para captação da luz emitida; (f) fotomultiplicadores; sinais eletrônicos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

2.2 Fluorocromos

A identificação de moléculas na superfície ou no interior das células, através da utilização de AcMo conjugados à fluorocromo ou substâncias fluorescentes, ambos capazes de emitir cor, é a base para os protocolos citofluorimétricos. Os fluorocromos são moléculas fluorescentes, que estão inicialmente em repouso, e que são excitados por uma determinada fonte luminosa (*laser*), emitindo uma luz de comprimento de onda (cor) característica (Figura 2.2). Quando utilizados em protocolos citofluorimétricos, o fluorocromo acoplado a cada AcMo é excitado quando esta célula (que tem afinidade por aquele AcMo) é interceptada pela luz do *laser*.

A maioria dos fluorocromos é excitada por um *laser* argônio (comprimento de onda de 488 nm - azul), presente em **todos** os citômetros de fluxo. Alguns fluorocromos são

excitados por outro comprimento de onda, e por isto, alguns citômetros são configurados com mais de um *laser*, p.ex.:

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

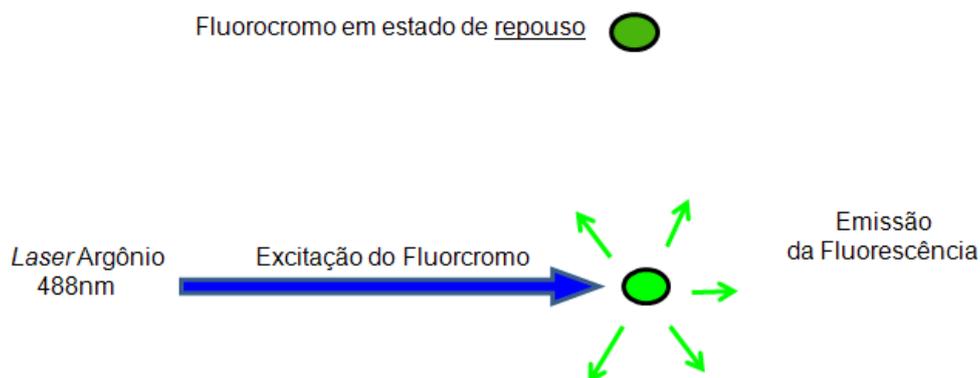


Figura 2.2: Fluorocromo em estado de repouso e emitindo fluorescência após ser excitado pela luz do *laser*.

Os fluorocromos são geralmente acoplados a anticorpos com afinidade por determinada estrutura química das células e biologicamente significativas, as quais podem caracterizar um tipo celular, um evento bioquímico ou um tipo de resposta imunológica. O cluster (agrupamento) de diferenciação (cluster de designação), abreviado como CD, é uma nomenclatura mundialmente utilizada para a identificação e investigação de moléculas de superfície celular presente nos leucócitos pode ser utilizado para identificar as populações celulares (exemplo: CD3 – linfócitos; CD19 - linfócitos B; CD45 – leucócitos; CD14 – monócitos, macrófagos e células dendríticas; CD56 – células *Natural Killer*) e características funcionais (CD69 – célula ativada; CD45RO – célula de memória; CD95 – receptor de morte celular (Fas); CD107a – degranulação). Essas moléculas caracterizam populações celulares ou eventos biológicos como diferenciação, proliferação, ativação, migração e morte celular e podem agir de várias maneiras, muitas vezes atuando como receptores ou ligantes (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Exemplos de algumas moléculas CD		
CD	Principais células que expressam	Nomes comuns/Funções conhecidas ou propostas
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 iCb3
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 naive; liga-se a CD80 e CD86
CD34	Precursosores de células hematopoiéticas, células endoteliais em vênulas altas	Adesão célula-célula; ligação ao CD62L (L-selectina)
CD44	Leucócitos, eritrócitos	Liga-se ao ácido hialurônico, medeia adesão de leucócitos a células endoteliais
CD45	Células hematopoiéticas	Tirosina fosfatase importante no processo de sinalização mediada pelo receptor de antígenos de linfócitos T e B
CD45RA	Linfócitos T naive, linfócitos B, monócitos	Isoforma de CD45. Ver CD45
CD45RO	Linfócitos T de memória, subconjunto de linfócitos B, monócitos e macrófagos	Isoforma de CD45. Ver 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 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)

Por exemplo, o receptor de superfície CD3 está presente na membrana de todos os linfócitos T, e se utilizarmos um anticorpo anti-CD3 acoplado a um fluorocromo, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) (488 nm de excitação e 525 nm de emissão - verde), todo linfócito T da amostra estará ligado ao AcMo anti-CD3 (Figura 2.3) e, ao ser interceptado pelo *laser*, o fluorocromo (FITC) acoplado a este AcMo será excitado e a emissão da sua fluorescência (525nm) será captada pelo PMT, através do direcionamento desta luz por filtros específicos para este comprimento de onda (cor), indicando que aquela célula está ligada ao AcMo anti-CD3 acoplado ao FITC.

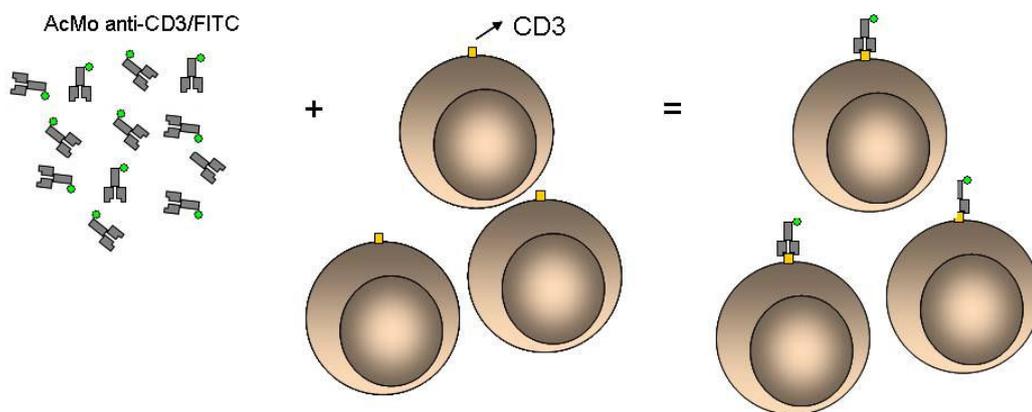


Figura 2.3: Esquema representativo da marcação de linfócitos T com AcMo anti-CD3 acoplado com o fluorocromo FITC.

Os AcMo acoplados a fluorocromo estão comercialmente disponíveis no mercado por empresas especializadas como, a Beckman Coulter, Becton & Dickinson, Dako, entre outras. A combinação AcMo-fluorocromo deve ser escolhida de acordo com as moléculas que se deseja avaliar e a cor que o fluorocromo vai emitir. Vale lembrar que para a escolha do fluorocromo é fundamental conhecer a configuração dos citômetros em relação aos filtros e número de PMTs, que se pretende utilizar para aquisição das amostras. Assim, se um citômetro tem três PMTs, sabemos que poderemos escolher uma combinação de três monoclonais, cada um acoplado a um fluorocromo de cor diferente. Os fluorocromos utilizados na citometria de Fluxo podem ser simples ou compostos (*Tandem Dyes*) e alguns destes estão descritos na Tabela 2.2 com seus respectivos pico de excitação, pico máximo de emissão, e *laser* de excitação.

Conhecendo as propriedades de excitação e de emissão de cada fluorocromo é possível escolher combinações de anticorpos monoclonais a serem usadas em conjunto, de forma que diferentes moléculas de interesse podem ser avaliadas em uma mesma célula. Por exemplo: anti-CD4/FITC, anti-CD8/PE, anti-CD3/PercP em um citômetro que tenha PMTs capazes de captar (dependendo da propriedade dos filtros) comprimentos de onda de 525 nm, 578 nm, 667 nm, respectivamente.

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

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

Fluorocromo	Pico Excitação (nm)	Pico Emissão (nm)	Laser (nm)
Simplex			
Alexa Fluor® 405	401	421 	405, 407
Cascade Blue	395	420 	334 -364, 351 – 356, 405, 407
Cascade Yellow	400	550 	405 - 407
Pacific Blue	405	455 	405, 407
Alexa Fluor® 430	433	541 	405, 407
PerCP	490	670 	488
FITC	495	525 	488
Alexa Fluor® 488	495	519 	488
Alexa Fluor® 532	532	555 	514
Ficoeritrina (PE)	562	575 	488, 514, 568
Texas Red	595	615 	568
Alexa Fluor® 633	630	650 	633, 635, 647
Alexa Fluor® 647	647	670 	633, 635, 647
Allophycocyanin (APC)	650	660 	633, 635, 647
Cy5	650	665 	633, 635, 647
Alexa Fluor®660	660	690 	633, 635, 647
Cy5.5	675	695 	633, 635, 647
Alexa Fluor® 680	680	700 	633, 635, 647
Alexa Fluor® 700	700	720 	633, 635, 647
Tandem			
PE-Texas Red	565	615 	488, 514
PE-Cy5	565	670 	488, 514
PE-Cy5.5	565	695 	488, 514
PE-Cy7	656	770 	488, 514
PE- Alexa Fluor® 610	496	627 	488
PE- Alexa Fluor® 647	496	667 	488
PE- Alexa Fluor® 680	496	702 	488
PE- Alexa Fluor® 700	496	723 	488
PE- Alexa Fluor® 750	496	779 	488
APC- Alexa Fluor® 750	650	779 	633, 635, 647
APC-Cy5.5	650	695 	633, 635, 647
APC-Cy7	650	785 	633, 635, 647
PerCP-Cy5.5	496	695 	488

APC – alofocianina; FITC – isotiocianato de fluoresceína; PE – Ficoeritrina; PerCP – complexo peridina-clorofil-proteína; RD-1 – rodamina; ® marca registrada; nm - nanômetros.

2.3 Preparação das amostras para aquisição em citômetro de fluxo

Para utilizar a citometria de fluxo como ferramenta de estudo, as amostras devem estar em uma suspensão e dois protocolos principais devem ser seguidos: um **protocolo de separação de células**; e outro **protocolo de marcação citofluorimétrica**. Seja esta amostra de sangue periférico, de cultura celular, de medula óssea, de tecido, ou de líquor, as células devem ser dissociadas de forma a evitar a formação de grumos na suspensão. Para o protocolo de marcação deve-se, primeiramente, escolher a(s) partícula(s) e ou molécula(s) celular(es) de interesse que irão receber a marcação específica com anticorpos monoclonais (AcMo) e/ou com algum fluorocromo. Por exemplo, se em uma amostra de sangue periférico, submetida primeiramente à lise de hemácias (protocolo de separação), se deseja avaliar o percentual de monócitos e de linfócitos T CD8⁺, deve-se utilizar uma combinação de AcMo anti- CD14 (que se liga à monócitos), AcMo anti-CD3 (específico para linfócitos T) e AcMo anti-CD8 (que se liga aos linfócitos T CD8⁺). Cada um destes três tipos de AcMo deve estar acoplado a um fluorocromo de cor diferente, como por exemplo o FITC, o PE e o PE-Cy5 (Figura 2.4). Para a escolha dos fluorocromos é necessário saber quais são as cores que podem ser 'lidas' no citômetro a ser utilizado, isto é, qual o(s) *laser*(s) que o equipamento possui e qual a configuração ótica do citômetro.

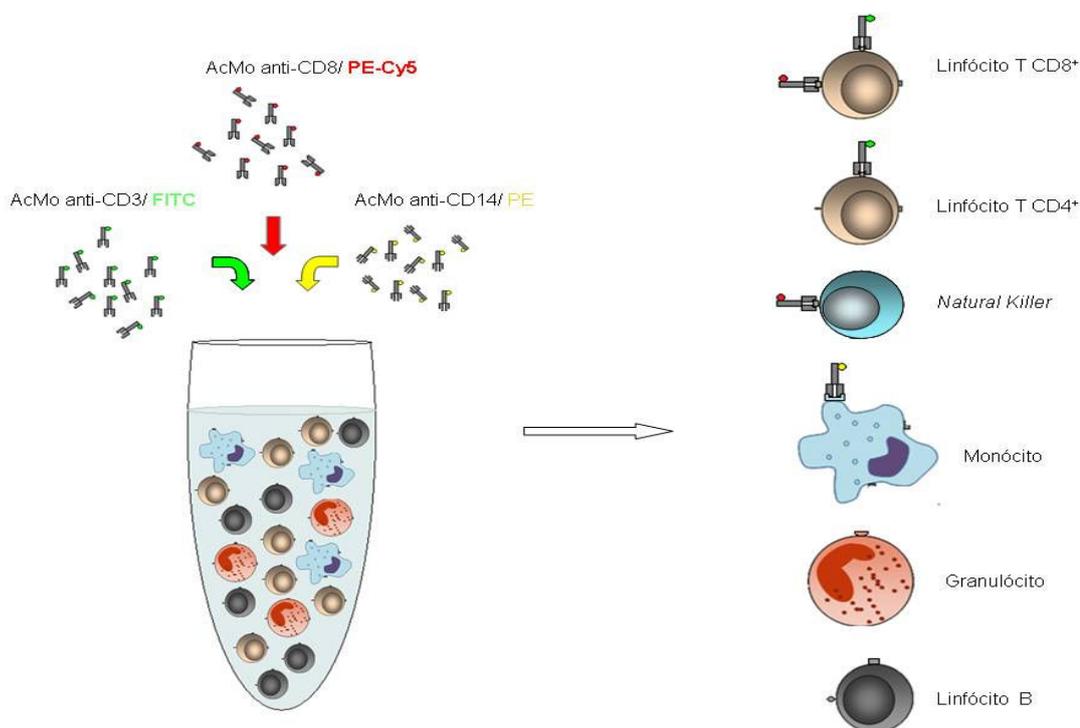


Figura 2.4: Suspensão de células (linfócitos, monócitos e granulócitos) submetida à marcação com AcMo (anticorpos monoclonais) anti-CD3/FITC, anti-CD14/PE e anti-CD8/PE-Cy5. Linfócitos T CD8⁺ marcados com anti-CD3/FITC e com anti-CD8/PE-Cy5; linfócitos T CD4⁺ marcados com anti-CD3/FITC; células *natural killer* marcadas com anti-CD8; monócitos marcados com anti-CD14/PE; granulócitos e linfócitos B não marcados.

2.4 Sistema ótico

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

2.4.1 Tipos de filtro

A propriedade dos filtros óticos em filtrar um determinado comprimento de onda permite que fluorescências de cores diferentes sejam direcionadas para um PMT. A disposição dos diferentes tipos de filtro (Figura 2.5) determina a configuração ótica do equipamento.

- Filtros Dicroicos: capazes de refletir um determinado comprimento de onda e deixar que outros comprimentos passem, ou seja, atravessem o filtro. Podem ser do tipo *long pass* (reflete um comprimento de onda e deixa passar comprimentos de onda maiores) e *short pass* (reflete um comprimento de onda e deixa passar comprimentos de onda menores). Isto é, um filtro dicroico *long pass* 525, reflete o comprimento de onda de 525nm (verde) (\pm variação em nm) e deixa passar (atravessar o filtro) os comprimentos de onda maiores que 525nm (amarelo, laranja, vermelho, roxo, etc).

- Filtros de Interferência: deixam passar um comprimento de onda específico e evitam que um comprimento de onda diferente daquele que se deseja detectar interfira. São chamados de *band pass*.

- Filtros de bloqueio: têm um poder maior de reflexão, não deixando passar nenhum comprimento de onda acima daquele que ele reflete. São chamados de *block filters*.

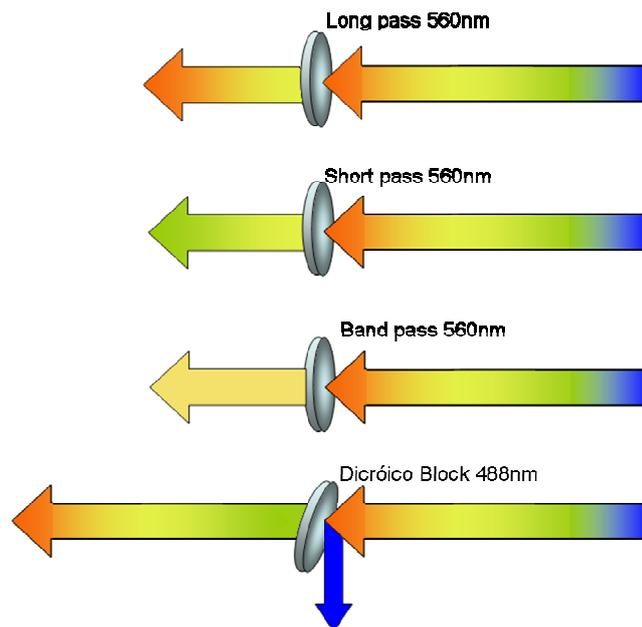


Figura 2.5: Tipos de filtros utilizados nos citômetros de fluxo. Filtros dicróicos - *Long pass*; *short pass*; de interferência (*band pass*); e filtro de bloqueio (*block*).

2.5 Princípios de Funcionamento

Após a preparação da amostra (marcação das células com anticorpos monoclonais), o tubo contendo a suspensão de células¹ é acoplado ao citômetro de fluxo e as células são, aos poucos, aspiradas por um sistema de pressão e levadas a câmara de fluxo². Além de ser preenchida pela solução salina (*sheat fluid*) esta câmara recebe então a suspensão de células³ as quais, por conta do formato cônico da câmara, seguem uma atrás da outra até o foco hidrodinâmico, onde cada uma delas é interceptada⁴ pelo *laser*. Este encontro resulta na refração da luz do *laser*⁵ e na emissão de fluorescência(s)⁶ de acordo com o(s) fluorocromo(s), acoplado ao AcMo, ligado em cada célula. A emissão de fluorescências de diferentes comprimentos de onda (cores) é direcionada para um PMT de acordo com uma combinação e disposição de filtros⁷. Após a captação das fluorescências, as mesmas são convertidas em sinal eletrônico, e a informação obtida de cada célula que é interceptada pelo *laser* é representada, através de *software* específico, em histogramas e/ou gráficos de pontos⁸ (*dot plot*) (Figura 2.6).

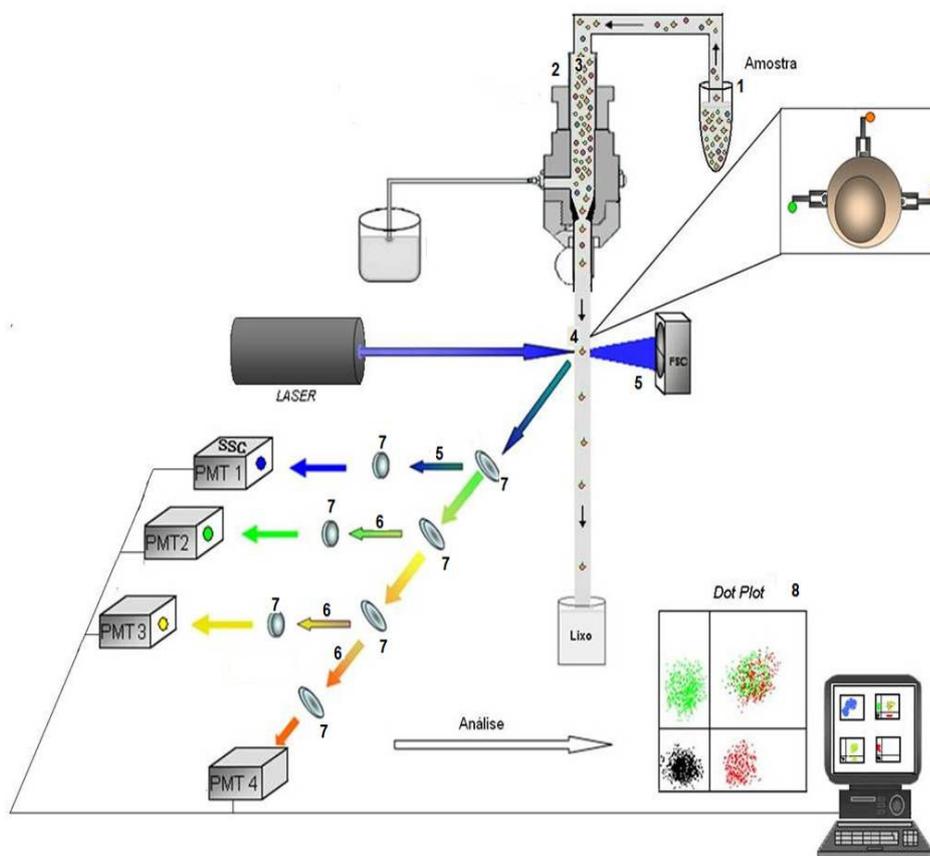


Figura 2.6: Esquema representativo do funcionamento do citômetro de fluxo. *Flow cell* – câmara de fluxo; *Sheat* – solução salina; FSC – *foward scatter* (dispersão frontal); SSC – *side scatter* (dispersão lateral); PMT – *photomultiplier* (fotomultiplicador); *dot plot* – gráfico de pontos.

Todas as células que passam na frente do *laser* geram uma informação eletrônica, avaliada graficamente. Sendo assim, as informações a respeito das células que são marcadas com os AcMo, e também daquelas que não foram marcadas, ou seja, que não possuem afinidade (receptor) para os AcMo utilizados, são analisadas através de gráficos monoparamétricos (Figura 2.7a) e/ou biparamétricos, os quais são divididos em quatro quadrantes (Figura 2.7b).

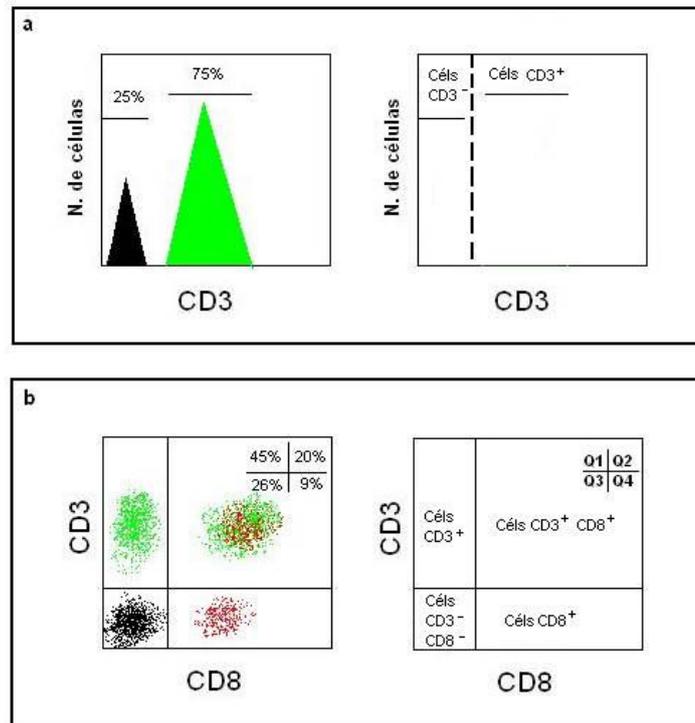


Figura 2.7: Gráficos de análise de resultados obtidos por citometria de fluxo. (a) gráfico monoparamétrico (CD3) com respectivo pico das células negativas para a marcação com os AcMo anti-CD3 (25%) e pico das células positivas para esta marcação (75% - linfócitos T); (b) gráfico biparamétrico (CD3 x CD8) dividido em quatro quadrantes (Q), nos quais se avalia o percentual das células positivas somente para o CD3 (Q1), células negativas para a marcação de CD3 e de CD8 (Q2 - duplo-negativas), células positivas para a marcação de CD3 e de CD8 (Q3 – duplo positivas), e células positivas somente para o CD8 (Q4).

Além de excitar os fluorocromos, a luz do *laser* argônio, ao interceptar a célula, é refratada e dispersada permitindo que propriedades físicas da célula, como tamanho e granularidade sejam avaliadas. A luz dispersada na mesma direção do *laser* (*forward scatter* - FSC) permite analisar o tamanho celular. Quanto maior for a partícula, maior será o ângulo de incidência da luz do *laser*, dispersada pela partícula, que atinge o fotossensor (Figura 2.8). Simultaneamente, a luz do *laser* refratada devido à granularidade celular, é captada por lentes que as direcionam lateralmente (90^0) para um PMT, assim como a luz emitida pelos fluorocromos, de acordo com a configuração ótica (filtros) do citômetro (Figura 2.9).

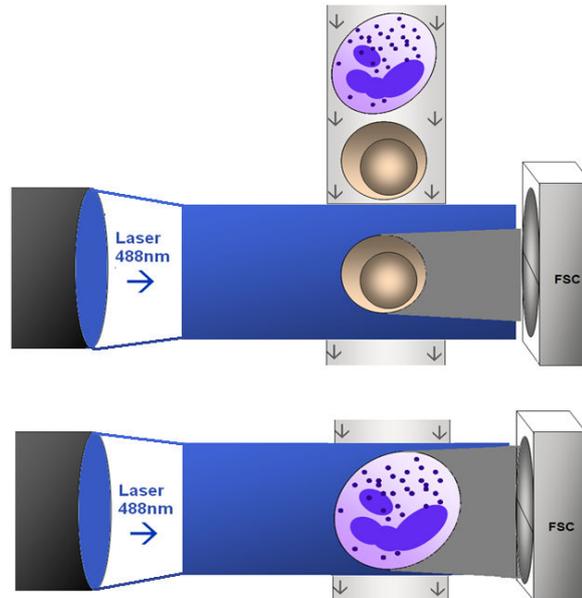


Figura 2.8: Avaliação do tamanho celular de acordo com a luz do *laser* refratada. Luz do *laser* interceptando as células que passam através da solução salina formando um ângulo de refração que é detectado pelo fotossensor. FSC - *forward scatter*.

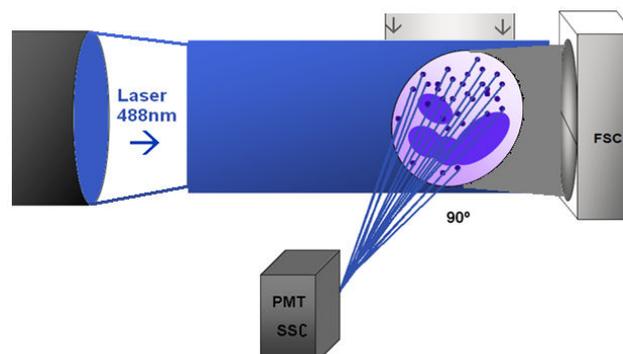


Figura 2.9: Avaliação da granularidade celular de acordo com a luz do *laser* refratada a 90°. Luz do *laser* sendo refratada de acordo com a granularidade celular e sendo direcionada através de espelhos e filtros para o fotossensor. SSC - *side scatter*.

Assim, um filtro dicróico *long pass* 488nm deixa passar todos os comprimentos de onda acima de 488nm (cores emitidas pelos fluorocromos excitados pelo *laser* 488) e reflete a luz do *laser* argônio refratada pela célula que é então direcionada para um filtro de interferência (*band pass*), o qual, por sua vez, deixa passar o comprimento de onda de 488nm até o PMT. Finalmente chegando ao PMT, a luz detectada determina o que chamamos de *side scatter* (SSC) ou granularidade celular. Ao mesmo tempo, as fluorescências que passam pelo filtro dicróico *long pass* 488nm são refletidas por outro(s) filtro(s) dicróico(s) *long pass* de determinado comprimento de onda, e então chegam ao PMT após passar por um filtro de interferência *band pass* específico para cada fluorescência (Figura 2.10)

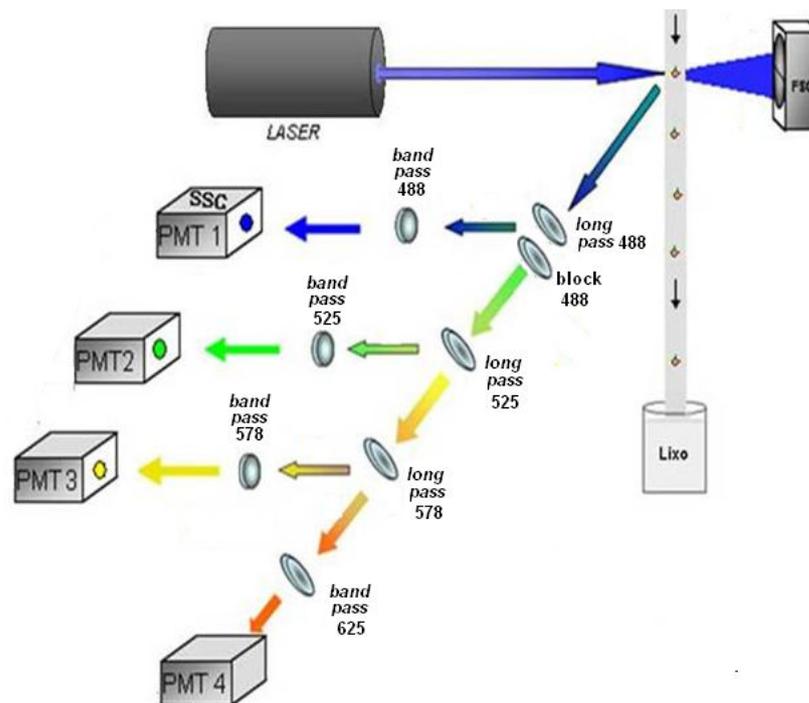


Figura 2.10: Esquema representativo do caminho de cada fluorescência, direcionada pelos filtros de interferência, até um PMT (fotossensor).

2.6 Sistema eletrônico

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

2.7 Software

Em segundos, milhares de células passam uma a uma pelo *laser* e toda a informação quanto à refração desta luz e à intensidade de fluorescência dos fluorocromos é detectada e convertida em sinal eletrônico. A avaliação das informações de tamanho e de granularidade, fenotípicas e ou funcionais, simultaneamente à aquisição, é realizada através de um *software* específico, no qual é possível montar os gráficos necessários de acordo com a análise que se deseja realizar. É importante destacar que cada citômetro de fluxo possui um *software* específico, ou seja, existe uma variedade destes programas específicos para a análise citofluorimétrica.

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

Toda análise se baseia, primeiro, na identificação das populações quanto às propriedades físicas, isto é, tamanho e granularidade. Deve-se então montar um gráfico biparamétrico, selecionando para o eixo x e y, a fluorescência correspondente ao fotomultiplicador que detecta o FSC e o SSC, em escala linear (Figura 2.11).

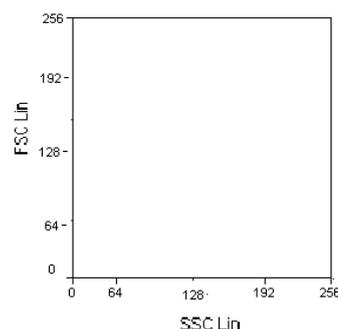


Figura 2.11. Dot plot de tamanho vs. Granularidade. FSC – *forward scatter* (tamanho); SSC – *side scatter* (granularidade); Lin – escala linear.

A seguir, devem-se montar os gráficos para a avaliação de intensidade de fluorescência dos respectivos fluorocromo(s) utilizados na amostra. Esta análise pode ser realizada através de gráficos monoparamétricos (histogramas), no qual se avalia a intensidade de uma única fluorescência (Figura 2.12), ou biparamétricos onde se avalia a intensidade de duas fluorescências. Estes gráficos, chamados *dot plots*, podem ser divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3, Q4), geralmente utilizando a escala logarítmica. A intensidade de fluorescência representada no Q1 é referente às células marcadas com o fluorocromo X; o Q2 representa a intensidade de fluorescência das células marcadas tanto com o fluorocromo X quanto com o fluorocromo Y; as células negativas para ambos os fluorocromos são representadas no Q3; e finalmente, o Q4 representa a intensidade de fluorescência das células positivas para o fluorocromo Y (Figura 2.13).

É possível montar um protocolo com a variedade e combinação desejada de histogramas e *dot plots*, de forma que, conforme cada amostra vai sendo adquirida, os gráficos vão sendo preenchidos de acordo com a intensidade de luz refratada e de fluorescência. As análises podem ser feitas através da **média de intensidade de fluorescência** e/ou do **percentual de células**.

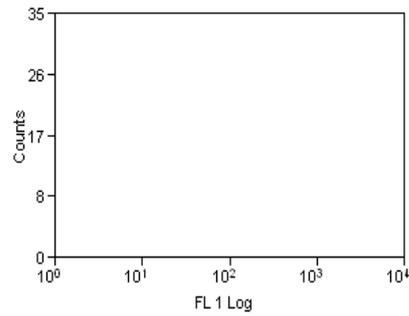


Figura 2.12. Histograma. Gráfico monoparamétrico para a avaliação de uma única fluorescência (vs número de células). *Counts* – número de células; FL1 – fluorescência 1; Log – escala logarítmica.

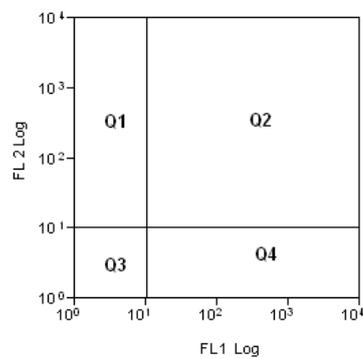


Figura 2.13: *Dot plot*. Gráfico biparamétrico: fluorescência 1 (FL1) vs fluorescência 2 (FL2). Q – quadrante; Log - escala logarítmica.

Os *softwares* permitem a seleção de regiões, denominadas *gates*, para delimitar as populações celulares que se deseja avaliar (Figura 2.14).

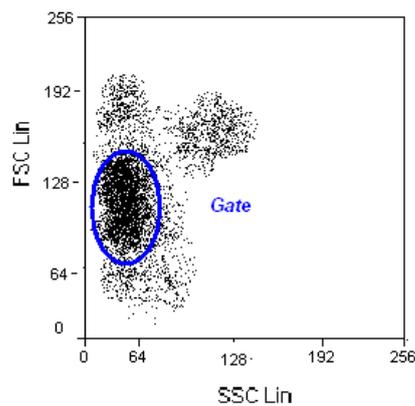


Figura 2.14: *Gate* (região em azul) nos linfócitos, selecionando-os de acordo com características tamanho e granularidade.

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

2.8 Compensação de cores

Apesar dos fluorocromos apresentarem um pico máximo de emissão, o espectro de emissão de fluorescência é amplo, apresentando variação. A consequência disto é a sobreposição das cores (Figura 2.15a), sendo necessário subtrair, eletronicamente, a fração da fluorescência (por exemplo, PE) que esteja interferindo na outra (FITC) (Figura 2.15b e 2.15d), o que é chamado de compensação de cores (Figura 2.15c e 2.15e).

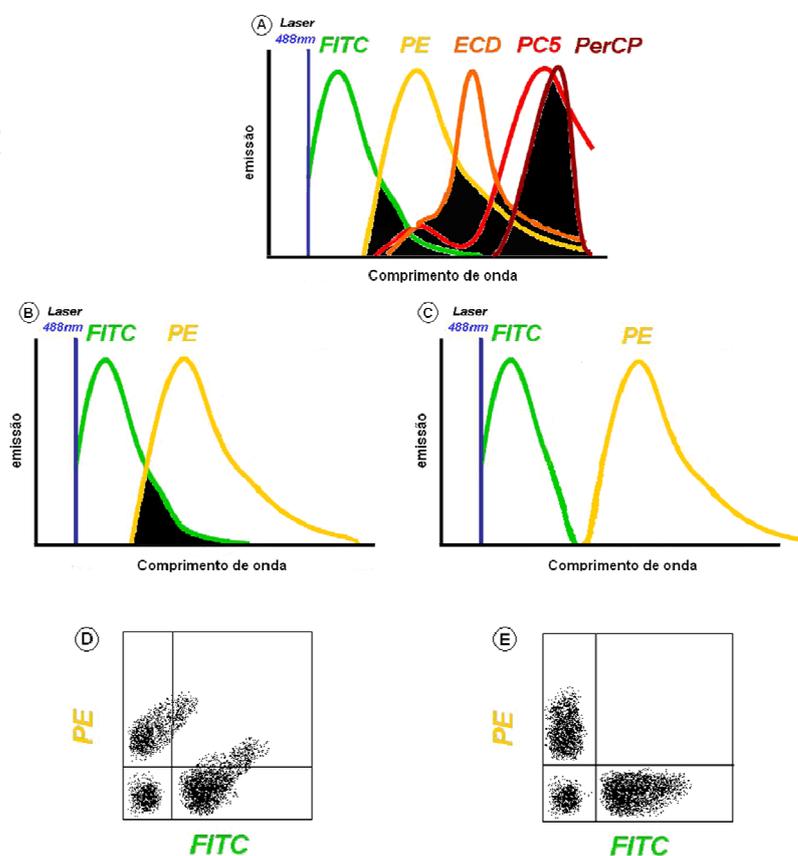


Figura 2.15: Compensação de cores. (A) Espectro de emissão dos fluorocromos FITC, PE, ECD, PC5 e PerCP e sobreposição do sinal de fluorescência entre os fluorocromos; (B) Sobreposição do sinal de fluorescência do FITC e do PE e (C) sinais compensados; (D) amostra não compensada em gráfico biparamétrico FITC vs PE e (E) amostra compensada.

Para realizar uma compensação de cores eficiente é recomendada a utilização de amostras marcadas individualmente com cada fluorocromo a ser utilizado no protocolo

citofluorimétrico (Figura 2.16A e B). Estas amostras devem ser adquiridas antes da amostra marcada com múltiplos fluorocromos. Através das marcações simples é possível ajustar o percentual de marcação somente para uma determinada fluorescência traçando uma linha imaginária na mediana dos eventos negativos e positivos, de forma que os mesmos devem estar alinhados, o que em números é representado pela semelhança entre a média de intensidade de fluorescência destes eventos. Após a compensação de cada fluorescência, a amostra é então adquirida e analisada neste protocolo previamente ajustado (Figura 2.16C).

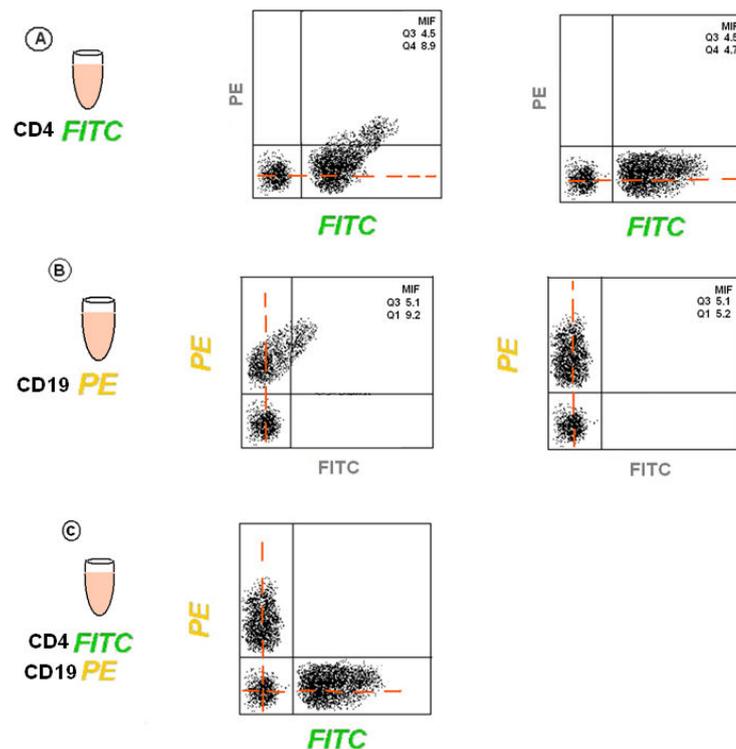


Figura 2.16: Marcação simples para compensação de cores. Aquisição de uma amostra marcada somente com CD4/FITC (A) e outra somente com CD19/PE (B), seguida da compensação de cores através do ajuste da média de intensidade de fluorescência dos eventos negativos (Q3) e dos eventos positivos (Q4 – A; Q1 – B), de acordo com uma linha imaginária tracejada entre estes eventos (em laranja). Em seguida a amostra marcada com os dois fluorocromos é adquirida conforme compensação previamente realizada.

2.9 Histórico da Citometria de Fluxo

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

Devido ao constante aprimoramento destes equipamentos, atualmente podemos encontrar no mercado citômetros de fluxo equipados com até seis *lasers*; com cada vez mais fotossensores, capazes de detectar até 11 comprimentos de onda diferentes (11 cores) acompanhando a produção de uma maior diversidade de fluorocromos; e *cell sorters*, que são citômetros de fluxo capazes de separar até 6 populações celulares diferentes; permitindo assim uma maior variedade e detalhamento de caracterizações fenotípicas e funcionas, assim como uma separação de populações celulares.

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

No Brasil, a história da citometria pode ser contada a partir de 1988, quando o primeiro citômetro de fluxo a ser importado para o país – o EPICS 751 da Coulter Electronics, Inc. (Figura 2.17), foi instalado no então Departamento de Protozoologia, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.



Figura 2.17: EPICS 751 *Cell Sorter* da então Coulter Electronics, Inc. Primeiro citômetro de fluxo instalado no Brasil, em 1988 – 2 *lasers*, 4 cores, *sorting*. Foto-cortesia: Bertho A.L.

Desde então a citometria de fluxo, devido a suas diversas aplicações na Biologia e na Biomedicina, apresenta uma crescente demanda de utilização por vários laboratórios clínicos e de pesquisa em todo o País, e por isso houve um aumento considerável na compra destes equipamentos.

Na medicina diagnóstica, a utilização destes equipamentos aumentou significativamente a partir de 1992, quando, por determinação do Ministério da Saúde, todo laboratório clínico que participasse da rede CD4/HIV tinha, que possuir um citômetro de fluxo

para determinar as taxas da relação entre linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes HIV positivos. Além disso, os laboratórios que atuavam nos diagnósticos de desordens hematopoiéticas, como leucemias e linfomas, passaram a utilizar estes equipamentos como ferramenta indispensável na obtenção dos diagnósticos destas enfermidades.

Na pesquisa científica, o caráter multiplicativo da Citometria de Fluxo tornou-a a ciência de escolha nas avaliações fenotípicas e funcionais em contextos imunoparasitológicos e de biologia celular.

Houve então uma necessidade de se ampliar o parque instrumental de diversas instituições brasileiras, criando-se, em muitos casos, Plataformas Multiusuários de Citometria de Fluxo, nas quais se concentram alguns equipamentos de modo a oferecer essa tecnologia para a comunidade científica intra e inter-institucional.

Pensando desta maneira, a FIOCRUZ possui duas Plataformas de Citometria de Fluxo:

- Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz – subdividida em dois Núcleos – Núcleo de Análise e Núcleo de Análise e *Sorting* - onde se encontram quatro citômetros de fluxo - um FACSCalibur, da BD (Figura 2.18); um Cyan ADP (Figura 2.19); um EPICS ALTRA *Cell Sorter* (Figura 2.20), e um EPICS XL-MCL (Figura 2.21), sendo os três últimos fabricados pela Beckman Coulter.



Figura 2.18. FACSCalibur Bench-top Analyzer – BD. 2 lasers, 4 cores. Software: Cell Quest. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise, IOC. Foto-cortesia: Ferraz, R.



Figura 2.19. Cyan ADP Bench-top Analyzer – Beckman Coulter. 2 lasers 7 cores; Software: Summit 4.3. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise, IOC. Foto-cortesia: Ferraz, R.



Figura 2.20. EPICS Altra Cell Sorter – Beckman Coulter - 1 laser, 4 cores; Software: Expo32. Plataforma de citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e Sorting, IOC. Foto-cortesia: Bertho, A.L.



Figura 2.21. EPICS XL-MCL Bench-top Analyzer – Beckman Coulter - 1 laser, 4 cores; Software: Expo 32. Plataforma de citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e Sorting (IOC). Foto-cortesia: Bertho, A.L.

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



Figura 2.22. FACS Aria *Cell sorter* - BD. 2 lasers 11 cores; Software: Diva. Foto-cortesia: Ferraz, R.

Além dos equipamentos das plataformas, o Accuri C6 é outro citômetros de fluxo utilizado na FIOCRUZ (Figura 2.23).



Figura 2.23: Accuri C6 – 2 lasers, 6 cores; CFlow software. Equipamento analisador.

Atualmente citometria de fluxo conta com citômetros de fluxo de última geração, os quais chamamos atenção para os citômetros da Beckman Coulter – Gallius; MoFlo XDP (Figuras 2.24); e MoFlo Astrios (Figura 2.25); e da Becton & Dickinson – BD Influx (Figura 2.26A); FACSVerse (Figura 2.26B); LSRFortessa.



Figura 2.24. MoFlo XDP *Cell Sorter*. Beckman Coulter - 3 *lasers*, 11 cores; *Software*: Kaluza - foto cortesia: Bertho, A.L.



Figura 2.25: MoFlo Astrios *Cell sorter*. Beckman Coulter - 3 *lasers*, 11 cores, *sorting* em 6 vias; *Software*: Kaluza. Foto-cortesia: Bertho, A.L.

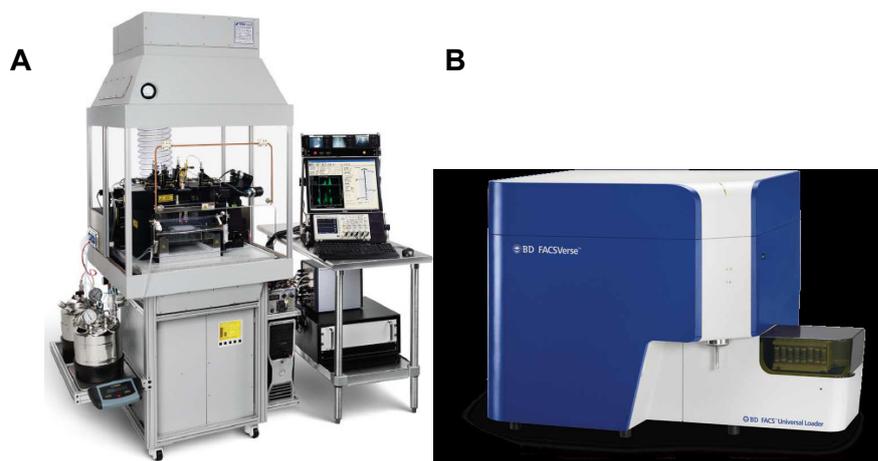


Figura 2.26: A - BD Influx *Cell Sorter*. 3 *lasers*, 11 cores, *sorting* em 6 vias; *Software*: BD FACS; **B** – FACSVerse. 3 *lasers*, 11 cores; *Software* BD FACSuite (Fotos-cortesia: BD Influx Brochures 2010)

O avanço técnico-científico não se restringe somente à evolução do citômetros de fluxo. As aplicações da citometria de fluxo também acompanharam este processo evolutivo e atualmente uma enorme variedade de protocolos citofluorimétricos tem sido utilizada em todo mundo.

CAPÍTULO 3. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Clarissa Cunha

A capacidade de mensurar simultaneamente múltiplos parâmetros em uma única célula é provavelmente o aspecto mais poderoso da citometria de fluxo. Apesar da utilização mais comum ser a identificação de moléculas na superfície e interior das células, a citometria de fluxo pode ser aplicada em uma grande variedade de investigações. Atualmente a citometria de fluxo tem sido muito utilizada tanto na pesquisa quanto na clínica, permitindo a análise de amostras diversificadas (como sangue, medula óssea, fluidos das cavidades serosas, líquido cefalorraquidiano, urina e até tecidos sólidos), detecção de características celulares (como tamanho, complexidade citoplasmática, conteúdo de DNA e RNA) e de uma grande variedade de receptores e proteínas intracelulares ou ligadas à membrana, além da identificação de parasitas e outros microorganismos. Neste capítulo, trataremos de forma breve as aplicações mais freqüentes da citometria de fluxo.

3.1 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. Estes corantes são fracamente fluorescentes em solução aquosa, mas fluorescem fortemente quando se ligam ao DNA devido à natureza hidrofóbica do microambiente. 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 são listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Corantes fluorescentes mais utilizados na marcação de DNA.

Fluorocromo	Abreviação	Absorção máx.	Emissão máx.
Laser UV			
diamidinofenilindol	DAPI	358 nm	461 nm
bisbenzimidazol	Hoechst 33342	355 nm	461 nm
	Hoechst 33258	343 nm	450 nm
Laser argônio			
iodeto de propídeo	PI	535 nm	617 nm
laranja de acridina	AO	503 nm	525 nm
7-aminoactinomicina-D	7AAD	546 nm	647 nm

O 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 em vermelho (617nm) quando excitado por um *laser* argônio. Devido à 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 membranar, são positivas para tal marcação (Figura 3.1A). Já os protocolos para identificar as células em diferentes fases do ciclo celular necessitam da permeabilização da membrana, através da utilização de detergentes (p.ex. Triton-X100, saponina, NP40) ou alcoóis (metanol e etanol). Como o PI também pode se intercalar 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 celular. Ainda, as células com uma menor intensidade de fluorescência são as células que apresentam uma fragmentação do DNA, característica do fenômeno de morte celular (Figura 3.1B).

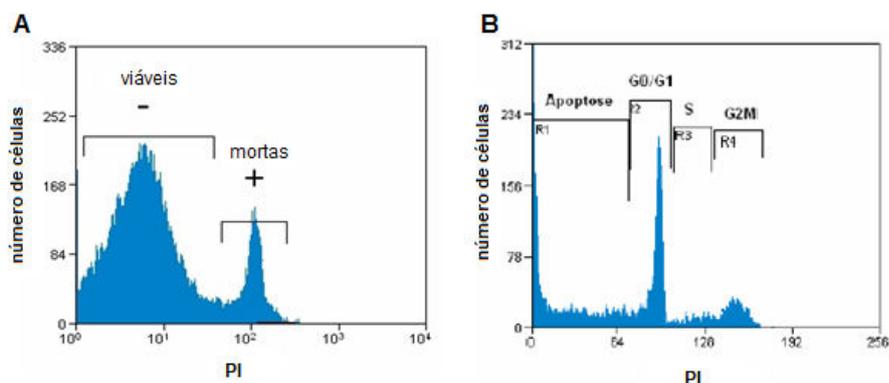


Figura 3.1. Histograma citofluorimétrico de número de células vs. intensidade de fluorescência do PI em diferentes protocolos: para viabilidade celular (A); e para avaliação de ciclo celular (B).

O DAPI possui afinidade pela ligação Adenina-Timina em DNA dupla fita e emite fluorescência azul (461nm) quando excitado pelo *laser* UV. 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 de replicação e divisão celular. A grande vantagem dos corantes excitados pelo *laser* UV é que seus picos de emissão não sobrepõem os picos de emissão dos fluorocromos tradicionais (como FITC e PE), sendo preferencialmente utilizados em protocolos multiparamétricos.

A citometria de fluxo fornece uma maneira mais direta de mensurar a síntese de DNA através do emprego da bromodeoxiuridina (BrdU), um nucleosídeo sintético análogo à timidina que se incorpora ao DNA sintetizado nas células em proliferação (durante a fase S do ciclo celular). Para avaliação por citometria de fluxo, utiliza-se um anticorpo específico anti-BrdU conjugado a um fluorocromo. Vale ressaltar que o DNA pode ser marcado ao mesmo tempo com PI, resultando um *dot plot* da fluorescência do PI (proporcional à quantidade de DNA) vs. a fluorescência do BrdU incorporado (Figura 3.2).

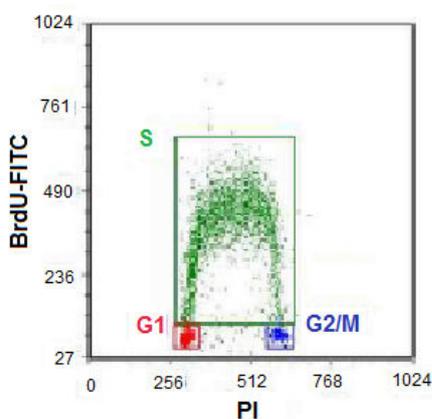


Figura 3.2. Avaliação das fases G1, S, G2/M do ciclo celular através de *dot plot* da fluorescência de FITC (conjugado a BrdU) vs. fluorescência do PI.

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). A análise dos conteúdos de DNA e RNA simultaneamente 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 Guanina-Citosina no DNA, o Hoechst 33258 tem afinidade pela interação Adenina-Timina, permitindo assim a análise do cariótipo, já que, mesmo cromossomos que possuem conteúdo similar de DNA, diferem na distribuição dos pares de bases (Figura 3.3).

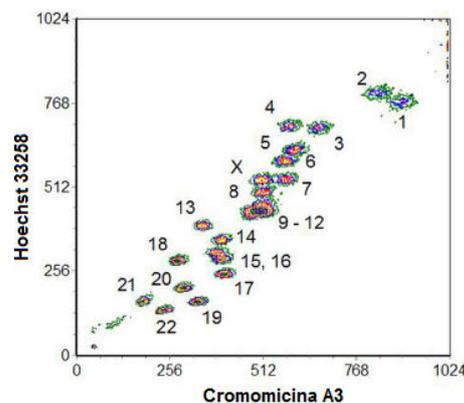


Figura 3.3. Avaliação de cariótipo humano normal através de *dot plot* da marcação de Hoechst 33258 vs. cromomicina A3.

3.2 Imunofenotipagem

No final da década de 60 equipamentos capazes de análises multiparamétricas e de purificação de populações celulares começaram a ser fabricados. Mas foi em meados da década de 70, com a introdução da técnica de produção de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas, que a citometria de fluxo teve sua grande expansão (Figura 3.4). Com a conjugação de fluorocromos à anticorpos monoclonais teve início a imunofenotipagem, principal aplicação da citometria de fluxo até os dias atuais. Desde então a citometria vem crescendo no cenário mundial e uma grande variedade de aplicações vem sendo introduzida, tanto no âmbito da pesquisa quanto da medicina diagnóstica (Figura 3.5).

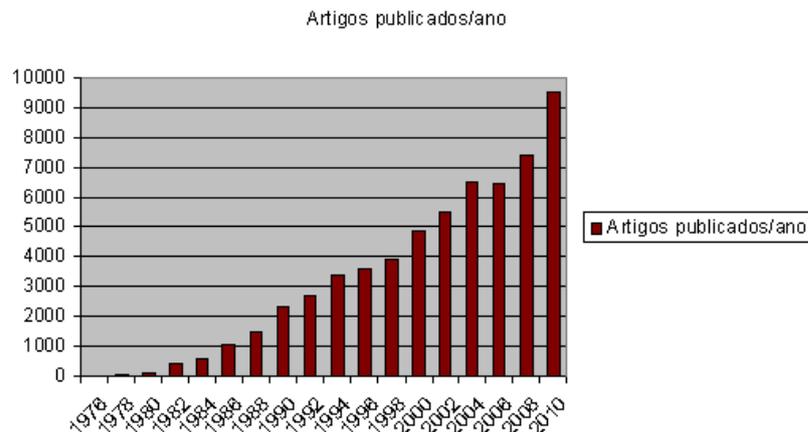


Figura 3.4. Gráfico mostrando o número de artigos publicados utilizando a citometria de fluxo por ano, desde 1976 até 2010.

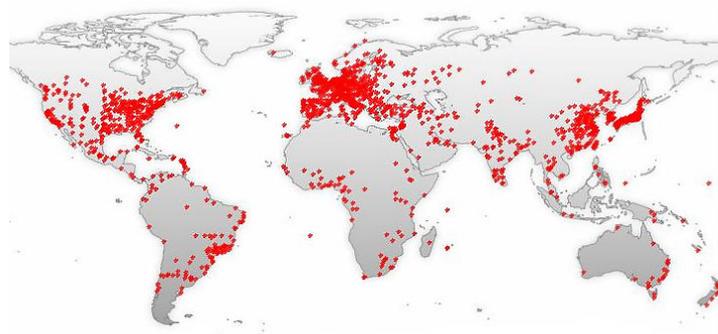


Figura 3.5. Distribuição mundial atual (dados de 2011) da utilização da citometria de fluxo. Fonte: <http://www.gopubmed.com>

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 leucócitos no sangue periférico ou em material de biópsia. Nos casos de leucemias e linfomas pode ocorrer um defeito neste desenvolvimento e então as células imaturas migrarem em grande número para a periferia; ou envolver uma rápida expansão de clones normais de células maduras e então este tipo celular passar a ser predominante na circulação; ou ainda células passarem 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.

O monitoramento imunológico dos pacientes infectados pelo HIV por citometria de fluxo é preconizado pelo Ministério da Saúde. O vírus HIV destrói os linfócitos T CD4⁺,

permitindo assim o acompanhamento da taxa destas células nos pacientes e o restabelecimento das mesmas durante o tratamento. A quantidade destas células na circulação é obtida através da combinação dos anticorpos monoclonais anti-CD45/CD3/CD4/CD8. Paralelamente, se faz a quantificação da carga viral como um teste complementar no monitoramento da AIDS e esta é inversamente proporcional com a taxa de linfócitos T CD4⁺.

Células-tronco hematopoiéticas podem ser detectadas por citometria de fluxo devido à sua expressão de CD34. Estas células estão presentes na medula óssea em quantidade reduzida, e quase insignificante na circulação periférica. 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 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 através da detecção de redução ou ausência de CD55 e CD59. PNH é causada pela biossíntese deficiente de um glicosilfosfatidilinositol que ancora várias proteínas imunoregulatórias e do complemento na superfície de eritrócitos e de outras células sanguíneas (como monócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas). Esta deficiência resulta em uma susceptibilidade dos eritrócitos à lise mediada pelo complemento, gerando uma hemólise intravascular crônica, que pode se tornar uma anemia aplásica e seguida de uma leucemia aguda.

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

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

Tabela 3.2. Exemplos de aplicações clínicas frequentes da citometria de fluxo.

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

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

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.

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

3.3 Morte Celular

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, sem a necessidade de submeter a amostra a um protocolo citofluorimétrico, porém a utilização de marcadores para determinar tal processo é muito mais específico.

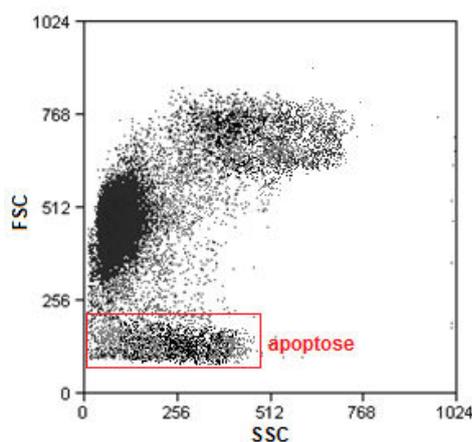


Figura 3.6. *Dot plot* de tamanho (FSC) vs. granularidade (SSC) de uma amostra células mononucleares de sangue periférico, no qual é possível observar as células que provavelmente se encontram em processo de apoptose, devido à diminuição de tamanho, como resultado do encolhimento celular, e aumento de granularidade, como resultado da condensação da cromatina.

Como citado no item 3.1, através da avaliação da degradação do DNA por diferentes marcadores (PI, DAPI) é possível determinar as células em apoptose. Outros marcadores também podem ser utilizados, como a Anexina-V (proteína com propriedade de se ligar à fosfatidilserina) conjugada a um fluorocromo. No processo inicial de apoptose, a fosfatidilserina é translocada para a superfície externa da membrana celular, permitindo então a ligação da Anexina-V.

Diversas proteínas relacionadas com o processo de apoptose podem servir como marcador com a utilização de como 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(3), e também *kits* comerciais baseados em enzimas de transferência de nucleotídeos (teste TUNEL).

A citometria de fluxo também se aplica aos estudos de necrose através da utilização de alguns protocolos que se baseiam na comparação dos dois tipos de morte celular. A 7-aminoactinomicina D (7-AAD) é um corante de viabilidade celular com a propriedade de se inserir entre as bases Citosina-Guanina em fita dupla de DNA. Durante o processo de morte a membrana plasmática é progressivamente alterada, tornando-se permeável à 7-AAD, que

então se liga no DNA acessível no interior da célula, permitindo assim a diferenciação de apoptose e necrose pela diferença de intensidade de fluorescência (Figura 3.7A). 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 são positivas para as duas marcações (Figura 3.7B).

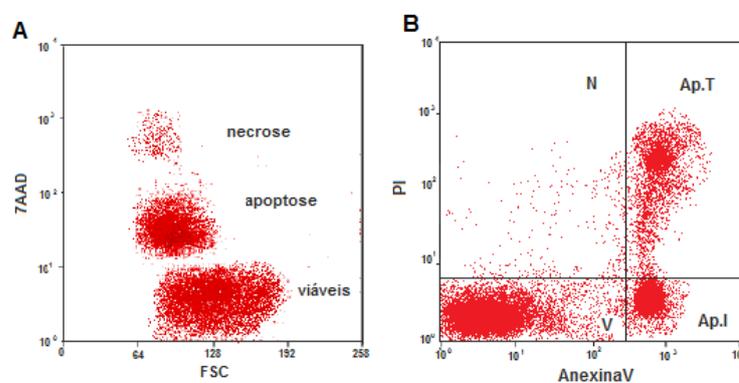


Figura 3.7. **A** – *Dot plot* de tamanho (FSC) vs. a fluorescência de 7-AAD, permitindo a visualização de três populações: células viáveis, células em apoptose e células em necrose; **B** – *Dot plot* da fluorescência do PI vs. a fluorescência de 7-AAD, diferenciando as células em necrose (N), em apoptose tardia (Ap.T), em apoptose inicial (Ap.I) e as viáveis (V).

3.4 Proliferação celular

Existem duas abordagens básicas para se estudar a proliferação celular: uma através da avaliação do ciclo celular (já exposto no item 3.1), e a outra através da avaliação do número de divisões celulares ao longo de um período de tempo. Nesta última, um número maior de divisões celulares pode ser observado, mas não há informações sobre o ciclo celular. As substâncias mais utilizadas para esta finalidade são o CFSE, que se liga a proteínas citosólicas e de membrana, e o PHK26, que é um corante lipofílico com afinidade com membranas celulares. Recentemente, a Invitrogen desenvolveu um novo corante chamado *Violet Cell Proliferation* com papel similar ao CFSE, mas que é excitado pelo *laser UV*. O princípio destas substâncias é que elas se ligam a estruturas nas células e, de acordo com a divisão destas, o corante também vai se dividindo entre as células-filhas (Figura 3.8).

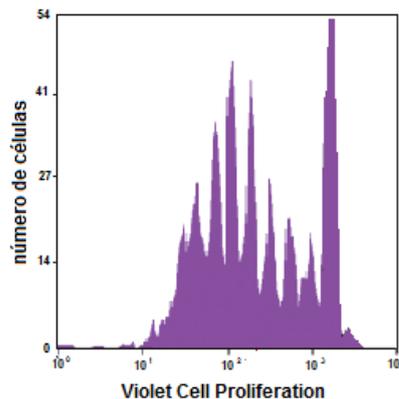


Figura 3.8. Histograma da intensidade de fluorescência do *Violet Cell Proliferation*. Os picos representam sucessivamente, da maior para a menos intensidade, as divisões sofridas pelas células em análise.

3.5 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.

O ensaio-padrão para avaliação da citotoxicidade é o ensaio de liberação de cromo, porém, por ser uma técnica trabalhosa, pouco sensível e que utiliza substâncias radioativas, vem sendo substituída pela Citometria de Fluxo. A citometria é muito mais simples, específica e sensível, além de permitir a avaliação simultânea de outros parâmetros, como determinar a população celular que está atuando e correlacionar os dados com a avaliação de morte das células-alvo. Geralmente são utilizados anticorpos monoclonais que se ligam a proteínas citolíticas (como granzima e perforina) ou a marcadores de superfície específicos (como LAMP-1(CD107a) e LAMP-2 (CD107b).

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 do CBA (melhor detalhado no capítulo 6). Estes 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 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 para avaliação da produção de espécies oxidativas são empregados principalmente na avaliação de *burst* oxidativo de neutrófilos, de alterações na concentração de produtos oxidativos durante a apoptose e da produção intracelular de espécies oxidativas sob diferentes estímulos. Os compostos mais utilizados (dihidrorodamina – DHR; dihidroetídio – DHE; e dihidroclorofluoresceína – DCFH) não são fluorescentes na sua forma reduzida, mas passam a fluorescer sob oxidação.

3.6 Análise de microorganismos

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

3.7 Interação parasito-célula hospedeira

Através da citometria de fluxo é possível avaliar a interação de parasitos com suas células hospedeiras, seja através de marcações fenotípicas específicas, da utilização de parasitas geneticamente modificados autofluorescentes, da realização de ensaios funcionais ou simplesmente através da observação da diferença de granularidade (Figura 3.9).

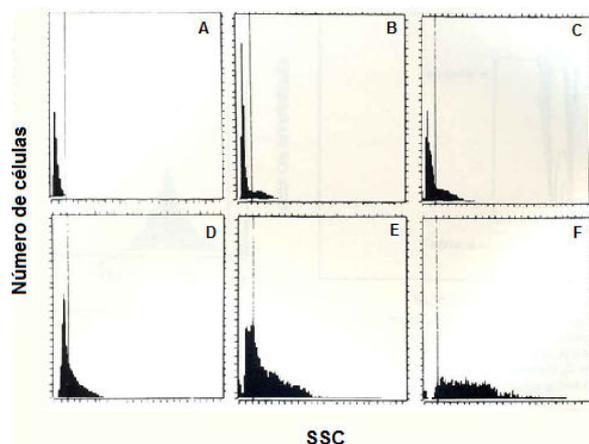


Figura 3.9. Dot plots de número de células vs. granularidade (SSC) de uma cultura de macrófagos com *Leishmania* em diferentes momentos (A – tempo zero de cultura). É possível observar o aumento da granularidade ao longo do tempo de cultura, o que representa a invasão das leishmânias nos macrófagos. Fonte: Bertho, Cysne & Coutinho, J. Parasitol.1992.

3.8 Microbiologia marinha

Bactérias, cianobactérias, fitoplânctons e zooplânctons estão presentes em altas concentrações nos ambientes marinhos e o estudo de suas funções e comportamento são fundamentais para a compreensão destes ecossistemas. A citometria de fluxo tem sido aplicada no estudo destes microorganismos principalmente através avaliação de tamanho e granularidade, autofluorescência e análise de DNA e RNA (Figura 3.10); e vem se tornando a técnica padrão para o monitoramento de populações de fito e zooplânctons. A partir destes estudos, novos citômetros são fabricados especialmente para tal aplicação, já que a caracterização e quantificação dos microorganismos presentes nos mananciais aquáticos como oceanos, lagoas etc, fornecem um monitoramento acurado da qualidade da água destes ambientes.

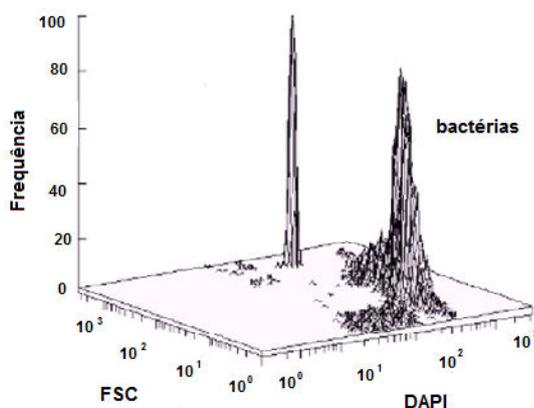


Figura 3.10. Avaliação do tamanho (FSC) e conteúdo de DNA (através da marcação com DAPI) de bactéria em uma amostra de água do mar do Alaska.

CAPÍTULO 4. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

Fernanda Heloise Côrtes

4.1 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem por citometria de fluxo permite a identificação de células específicas, em uma população heterogênea, pela análise da presença/ausência de antígenos expressos na superfície ou no interior da célula. A citometria de fluxo é um método mais sensível e simples de imunofenotipagem quando comparado a técnicas clássicas, como imunocitoquímica e imunofluorescência, ambas analisadas por microscopia. Essa técnica permite a identificação e/ou a quantificação simultânea e rápida de múltiplos antígenos em um elevado número de células.

Anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos são utilizados como “sondas” para a detecção destes antígenos, que são denominados marcadores celulares. Muitos destes marcadores são conhecidos como CD (do inglês: *cluster of differentiation*; grupo de diferenciação), os quais são expressos na superfície da célula e desempenham diferentes funções, como, sinalização e adesão celular (exemplificados na Tabela 2.1). Os marcadores celulares são muito úteis na identificação de populações e subpopulações de células específicas, embora, alguns deles são expressos em mais de um tipo celular. Desta forma, é necessário o uso de mais de um anticorpo, simultaneamente, para identificar e quantificar determinados tipos celulares através da citometria de fluxo. A combinação de diferentes anticorpos para diferenciar uma determinada população é frequentemente denominada “painel”.

As aplicações da imunofenotipagem abrangem tanto o uso na pesquisa básica como na clínica. No campo da pesquisa as possibilidades de uso da imunofenotipagem são extremamente diversas, como a identificação de populações de leucócitos (neutrófilos, monócitos, linfócitos T e B), de subpopulações de linfócitos T (linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺) e a diferenciação funcional dessas células; identificações de células da imunidade inata, como por exemplo, as células NK, monócitos e células dendríticas; identificação de células produtoras de citocinas ou com atividade citotóxica; entre outras. A utilização em laboratórios de rotina clínica é ampla, entre as aplicações pode-se citar: o diagnóstico de leucemias; o acompanhamento da contagem de células TCD4⁺ de indivíduos infectados pelo HIV-1; a enumeração de progenitores hematopoiéticos CD34⁺ para transplantes. Algumas dessas aplicações serão descritas a seguir.

4.2 Aplicações da Imunofenotipagem

4.2.1 Subpopulações de linfócitos T

A determinação da frequência de subpopulações de linfócitos T é importante na pesquisa de diferentes doenças, uma vez que alterações na frequência de determinadas subpopulações podem tanto estar relacionadas a uma resposta imune eficiente contra um microrganismo invasor ou um tumor, como também a uma resposta que leva a lesões teciduais e desenvolvimento de doenças. Além disso, é bem conhecido que alguns patógenos são capazes de modular a resposta imune a seu favor. A possibilidade do uso de um número crescente de marcadores celulares, simultaneamente, por citometria de fluxo proporcionou a distinção entre uma variedade de subpopulações de células T, o que por outro lado, também gerou uma heterogeneidade enorme na classificação dessas células. Alguns dos parâmetros para identificação subpopulações de linfócitos T e seu papel em determinadas infecções, com foco em HIV-1, serão discutidos a seguir.

4.2.1.1 Células T *naive*

Os marcadores de superfície expressos por células T *naive* refletem o seu papel no organismo. Essas células ainda não foram estimuladas pelo antígeno para o qual possuem especificidade e circulam pelos linfonodos, através das vênulas especializadas do endotélio alto (HEVs) com finalidade de encontrá-lo. Essa migração é mediada pela combinação de, no mínimo, dois fatores: (1) ligações de baixa afinidade entre o receptor de *homing* ou endereçamento presente na superfície do linfócito T, o **CD62L** (L-selectina), e as adressinas presentes na superfície das HEVs; (2) gradiente de quimiocinas (produzidas nos linfonodos e exibidas na superfície das células endoteliais, ligadas a glicosaminoglicanas) que se ligam ao receptor **CD197** (CCR7) expresso na membrana do linfócito. A ligação com as quimiocinas aumenta a força de ligação dos linfócitos ao endotélio, as células alteram sua forma (ficam mais espalhadas) permitindo sua passagem entre as células endoteliais e a entrada no estroma do linfonodo. As células migram em direção ao gradiente de quimiocinas alcançando a zona de células T no linfonodo.

Se as células T *naive* encontrarem antígenos elas serão ativadas, mas para que isso ocorra é necessário, além do sinal provido pela interação com o TCR, um segundo sinal, que ocorre com a ligação de moléculas coestimuladoras **CD28**, expressas na superfície do linfócito T, ao CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressos na membrana da APC. A transdução desse segundo sinal na célula T é mediada, em parte, pela molécula de **CD45RA**, levando a um aumento da expressão de CD70, o ligante para o receptor **CD27** também presente na membrana de células *naive*. Desta forma, podemos identificar os linfócitos T *naive* utilizando os seguintes marcadores: **CD62L⁺**, **CD197⁺⁺ (high)**, **CD28⁺**, **CD45RA⁺** e **CD27^{++high}**. Existem

outras moléculas que a presença, ausência ou a intensidade de expressão também podem ser utilizadas para identificar essa subpopulação funcional de linfócitos, como o $CD44^{low}$, $CD122^{low}$ e $CD45RO^{-}$. Existe uma variedade de painéis que são utilizados para identificação dessa população celular, evidenciando uma grande heterogeneidade entre parâmetros de classificação utilizados por diferentes grupos que se dedicam ao estudo dessas células diferentes laboratórios. Na Figura 5.1 pode-se observar uma das estratégias para identificar células T *naive*. A subpopulação de células T *naive* durante a infecção pelo HIV-1 sofre progressiva redução, o que reflete as profundas alterações na capacidade regenerativa dessa população nos indivíduos infectados.

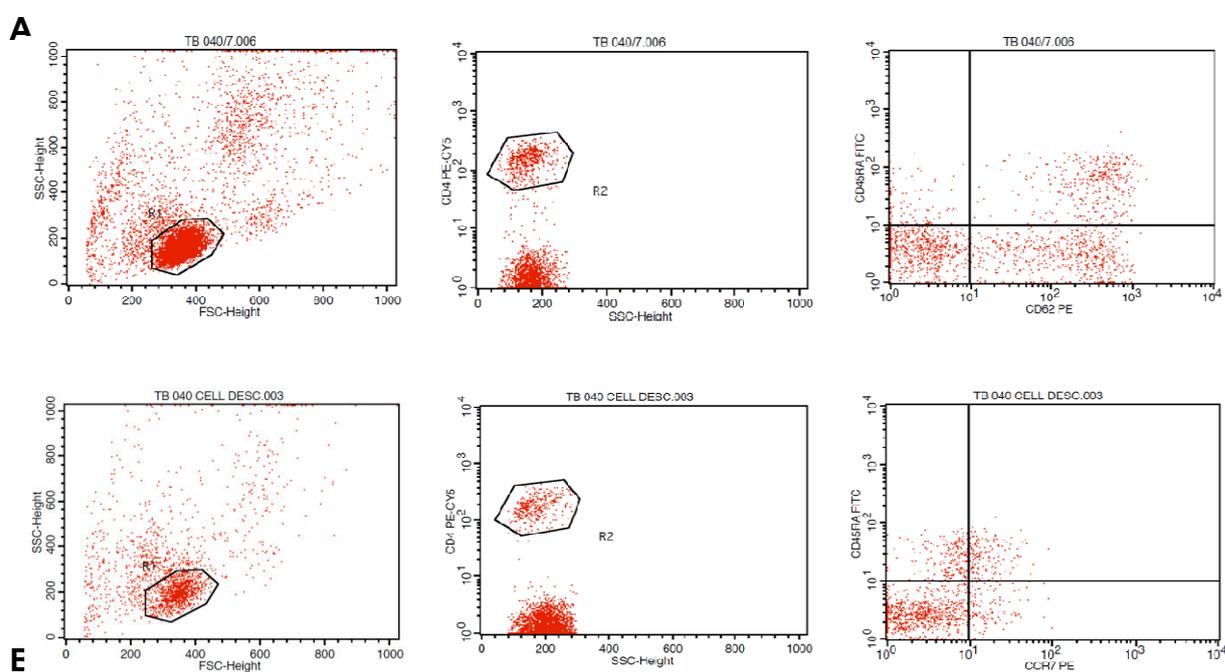


Figura 4.1: Análise de PBMCs para identificação de células T *naive*, em indivíduos infectados pelo HIV-1, utilizando-se dois painéis triplos de anticorpos. Para ambos os painéis a população de linfócitos foi definida com o uso de Dot-plot de SSCxFSC e a população de linfócitos TCD4⁺ foi definida usando-se anticorpos anti-CD4 PE-Cy5. No primeiro painel (A) a população de células TCD4⁺ *naive* foi definida como CD45RA⁺CD62L⁺; no segundo painel (B) a população de células TCD4⁺ *naive* foi definida como CD45RA⁺CCR7⁺.

4.2.1.2 Células T efetoras e células T de memória

O ponto principal que diferencia uma célula T efetora/memória de uma célula T *naive* é a exposição ao antígeno. Após esse contato as células T *naive* se diferenciam em células efetoras que executam funções específicas no decorrer de uma resposta imune ativa. Uma das características dessas células é a expressão de moléculas envolvidas no *homing* para tecidos inflamados, como CD192 (CCR2), CD195 (CCR5), CD49 e VLA-1 (CD49a/CD29) e

moléculas de ativação (CD25, CD69, HLA-DR e Ki-67). No entanto, ao contrário do observado para as células *naive*, existe uma grande heterogeneidade de marcadores celulares expressos por subpopulações efetoras e de memória que definem os diferentes estágios de diferenciação celular, já identificados para essas células. A intensidade da expressão (baixa, média, alta) de determinados marcadores também é um parâmetro para identificar estágios funcionais de diferentes populações. A mesma combinação de anticorpos usados para evidenciar células *naive* também é uma alternativa para diferenciar células efetoras e células de memória, sendo que a presença, ausência ou nível de expressão das mesmas moléculas definirá as populações. Essas combinações estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Exemplo de combinações de marcadores utilizados para diferenciar células T naive, células T de memória central, células T de memória efetora e células T efetoras.

Células <i>naive</i>	Células de memória central	Células de memória efetora	Células efetoras
CCR7 ⁺⁺	CCR7 ⁺⁺	CCR7 ⁻	CCR7 ⁻
CD62L ⁺	CD62L ⁺	CD62L ⁻	CD62L ⁻
CD28 ⁺	CD28 ⁺	CD28 ⁻	CD28 ⁻
CD27 ⁺⁺	CD27 ⁺⁺	CD27 ^{low}	CD27 ⁻
CD45RO ⁻	CD45RO ⁺	CD45RO ⁺	CD45RO ^{-/+}
CD45RA ⁺	CD45RA ⁻	CD45RA ^{-/+}	CD45RA ⁺

Entre as células T CD4⁺ existem diferentes subpopulações efetoras, que são caracterizadas pelo perfil de produção de citocinas e classificadas em Th1, Th2 ou Th17 (Figura 4.2). As moléculas expressas por essas células refletem o papel funcional de cada população e é possível identificá-las usando a imunofenotipagem por citometria de fluxo com uma combinação de três anticorpos: células Th1 → anti-**CD3**, anti-**CD4** e anti-**CD183 (CXCR3)**; células Th2 → anti-**CD3**, anti-**CD4** e anti-**CD194 (CCR4)**; células Th17 → anti-**CD3**, anti-**CD4** e anti-**RORγt** (fator de transcrição celular). É importante lembrar que a imunofenotipagem também é feita com uso de marcadores intracelulares. Além disso, essas subpopulações funcionais expressam outras moléculas que podem auxiliar na sua identificação. Nos linfócitos Th1, ocorre a expressão de IL-12Rβ2 e o aumento da expressão da subunidade β1 desse receptor, levando a um aumento na expressão do complexo IL-12R, necessário para a função dessas células. A expressão da subunidade α do receptor da IL-18 também é aumentada nas células Th1 que também expressam o CCR5. Nas células Th2, a expressão de IL-4Rα é estimulada pela produção de IL-4, durante o processo de diferenciação, quando também ocorre uma maior expressão de CD25 nessa população, comparada à Th1. As células Th2 também expressam IL-33Rα e os receptores de

quimiocinas CCR3 e CCR8. Entre as Th17, é possível observar altos níveis de IL-23R, IL-1R1 e IL-18R α e os receptores de quimiocinas CCR6 e CCR4. Em indivíduos infectados pelo HIV-1 ocorre uma perda de células Th17, uma diminuição também observada em modelos animais infectados pelo SIV (Vírus da Imunodeficiência Símia). Por outro lado, em indivíduos conhecidos como LTNP (*Long Term Non-Progressors*), que são indivíduos infectados pelo HIV-1 por mais de 10 anos, mas que não desenvolvem AIDS, foi observado um número maior de células Th17 em comparação aos pacientes que progridem para a doença. Além disso, macacos que controlam a replicação do SIV (vírus da imunodeficiência símia) também possuem níveis elevados de Th17 na mucosa intestinal.

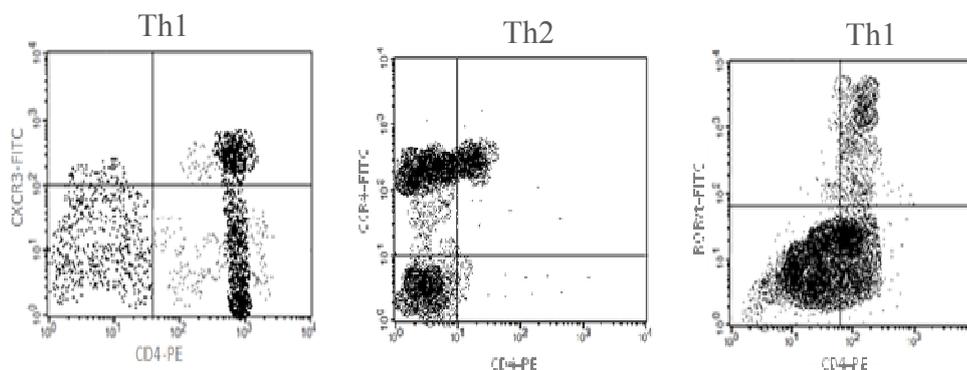


Figura 4.2: Identificação de linfócitos T CD4⁺, em função do perfil de produção de citocinas. A população de Células Th1 foi definida pela expressão de CXCR3, a população Th2 através do anticorpo anti-CCR4 e, para as células Th17, foi feita marcação intracelular de RORyt.

Em células TCD8⁺, após a ativação, também ocorre um aumento da expressão de receptores de citocinas pró-inflamatórias (CXCR3), permitindo a migração dessas células para a periferia, onde desempenharão suas funções, entre elas, a lise da célula alvo. Essa lise é mediada pela liberação de grânulos contendo granzimas e perforinas, em um processo de exocitose. Uma das estratégias que tem sido utilizada para identificar células citotóxicas é o uso de anticorpos anti-**CD107a**. A molécula CD107a é uma glicoproteína associada a membrana interna dos grânulos líticos, a qual é exposta na superfície das células após a degranulação e liberação do conteúdo para o meio extracelular (Figura 5.3). Apenas as células que liberaram o conteúdo dos grânulos expressam CD107a em sua superfície. Uma das principais vantagens dessa técnica é a não utilização de compostos radioativos, além de ser possível detectar a citotoxicidade em células individuais e caracterizar o fenótipo dessas células. A marcação com CD107a também é utilizada para identificar células NK que liberaram seus grânulos em resposta ao estímulo da célula alvo. Nesse caso, para identificar as células NK, a molécula CD56 (marcador de células NK) é utilizada em conjunto com o CD107a.

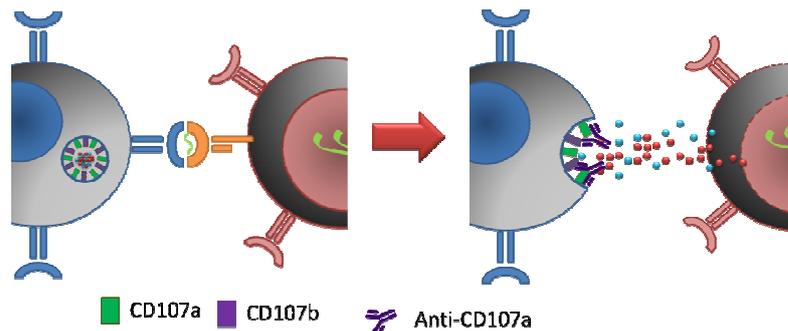


Figura 4.3: Mobilização de CD107 para a superfície celular e marcação com anti-CD107.

Marcadores de ativação celular também são usados para diferenciar as células efetoras de células de memória central e os mais frequentemente utilizados são **CD69** (marcador de ativação recente), **CD38** e **HLA-DR** (Figura 4.4). O aumento da expressão desses marcadores, geralmente está associado a uma ativação celular persistente e elevada. Esse perfil é observado em células T de indivíduos infectados pelo HIV-1, sendo associado a um prognóstico ruim, além de correlacionar-se inversamente aos valores da contagem absoluta de linfócitos TCD4+ desses indivíduos.

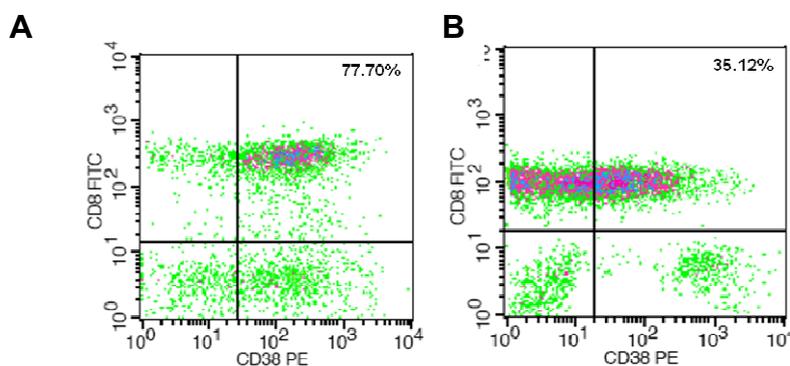


Figura 4.4: Expressão de CD38 em linfócitos TCD8+ de paciente coinfetado por HIV-1 e *Micobacterium leprae*. A: *Dot-plot* representativo da ativação celular no momento de reação reversa; B: Ativação celular após tratamento específico.

4.2.1.3 Células T reguladoras

As células T reguladoras (Tregs) possuem um papel importante na modulação da resposta imune, incluindo prevenção do desenvolvimento de autoimunidade, respostas imunes em transplantes, alergias, resposta frente a tumores e doenças infecciosas. As células T reguladoras naturais são distinguíveis de células T convencionais principalmente pela expressão na superfície da molécula de **CD25** em sua superfície e pela expressão intracelular do fator de transcrição **Foxp3**. Além disso, essas células expressam altos níveis

de IL-2R α e expressam níveis muito baixos ou não expressam **CD127 (IL-7R α)**. Essas células também expressam CTLA-4, GITR e Folr4, os quais, no entanto são marcadores úteis apenas para a diferenciação entre Tregs e células T *naive*, uma vez que eles também podem ser induzidos em células T convencionais ativadas. Uma das estratégias para identificar essa população é usar um painel com anticorpos anti-**Foxp3**, anti-**CD25** e anti-**CD127** (Figura 4.5).

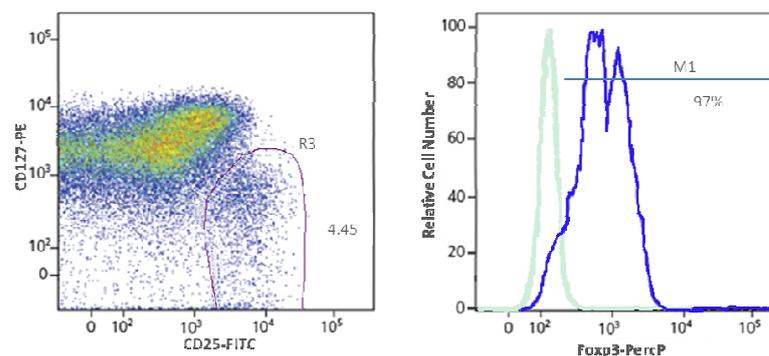


Figura 4.5: Marcação de células T reguladoras. Células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com anticorpo anti-CD4-APC, anti-CD127-PE, anti-CD25-FITC e anti-Foxp3-PerCP. Os linfócitos foram inicialmente definidos com base no tamanho e na granularidade celular (SSCxFSC) e a população de linfócitos TCD4⁺ foi delimitada em função do tamanho e da fluorescência para CD4 (FSCxCD4), a partir da qual determinou-se a região R3 de células TCD4⁺CD25⁺CD127⁻ e em função desta o histograma da expressão de Foxp3 (azul). Controle isotópico em verde.

Alterações na frequência dessa população de células têm sido encontradas em diferentes doenças. Como exemplo, na infecção por *Leishmania major*, a presença dessas células nos sítios de infecção suprime a expansão de células T e a produção de INF- γ , promovendo o estabelecimento da infecção e permitindo a sobrevivência do parasita. Por outro lado, a ausência de células T reguladoras está ligada ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como exemplo alguns raros indivíduos, que devido a mutações em *FOXP3* não possuem Tregs e desenvolvem a síndrome de desregulação imune, poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (IPEX). Esses indivíduos apresentam uma autoimunidade agressiva, incluindo diabetes tipo 1, tireoidite e desenvolvimento de eczemas.

4.2.2 Imunofenotipagem na infecção pelo HIV-1

4.2.2.1 A infecção pelo HIV e a depleção de células T CD4⁺

Em 1981, quatro casos de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* acompanhada de candidíase de mucosa extensiva e múltiplas infecções virais foram reportados em indivíduos homossexuais, anteriormente saudáveis, da cidade de Los Angeles. Neste período, ninguém poderia imaginar que o surto de infecções oportunistas

que ali se iniciava marcaria o início de uma pandemia denominada síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome - AIDS*) que afetaria mais de 60 milhões de pessoas e seria responsável pela morte de mais de 25 milhões. O entendimento de que, claramente, está era uma nova doença infecciosa de origem viral começou com a publicação, em 1983, de um artigo do laboratório de Luc Montagnier e Françoise Barré-Sinoussi (prêmio Nobel de medicina em 2008), descrevendo um novo retrovírus associado com a AIDS; e de outro artigo, no ano seguinte, do grupo de Robert Gallo que reforçou a relação entre esse novo vírus e a AIDS. Em 1986 o novo vírus recebeu a denominação pela qual é conhecido hoje: Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus - HIV*).

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

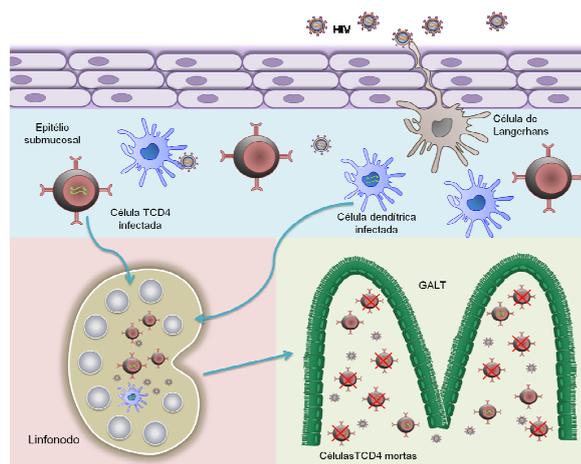


Figura 4.6: Desenho esquemático da infecção pelo HIV-1 por via sexual: transpasse da barreira epitelial, migração para os órgãos linfóides e depleção massiva de células TCD4⁺CCR5⁺ no tecido linfóide associado ao intestino (GALT).

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 drenante, onde encontra células T CD4⁺CCR5⁺, que são alvos para infecção adicional. A molécula de CD4 e o receptor de quimiona CCR5 (CD195) funcionam como receptor e correceptor, 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 TCD4⁺CCR5⁺ estão presentes em grande número e são alvos predominantes da depleção inicial de células T CD4⁺. Quase todas as células TCD4⁺CCR5⁺ são depletadas no GALT (Figura 4.6). 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°-21° dia de infecção.

Este pico na carga viral, acompanhado por uma queda expressiva de células T CD4⁺ do sangue periférico, caracterizam o período inicial da infecção, denominada **fase aguda** (Figura 4.7). 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 TCD4⁺, atingindo valores inferiores a 200 células/ μ L e pelo aparecimento de sintomas clínicos e infecções oportunistas, assinalando a **fase sintomática**, ou AIDS propriamente dita. Este perfil de evolução da doença é observado para a grande maioria dos indivíduos, embora cerca de 10-15% dos indivíduos infectados entrem na fase de AIDS após 2 a 3 anos de infecção, sendo denominados progressores rápidos. Por outro lado, existe um grupo de indivíduos (5%-15%), chamado de Não Progressores de Longo Termo (do inglês LTNP-*long term non-progressors*), que não evoluem para a AIDS mesmo após 10 a 15 anos de infecção.

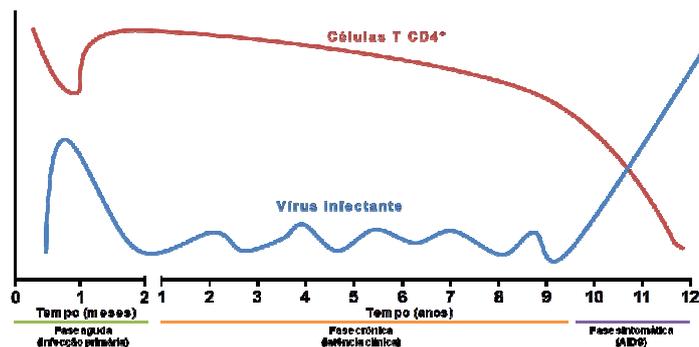


Figura 4.7: Curso natural da infecção pelo HIV-1.

4.2.2.2 Quantificação de linfócitos TCD4⁺

A contagem de células T CD4⁺, para acompanhamento da progressão da doença e monitoramento do tratamento em indivíduos infectados pelo HIV-1, representa uma das principais aplicações clínicas da citometria de fluxo. A imunofenotipagem por citometria de fluxo é considerada o padrão ouro para a quantificação de células T CD4⁺.

Uma das primeiras e mais populares estratégias para a quantificação dessas células, usada no meio da década de 1980 até início dos anos 90, foi a combinação de FSC, SSC e anticorpos monoclonais anti-CD45 e anti-CD14. O uso de FSC e SSC permitia a identificação de diferentes populações de leucócitos e a combinação desses parâmetros com o CD45 proporcionava uma melhor determinação da região de linfócitos, enquanto a contaminação de monócitos era calculada pela marcação com o anti-CD14. Em seguida, tubos contendo as seguintes combinações anti-CD3 e anti-CD19; anti-CD3 e anti-CD4; anti-CD3 e anti-CD8; anti-CD19 e anti-CD16/CD56 eram utilizados, além do tubo com controles isotípicos. Esse painel era recomendado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), mas atualmente é considerado extremamente complexo e caro. Outra desvantagem era o uso da contagem total de leucócitos ou linfócitos para determinar o número absoluto das subpopulações de linfócitos analisadas, levando a erros de quantificação devido à deterioração da amostra com o passar do tempo, o que aumentava a contaminação de “não-linfócitos” dentro da região analisada. Mas recentemente, o uso de outras abordagens como o *PanLeucogating* tem ajudado a solucionar problemas com amostras coletadas há mais de 24 horas e será explicada posteriormente.

A quantificação de linfócitos TCD4⁺ por citometria de fluxo pode ser feita usando uma plataforma dupla ou uma plataforma única. Na plataforma dupla, o número de linfócitos TCD4⁺ é estimado por uma fórmula matemática usando dois parâmetros independentes: a porcentagem de células TCD4⁺ com o total de células sanguíneas obtidas no citômetro de fluxo e a contagem diferencial de linfócitos estimada por um analisador hematológico ou um

hematocitômetro. O uso do analisador hematológico como uma segunda plataforma introduz fatores variáveis ao cálculo do número absoluto de linfócitos TCD4⁺, o que aumenta a possibilidade de erros. Em um indivíduo, a variação da contagem total de leucócitos e da contagem diferencial de linfócitos, ao longo do tempo, levam a uma grande variabilidade do número absoluto de linfócitos comparado com a porcentagem de células TCD4⁺. Além disso, algumas amostras possuem números de células fora da faixa de sensibilidade do analisador, como pacientes com leucopenia grave, por exemplo. Desta forma, a população de leucócitos definida por citometria de fluxo pode não corresponder à mesma população definida com o uso do analisador hematológico. Apesar disso, em alguns locais, a plataforma dupla ainda é utilizada.

Na plataforma simples, a contagem absoluta de linfócitos TCD4⁺ é determinada diretamente no citômetro de fluxo. Essa contagem absoluta pode ser obtida por duas técnicas diferentes: usando um volume de sangue extremamente preciso ou usando microesferas (*beads*) fluorescentes misturadas a um volume de sangue conhecido. Essa técnica permite uma maior reprodutibilidade de resultados entre diferentes laboratórios. Atualmente, existem alguns métodos para uso em plataforma única disponíveis comercialmente, algumas dessas técnicas serão discutidas a seguir.

Sistema FACSCount

O sistema FACSCount é um produto da BD Biosciences que inclui instrumento, reagentes, controles e o *software* próprio. Esse citômetro possui um laser verde do tipo HeNe e é usado exclusivamente para a quantificação de linfócitos TCD3⁺, TCD4⁺ e TCD8⁺ em amostras de sangue total, usando o método “sem lise” de eritrócitos e sem lavagem (*no-lyse, no-wash*), o que diminui a manipulação da amostra. O sistema utiliza dois tubos prontos para uso, que contêm uma mistura de anticorpos e microesferas fluorescentes. O primeiro tubo contém os anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugados com PE e anti-CD3 conjugados com PE-Cy5, e é usado para determinar a contagem absoluta de células T CD4⁺; o segundo tubo contém anti-CD8-PE-Cy5, anti-CD3-PE e é utilizado para a quantificação dos linfócitos TCD8⁺; ambos os tubos fornecem o valor total das células T CD3⁺ e possuem um número determinado de microesferas fluorescentes. As microesferas, ou *beads*, permitem a obtenção da contagem absoluta de células sem a necessidade de um analisador hematológico. Além disso, são utilizados tubos controles: zero (0 *beads*/μL), baixo (50 *beads*/μL), médio (250 *beads*/μL) e alto (1000 *beads*/μL). O sangue é adicionado aos tubos (50 μL), que é misturado em um agitador de tubos e incubado, sendo então acrescido de uma solução de fixação e as amostras são avaliadas no citômetro. O número absoluto de

células T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ é determinado automaticamente pelo *software* próprio do sistema. Uma das grandes vantagens desse método é que ele não precisa de operadores altamente capacitados e a maior desvantagem é que ele não permite a determinação da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ sem o auxílio de um analisador hematológico.

Sistemas *TruCOUNT* e *Flow-Count fluorospheres*

Os sistemas *TruCOUNT* (BD Biosciences) e *Flow-Count fluorospheres* (Beckman Coulter) consistem de tubos especiais contendo uma microesfera liofilizada que se dissolve durante a preparação da amostra, liberando um número conhecido de *beads*. A contagem absoluta é determinada seguindo o mesmo princípio baseado em *beads* que foi descrito anteriormente, mas a estratégia para definição das subpopulações de linfócitos é diferente. Além disso, os dois sistemas permitem a obtenção das porcentagens das subpopulações de linfócitos T, um dado extremamente importante para ao acompanhamento de crianças infectadas pelo HIV-1. No Brasil, a Rede de Laboratórios para a Quantificação de CD4⁺/CD8⁺ do Ministério da Saúde utiliza o sistema TruCount, fornecido pela BD Biosciences. A quantificação dos linfócitos TCD4⁺ com os tubos *TruCOUNT* é feita usando um citômetro de fluxo capaz de realizar a leitura de quatro fluorocromos simultaneamente, como o FACSCalibur equipado com dois laser (laser de argônio com excitação na faixa de 488 nm e laser diodo, na faixa de 635 nm) e uma mistura de anticorpos monoclonais comercialmente denominada de *Multitest* (CD3-FITC/CD4-APC/CD8-PE/CD45-PerCP). Além disto, são utilizadas soluções de controle, que avalia a qualidade das microesferas dos tubos (*BD TruCOUNT Control High, Medium e Low*) e uma solução de calibração, para ajuste do equipamento de acordo com os parâmetros a serem avaliados (*BD CaliBRITE: beads* não marcadas e marcadas com FITC, PE, PerCP e APC) (Figura 4.8). A contagem absoluta usa a estratégia de *PanLeucogating* (Fig 4.9), na qual a população de linfócitos é definida pela expressão do CD45 vs SSC (granularidade).

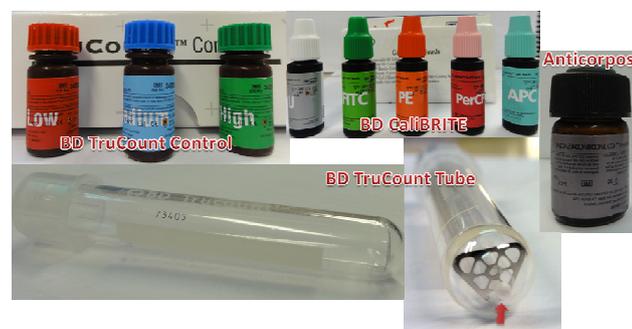


Figura 4.8: Reagentes para quantificação de linfócitos TCD4⁺ em pacientes infectados com HIV-1. Sete vermelha indica bolinha liofilizada contendo microesferas. Fonte: BD Brochure, 2011.

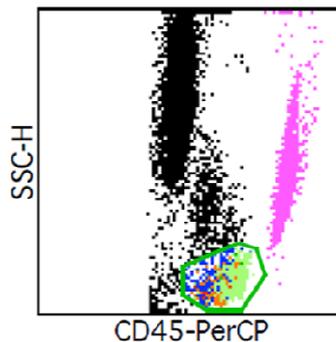


Figura 4.9: *PanLeucogating* usando estratégia de marcação com anticorpos anti-CD45.

Todos os leucócitos expressam CD45, mas em diferentes intensidades: granulócitos < monócitos < linfócitos (Figura 5.10), o que permite a separação dessas três subpopulações de leucócitos e uma contagem total de linfócitos mais precisa quando comparada a estratégias como SSC vs FSC e *gating* no CD3⁺, as quais podem conter contaminantes não-linfóides, principalmente em amostras com maior tempo de coleta. Como previamente citado, essa técnica, também permite a obtenção das percentagens de células T CD4⁺, T CD8⁺ e as células duplo-positivas T CD4⁺CD8⁺. Estes parâmetros, incluindo a contagem absoluta de linfócitos, são importantes na clínica, permitindo o médico determinar se o paciente teve uma queda real específica de células T CD4⁺, efeito da infecção pelo HIV, ou se ocorreu uma redução geral dos linfócitos, o que poderia ser resultado de alguma outra patologia.

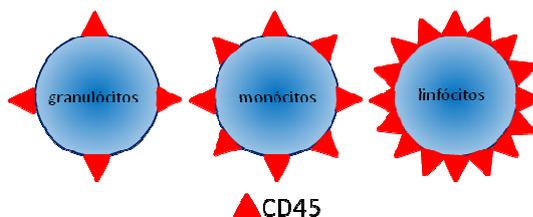


Figura 4.10: Expressão da molécula CD45 em leucócitos.

4.2.3 Imunofenotipagem e as leucemias

No início dos anos de 1980, os anticorpos monoclonais começaram a ser introduzidos em laboratórios clínicos e sua utilização inicial foi no diagnóstico de leucemias. Atualmente, a imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma ferramenta extremamente utilizada no diagnóstico, prognóstico, classificação, acompanhamento do tratamento e caracterização fenotípica de leucemias. A diferenciação entre células neoplásicas e células normais presentes na amostra é baseada nos diferentes padrões fenotípicos dessas populações celulares e os painéis de anticorpos utilizados são elaborados de acordo com os

sinais clínicos dos indivíduos e os resultados dos achados morfológicos e citoquímicos prévios. Além disso, ferramentas de biologia molecular também auxiliam na classificação e diagnóstico. Com os avanços da citometria de fluxo, atualmente, mais de dez parâmetros são avaliados rotineiramente em laboratórios clínicos.

Células neoplásicas apresentam um fenótipo aberrante, elas expressam simultaneamente marcadores de linhagens celulares distintas (mielóide/linfóide), possuem uma diferenciação anormal, marcadores de células imaturas, aumento da expressão de moléculas anti-apoptóticas, assincronia na expressão gênica, entre outras características que auxiliam na identificação dessas células.

Na maioria das vezes, a análise de uma amostra começa com um painel primário mínimo de anticorpos. O principal objetivo dessa etapa é definir a linhagem celular, na qual são usados marcadores para células mielóides, como o CD33, CD13, CD117 (c-Kit) e o marcador intracelular MOP (mieloperoxidase), e para células linfóides, como o CD7 e o CD3 (linfócitos T), CD19, CD20 e CD79 (linfócitos B). Após a análise dos resultados obtidos com esse painel primário, um painel secundário pode ser usado para uma distinção mais aprimorada da patologia em avaliação e também do estágio de maturação da população celular envolvida, diferenciando-se as formas agudas ou crônicas, o que possui grande relevância na avaliação do prognóstico do paciente. Entre os marcadores de maturação o CD15, a enzima TdT (presente em linfócitos T imaturos) e o CD34 (presentes células progenitoras sanguíneas) são bastante utilizados.

CAPÍTULO 5. CITOCINAS

Juan Camilo Sánchez-Arcila

5.1 Origem do estudo das citocinas

A origem do estudo das citocinas está ligada basicamente a três áreas na imunologia. Primeiramente, na década de 60, o estudo de proteínas derivadas de linfócitos que mostrou que podiam regular o crescimento e função de vários tipos de leucócitos. Em segundo lugar, o estudo de um grupo de proteínas chamadas *Interferons* (descritas na década de 50) mostrou que eram capazes de, seletivamente, agir como agentes antivirais e, posteriormente, apresentavam um amplo espectro de ações, agindo como fatores de crescimento e de diferenciação em vários tipos celulares, incluindo células que não pertenciam ao sistema imune. Em terceiro lugar, o estudo de proteínas que agiam como fatores de crescimento geraram grandes avanços no conhecimento das citocinas ao perceber que, um grupo destas proteínas estava envolvido em processos relacionados com a diferenciação de células hematopoiéticas e, outro grupo de moléculas, estaria envolvido em processos de diferenciação de células não hematopoiéticas.

5.2 Nomenclatura

O termo citocinas é frequentemente baseado nos tipos celulares que as produzem. Derivam do grego *cyto* = célula e *kinos* = movimento. Inicialmente, pensava-se que elas eram produzidas somente por linfócitos. Posteriormente, em 1979, um grupo de participantes de um Workshop Internacional de Linfocinas propôs o termo “interleucina” com o objetivo de desenvolver um “sistema de nomenclatura para nomear estas proteínas estabelecendo como parâmetros as propriedades das proteínas de agir como sinais entre várias populações de leucócitos”.

Como primeiro passo, foram propostos os nomes de “Interleucina 1 ou IL-1” e “Interleucina 2 ou IL-2” para duas citocinas importantes que haviam sido descritas e que já apresentavam uma variedade de nomes. Mesmo assim, o termo “Interleucina” não é perfeito e não deve ser usado de maneira generalizada, devido ao fato de que há várias citocinas que não são produzidas exclusivamente por linfócitos. Algumas destas proteínas também são chamadas de quimiocinas. Para evitar esta confusão foi proposto o termo “citocinas”, que é aceito e utilizado, atualmente, para este grupo de proteínas.

5.3 O que são citocinas?

Em termos gerais citocinas são simples polipeptídeos ou glicoproteínas solúveis que podem formar agregados diméricos (como IL-12) ou triméricos capazes de induzir variadas respostas fisiológicas. Estas proteínas são secretadas por uma ampla gama de células (células gliais, linfócitos, fagócitos, células endoteliais, etc...). Um exemplo clássico é sua produção por leucócitos em resposta a micróbios ou outros antígenos. As citocinas estão caracterizadas por possuir atividades pleiotrópicas agindo em células do sistema imune e participando de respostas inflamatórias devido à expressão dos receptores específicos de citocinas nas membranas citoplasmáticas (ou retidas em regiões especiais na matriz extracelular) em uma variedade de tipos celulares (Figura 5.1).

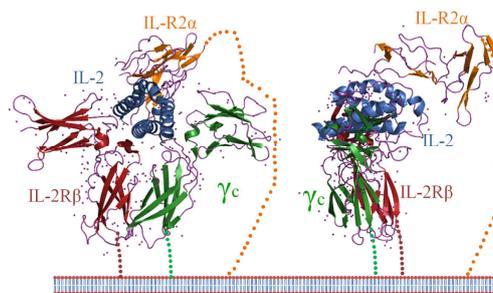


Figura 5.1. Estrutura molecular da interleucina 2 (laranja) ligada às cadeias receptoras α , β e γ_c do receptor de IL2 (IL-2R). Este é um esquema representativo da inserção dos receptores na membrana celular vista de frente e de lado. A combinação destes receptores resulta em modificações na afinidade à IL-2 (IL2R α = baixa afinidade, IL2R β ; e γ_c = afinidade intermediária, IL2R α +IL2R β + γ_c =alta afinidade).

Neste ponto devemos ressaltar que uma das propriedades mais importantes das células do sistema imune, e que vai ser fundamental nos estudos das citocinas, é que uma única célula (por exemplo, um linfócito) dependendo de fatores estimulatórios, estado de ativação, entre outros, pode ser induzida a produzir vários tipos de citocinas simultaneamente.

5.4 Como ocorre a sinalização mediada por citocinas

Avanços significativos têm sido feitos na pesquisa para entender os mecanismos e as vias pelas quais é feita a sinalização mediada pelas citocinas e para explicar como um sinal que inicialmente é extracelular pode ativar cascatas de sinalização intracelular e finalmente ativar a expressão de determinados genes. O processo de compreensão destes processos começou com estudo de ativação

transcricional em resposta a IFN- α e IFN- γ e a partir desse momento ocorre a descrição e identificação das proteínas JAK tirosina-quinases e STAT (transdutores de sinais e ativadores de transcrição) como elementos importantes nas ações do Interferon (Figura 5.2).

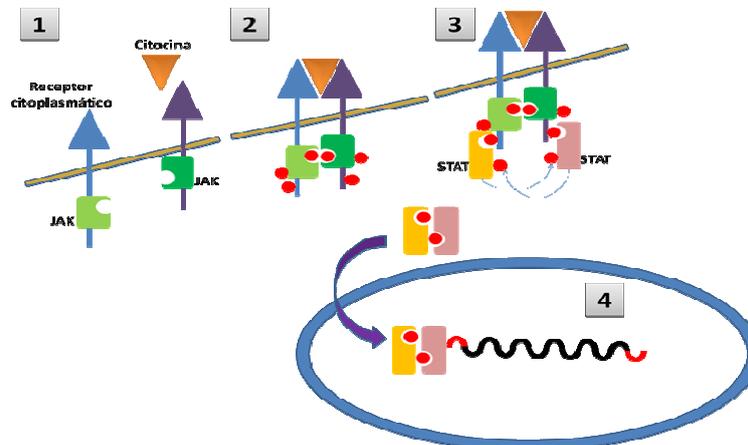


Figura 5.2. Mecanismo de ação das citocinas via receptores associados à JAKs. **1:** Receptores citoplasmáticos desacoplados sem união de citocina extracelular. **2:** Ligação da citocina ativa a dimerização dos receptores citoplasmáticos aproximando as JAKs que se ativam entre si. **3:** STATs se ligam a cada um dos receptores fosforilados sendo fosforilados pelas JAKs já ativadas. **4:** Os STATs fosforilados dimerizam e são translocados ao núcleo ligam-se a regiões de reconhecimento de regiões promotoras de genes que induzem IFN- γ ativando sua transcrição.

A dimerização ou o agrupamento das proteínas sinalizadoras permite que as JAKs interajam fosforilando cruzadamente uma à outra, estimulando sua atividade quinase. Assim como o IFN- γ , muitos receptores de citocinas sinalizam por uma via rápida, utilizando quinases associadas ao receptor para ativar fatores de transcrição específicos.

Devido aos efeitos poderosos das citocinas, todas as vias de sinalização tem que ter um controle rígido, já que qualquer erro na sinalização pode gerar efeitos fisiológicos prejudiciais. Várias estratégias para inibir a sinalização das citocinas garantem que a ativação e a sinalização por determinada citocina seja terminada. Devido ao processo de ativação das vias de sinalização a fosforilação do aminoácido tirosina ser comumente utilizado para marcar o início ou a continuação das reações em cascata, um dos mecanismos frequentemente utilizados para o controle destas vias é a desfosforilação do complexo do receptor pela tirosina fosfatase. Da mesma forma a sinalização por citocinas pode ser finalizada por processos de *feedback* negativo envolvendo inibidores específicos que são induzidos pela ativação de citocinas.

5.5 Propriedades e características das citocinas

Em estados fisiologicamente normais as citocinas são produzidas em níveis baixos ou ausentes (na faixa de quantidades nanomolares a femtomolares) e sua produção poderá estar regulamentada dependendo dos estímulos indutores.

A produção das citocinas é geralmente transitória e área de ação é geralmente curta (agindo de forma autócrina ou parácrina, mas não endócrina), por outro lado a sua ação é mediada pela ligação específica a receptores de superfície das células. Nesse caso o sinal recebido se converte em um sinal intracelular, disparando várias cascatas e reações intracelulares que têm como objetivo modificar a expressão de determinados genes em células alvo específicas. Ao nível fenotípico, a ação das citocinas pode levar ao incremento ou diminuição da proliferação celular, regulação na diferenciação celular e/ou mudanças no comportamento ao executar algumas funções. A estas características nomeamos de pleiotropismo.

Uma das características mais interessantes das citocinas é que elas podem apresentar funções biológicas redundantes, o que é observado em várias citocinas (i.e. IL-2 e IL-15 são capazes de induzir a proliferação de linfócitos T). Outra propriedade das citocinas é que elas podem agir nas células por sinergismo (por exemplo, IFN- γ dos linfócitos e TNF- α dos macrófagos podem induzir a maior expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I, em vários tipos celulares). Por outro lado, este tipo de comportamento pode ser observado no sentido contrário apresentando-se o fenômeno de antagonismo (IFN- γ é capaz de induzir a ativação de macrófagos, enquanto IL-10 a inibe). Assim, as citocinas podem trabalhar em conjunto ou podem ter efeitos opostos podendo ainda induzir a produção de outras citocinas (Figura 5.3). Uma das diferenças entre citocinas e fatores de crescimento é que as primeiras não são produzidas constitutivamente enquanto as segundas são. Outra diferença importante é que, devido ao grande impacto que as citocinas têm no funcionamento celular, sua produção é altamente controlada, diferentemente dos fatores de crescimento. Além destas propriedades, as citocinas atuam de maneira autócrina – quando atuam na própria célula produtora; parácrina – quando agem em células vizinhas; e endócrina – quando vão atuar em células em órgãos distantes.

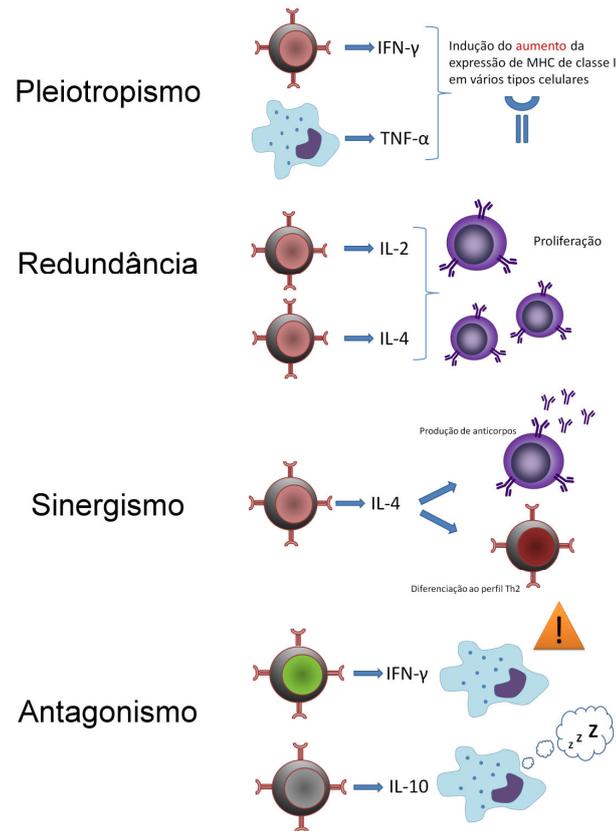


Figura 5.3. Propriedades das citocinas.

5.6 Classes de Citocinas e suas funções

Como descrito anteriormente as citocinas podem ter uma ampla gama de funções a nível fisiológico. Embora muitas citocinas possam agir de formas diferentes, elas podem ser agrupadas dependendo da associação ao tipo de resposta imunológica, participando como mediadoras da imunidade inata (incluindo às quimiocinas); ou da imunidade adaptativa; e ainda agindo como estimuladoras da hematopoiese. Em grupos específicos de citocinas elas podem ser caracterizadas por seu papel pró-inflamatório, anti-inflamatório, regulador ou ainda dependendo das relações filogenéticas e de semelhança estrutural que elas possuam (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Agrupamento típico para os tipos de citocinas mais importantes.

<u>Citocinas</u>	
Mediadoras da imunidade inata natural	TNF- α , IL-1, IL-10, IL-12, Interferons de Tipo 1, IFN- γ e Quimiocinas
Mediadores da imunidade adaptativa	IL-2, IL-4, IL-5, TGF- β , IL-10 e IFN- γ
Estimuladores de hematopoíese	GM-CSF, M-CSF, G-CSF.

Descreveremos a seguir a função biológica de quatro citocinas “chave” no contexto da resposta imune - IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10. Uma das citocinas mais estudadas devido à importância que representa para o controle de micro-organismos intracelulares é o IFN- γ . Esta citocina pertence a uma família de citocinas que estão estruturalmente relacionadas (família dos interferons). Seu nome está relacionado com seu envolvimento no controle e resistência à replicação viral e de outros micro-organismos em células não infectadas (“interfere”). Por esta razão muitas vezes é considerada como um marcador de proteção ou um marcador de resposta pró-inflamatória responsável pelo controle de parasitos. Esta citocina pode induzir a expressão de MHC de classe I e II incrementando a capacidade das células de apresentar antígenos estranhos, permitindo o reconhecimento das células infectadas por parte dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL). O IFN- γ pode exercer também um papel importante na ativação de células NK ao trabalhar sinergicamente com IL-12 e TNF, que têm a capacidade de eliminar seletivamente células infectadas. Esta citocina também é responsável pela ativação de macrófagos infectados por alguns protozoários – leishmanias e tripanosomas, tornando-os capazes de destruí-los. Uma das funções mais importantes desta citocina é sua participação no desenvolvimento das células Th1 em humanos.

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é considerado um poderoso mediador da inflamação em resposta à infecção por patógenos. Por outro lado, quando produzido em excesso devido a uma resposta inflamatória, pode participar em processos como a febre, a indução da secreção de proteínas de fase aguda no fígado podendo levar a complicações sistêmicas. A principal ação biológica do TNF é estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os lugares da infecção estimulando, por sua vez, a eliminação dos micro-organismos nessas regiões. Esse recrutamento é feito pela indução de células endoteliais a expressar moléculas de adesão e

quimiocinas que aumentam a afinidade de integrinas a seus ligantes, direcionando as células aos lugares da infecção.

Já a produção da interleucina-4 (IL-4) está restrita a linfócitos T ativados, mastócitos, basófilos e eosinófilos. A IL-4 é capaz de induzir funções biológicas específicas em um amplo grupo de células incluindo células dendríticas e linfócitos B. Dentre suas funções principais encontram-se estimular a produção de anticorpos IgE e de induzir o desenvolvimento do fenótipo Th2, a partir de células CD4 naíve, sendo de fato considerada como a citocina característica do perfil de resposta Th2 envolvida com diferentes efeitos estimuladores e supressores em vários tipos celulares.

A IL-10 é uma citocina que tem efeitos pleiotrópicos na imunoregulação e inflamação. Esta citocina é produzida por vários tipos de linfócitos T CD4⁺ incluindo algumas subpopulações de Th2, Th1 e células T reguladoras (Tregs), células B, timócitos e mastócitos. Devido a sua capacidade reguladora é capaz de bloquear a ativação da síntese de citocinas associadas ao perfil de resposta imunológica Th1 (proinflamatórias IFN- γ , TNF, IL-2, etc), monócitos ativados e células NK. Esta citocina é um importante inibidor de macrófagos ativados e pode inibir a expressão de moléculas coestimuladoras além de inibir a expressão das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II (MHC I e MHC II). IL-10 pode também estimular/incrementar a proliferação de células B, timócitos e mastócitos. Adicionalmente, pode cooperar com o TGF- β (Fator de Transformação do Crescimento- β) para estimular a produção de IgA por células B. Na Tabela 5.2 encontra-se a descrição de outros tipos de citocina, os tipos celulares que podem produzi-las e os efeitos que produzem em alguns tipos celulares no sistema imune.

5.7 Papel das citocinas no controle de doenças parasitárias

As citocinas podem intervir nos processos patogênicos por parasitos ajudando na eliminação dos parasitas ou evitando sua eliminação. De fato, já foi descrito que mudanças na produção de certo tipo de citocinas pode ser induzida pelos próprios parasitos para evitar sua eliminação pelo sistema imune. Por esta razão, alguns processos patogênicos são produzidos pelo excesso de algum tipo de citocina induzida em resposta à infecção parasitária.

Para verificar o papel que as citocinas têm nas infecções por micro-organismos apresentamos algumas doenças parasitárias onde a polarização da resposta imune pode levar a diferentes cenários mostrando - o controle efetivo dos parasitos sem causar dano ao hospedeiro; aonde o parasito induz uma resposta imune que evita sua eliminação pelo hospedeiro; e aonde, apesar de existir um controle dos parasitos, há

também aparição de manifestações clínicas devidas ao excesso de citocinas no organismo.

A primeira doença parasitária a ser apresentada é a Leishmaniose cutânea. As leishmanioses são produzidas por parasitos do gênero *Leishmania* e afetam atualmente 350 milhões de homens, mulheres e crianças de 88 países em todo o mundo. Estas doenças estão caracterizadas por apresentarem um amplo espectro de manifestações clínicas sendo as mais comuns: a leishmaniose visceral e as leishmanioses tegumentares (dentro da qual se encontra as forma cutânea e mucocutânea da doença – leishmaniose tegumentar Americana (LTA)).

Nesta forma cutânea a lesão se inicia no local de aonde o flebótomo fêmea fez o repasto sanguíneo. A partir desse momento forma-se uma pápula que após um tempo evolui para uma úlcera em aproximadamente 80% dos casos. O processo imune da resposta contra *Leishmania* começa no momento em que o flebótomo pica o hospedeiro. A picada gera uma resposta inflamatória que envolve a migração de vários tipos celulares, principalmente macrófagos e linfócitos. Células dendríticas e queratinócitos também participam no processo inflamatório apresentando antígenos em receptores do complexo de histocompatibilidade principal (*Major Histocompatibility complex* MHC) de classe II, além de expressar moléculas de adesão necessárias à migração e aglomeração de células inflamatórias. Neste ponto, macrófagos tissulares secretam citocinas mediadoras da inflamação como a interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-12, e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a proteína C3 do complemento. TNF- α e IL-1 atuam como pirógenos endógenos, ativando o endotélio vascular e permitindo o extravasamento de leucócitos e sua migração ao endotélio. A partir deste ponto, a evolução da infecção pode tomar vários rumos dependendo dos tipos de células, tipos e quantidades de citocinas envolvidas na resposta imune e a espécie de *Leishmania* envolvida no processo patogênico, que como mencionado anteriormente, está diretamente relacionada com o tipo de manifestação clínica.

No caso da leishmaniose cutânea apresenta-se um cenário aonde há um equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , responsáveis pela ativação de macrófagos levando-os ao controle dos parasitos; e citocinas reguladoras, principalmente IL-10, responsáveis por antagonizar os efeitos nocivos das citocinas pró-inflamatórias. No caso da leishmaniose mucosa (LM) há uma polarização da resposta imune voltada para o tipo pró-inflamatório (ou pólo hiperérgico da doença). A LM é produzida principalmente por *L. braziliensis*, a espécie responsável pelo maior número de casos de LTA no Brasil. Nesta forma clínica, existe uma forte resposta celular do tipo 1 com uma grande quantidade de citocinas proinflamatórias como IFN- γ

e TNF- α que promovem a ativação de macrófagos e, conseqüentemente, o controle da multiplicação intracelular dos parasitos. Junto com a forte resposta celular ocorre baixa produção de IL-10, uma citocina reguladora. Neste caso há uma eliminação completa dos parasitos, porém, devido à alta produção de citocinas pró-inflamatórias, ocorre uma hiper-reatividade na resposta imune por parte do organismo, refletiva nos graves danos teciduais observados nesta forma clínica da doença.

No polo oposto, em que há uma polarização da resposta imune para o lado regulador está a leishmaniose cutânea difusa (LCD). No Brasil a LCD é causada por *L. amazonensis* e representa o polo anérgico da LTA. Esta forma clínica é caracterizada pela ausência de resposta imune Th1 específica para *Leishmania*, pela quantidade de parasitos e de macrófagos infectados nas lesões; pelos altos títulos de anticorpos séricos anti-*Leishmania*, que geralmente superam os encontrados nas outras formas clínicas de LTA; e pela alta produção de IL-10 (de efeitos reguladores). A ausência de uma resposta imune de células T eficiente (em parte devido à regulação da IL-10) favorece a multiplicação dos parasitos nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, e o acúmulo destas células, encontradas em grande número nas lesões de pacientes que apresentam esta forma clínica.

Outra doença parasitária, na qual as manifestações clínicas estão relacionadas com o tipo de citocina induzido em resposta aos parasitos, é a malária, especialmente na malária cerebral. Neste caso a influência de citocinas pró-inflamatórias é responsável por alguns dos sintomas mais importantes na patogenia desta doença.

A malária ocorre em mais de 100 países e 40% da população mundial vive em áreas de risco de adquirir a doença. A cada ano 500 milhões de pessoas são infectadas, a maioria delas na África subsaariana, e mais de um milhão de pessoas morre dessa doença, principalmente crianças com idade inferior a cinco anos. No Brasil, foram registrados 334.004 casos em 2010, sendo que 98% desses casos ocorrem na Amazônia legal.

A malária cerebral é uma complicação da malária na qual o paciente apresenta incremento no volume do cérebro, provavelmente devido à sequestração de eritrócitos parasitados e uma vasodilatação que ajuda a compensar a obstrução dos microvasos. Este bloqueio interrompe o fluxo sanguíneo levando a uma queda na oxigenação e nutrição nas áreas afetadas do cérebro. Parece que este fenômeno apresenta-se em todos os pacientes com malária cerebral, porém há outras complicações associadas a esta doença. Tem sido demonstrado que produtos que provêm dos parasitos, material celular dos hospedeiros, pigmentos maláricos e complexos de antígeno-anticorpo

podem estimular os macrófagos, monócitos e células endoteliais a produzir citocinas. Acha-se que as citocinas podem estar relacionadas com disfunção placentária, supressão de eritrócitos, disfunção hepática, inibição de gluconeogênese e, no caso do TNF- α , com a febre.

Outras citocinas que estão envolvidas no controle dos parasitos, porém parecem ter relação com a gravidade da malária cerebral são IL-1, IL-6, IFN- γ (pela indução da secreção de TNF- α e IL-1 β). Apesar disto, as citocinas continuam sendo um fator determinante no controle dos parasitos, pois elas ativam os leucócitos e provavelmente outros tipos celulares para produzir agentes como o óxido nítrico e peróxidos lipídicos. Outro ponto importante é que muitas vezes a ausência ou baixa expressão de citocinas reguladoras ou antiinflamatórias pode levar a complicações nesta doença.

Exemplo de como os parasitos podem induzir respostas imunes do tipo Th2 (ou antiinflamatória), pode ser observado na infestação causada por helmintos. Quando esses nematódeos infectam um organismo mamífero ocorre um direcionamento para resposta do tipo Th2 que pode ser caracterizada, em termos mais amplos, por uma ativação de eosinófilos, basófilos e mastócitos, uma alta produção de IgE e a proliferação de linfócitos Th2 secretores de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Ao contrário do grande conhecimento da resposta imune de tipo Th1, devido a seu envolvimento no controle de parasitos intracelulares, a resposta do tipo Th2 não tem embasamento evolutivo muito claro e, por tanto, não está bem estabelecido um modelo imunológico. De fato só recentemente foram descritos os mecanismos moleculares capazes de ativar esse tipo de respostas.

No contexto da pesquisa com vacinas, a produção de citocinas e, principalmente a produção diferenciada de algumas delas, pode indicar alguns tipos de respostas relacionadas com proteção contra alguns organismos patogênicos. Um exemplo claro desta situação é encontrada na pesquisa com vacinas contra a leishmaniose, hepatite, HIV e tuberculose. Uma das populações de células descrita que oferece informações importantes na avaliação do estado imune de pacientes infectados por parasitos ou no teste de candidatos vacinais é o grupo de células multifuncionais. Estas multifuncionais são linfócitos capazes de produzir ao mesmo tempo três tipos de citocinas (IFN- γ , IL-2 e TNF- α). Na avaliação direta destas populações celulares, por exemplo, utilizando um *booster* de vacina de hepatite B mostrou que a avaliação de proteção, usando uma citocina como único parâmetro de proteção, não era confiável. Medindo o IFN- γ e IL-12 produzidas por linfócitos T CD4⁺ mostraram que, várias células T antígeno-específicas produziam IL-2, mas não IFN- γ .

De fato, somente a metade dos linfócitos que respondia à vacina era capaz de produzir IFN- γ . Outro exemplo interessante foi observado quando vários parâmetros dos linfócitos foram avaliados em pacientes infectados com HIV progressores e não-progressores. Nos pacientes não-progressores foi descrito que apresentavam uma maior proporção de células T CD8⁺ multifuncionais HIV-específicos quando comparados com os pacientes progressores e que essa alta proporção de células multifuncionais estava inversamente correlacionada com a carga viral. Por último, já foi descrito nas leishmanioses que as células multifuncionais eram capazes de produzir maior quantidade de IFN- γ e que os antígenos capazes de induzir essas células multifuncionais eram mais efetivos, indicando de certa forma que existe uma maior eficiência na resposta imune induzida por essas células multifuncionais.

5.8 Por que marcar citocinas na citometria de fluxo?

A citometria de fluxo é a única técnica capaz de oferecer uma análise integrada de variáveis imunológicas a partir de uma única célula. Esta característica faz com que seja capaz de identificar acuradamente várias populações celulares produtoras de citocinas, simultaneamente, permitindo quantificar a imunogenicidade e facilitar a comparação destas populações celulares em situações particulares, como nos testes para candidatos vacinais.

5.9 O uso de protocolos de marcação e função dos reagentes utilizados (saponina, brefeldina, anticorpos monoclonais anti-citocina)

A produção de citocinas por parte das células tem sido tradicionalmente avaliada utilizando técnicas imunoquímicas. Atualmente essa avaliação pode ser efetuada individualmente para as células utilizando a citometria de fluxo. Este tipo de avaliação é importante e inclusive pode ser utilizado para diferenciar fenótipos celulares. Um exemplo claro é a utilização do perfil de produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺, subdividindo-os em células com perfil Th1 - com características pró-inflamatórias ou linfócitos Th2 - com características anti-inflamatórias. Utilizando a técnica de citometria de fluxo podemos definir quais citocinas estão sendo produzidas e que populações celulares as estão produzindo.

Observação: A citometria de fluxo permite determinar o percentual de células produtoras da determinada citocina, mas não quantifica a citocina que está sendo liberada ao meio extracelular. Para obter esse tipo de informação recomenda-se o uso da técnica ELISPOT ou ELISA.

Como a produção de citocinas ocorre no interior da célula, a marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos se dá intracelularmente. Neste contexto os protocolos citofluorimétricos necessitam de etapas de fixação e permeabilização da membrana plasmática.

5.9.1 Fixação

O processo de fixação de células apareceu no campo da histologia devido à necessidade de preservar a estrutura das células enquanto eram feitas colorações e manipulações nos tecidos estudados. A maior parte da ação dos fixadores é exercida nas proteínas celulares tendo efeitos desnaturantes, precipitantes ou de estabelecimento de uniões cruzadas. Estes efeitos são dependentes tanto do tipo do fixador quanto da concentração em que eles são utilizados.

Para a Citometria de Fluxo são utilizados fixadores que formem uniões cruzadas (como o paraformaldeído). Estes formam “pontes intermoleculares”, através de grupos amino. Isto faz com que seja criada uma rede estável de moléculas unidas que ajudam a preservar melhor a integridade das células mantendo-as quase inalteradas.

Enquanto a estrutura de algumas proteínas e a atividade de algumas enzimas permanece inalterada após fixação, pode acontecer que algumas estruturas protéicas de interesse fiquem alteradas. Por esta razão é uma prática comum realizar a fixação após marcações de moléculas na superfície celular. Com a fixação das células, a fluorescência e as propriedades de dispersão da luz dos lasers no citômetro se mantêm estáveis, e no caso das marcações de superfície, permite conservar as células por vários dias até o momento da aquisição no citômetro. No caso das marcações intracelulares é necessário que a aquisição das amostras seja feita, preferencialmente em até 8 horas após a marcação.

Nota: Nos ensaios de citometria em que é importante a manutenção das células viáveis, **não se deve** realizar a fixação.

Os dois tipos de fixadores que são comumente utilizados na citometria são o formaldeído e o paraformaldeído (PFA), sendo este o mais utilizado.

Precaução: O PFA é um agente suspeito de ser carcinogênico. Quando ingerido por via oral, a dose letal 50 LD₅₀ em ratos é de 592 mg/kg.

Tabela 5.2. Funções das principais citocinas

Citocina	Célula Produtora	Efeitos					Observações
		Células B	Células T	Macrófagos	Células Hematopoiéticas	Outras Células	
IL-2	T naïve, Th1, tipos de CD8	Diferenciação + crescimento e síntese de cadeia J	Proliferação, sobrevivência	Induz produção de TNF, inativação por indução da produção de TGF-β	Estimula proliferação, diferenciação e atividade citolítica de NK	Monócitos: estimula atividade citotóxica contra alvos tumorais, Neutrófilos: aumenta atividade antifúngica	-
IFN-γ	Th1, CTL, NK	Diferenciação. Síntese de IgG2a (camundongo)	Promove Th1 em células T naïve. Inibe crescimento celular de Th2	Ativação, ↑MHC classe I e II, induz produção de intermediários de oxigênio e nitrogênio ativados	Ativa NK	Inibição de proliferação em fibrosarcomas humanos e fibroblastos murinos. Induz atividade bactericida em fagócitos profissionais. ↑MHC classe I e II	Forte Atividade antiviral, bactericida e antiparasitária
IL-12	Macrófagos, Células Dendríticas	-	Ativação Th1 e CD8, Induz produção de IFN-γ. Em CD8 aumenta capacidade citotóxica	Ativação	Ativação de NK, Induz produção de IFN-γ, aumento atividade citotóxica	-	Principal mediador da resposta imune inata inicial. Erradicação de microorganismos intracelulares
Linfotóxina (LT, TNF-β)	Th1, tipos de CTL. Afeta diferenciação de NKT	Inibição	Eliminação	Ativação. Indução de produção de radicais NO	↑Mastócitos. Afeta diferenciação de NK	-	Atividade antitumoral e antiviral
IL-4	T naïve, Th2, células de Mast, eosinófilos e basófilos, NK, NKT	Ativação, crescimento, IgG1, <i>switch</i> isotipo a IgE, ↑MHC classe I	Crescimento, sobrevivência	Inibição da ativação mediada por IFN-γ	-	Proliferação células de Mast	Atividade anti-inflamatória
IL-5	Th2 e células de Mast ativadas	Camundongo: ≠ e síntese de IgA	Facilita colaboração com resposta mediada por eosinófilos	-	-	Ativador de eosinófilos	-
TNF-α	Fagócitos mononucleares ativados, Th1, alguns Th2, CTL	-	-	Secreção de quimiocinas, estimula atividade microbicida	-	Recrutamento de neutrófilos e monócitos nos lugares de infecção mediando. Estimula eliminação de microorganismos. Induz expressão de moléculas de adesão e quimiocinas em células endoteliais. Pode induzir apoptose.	Quando produzido em excesso devido a infecções severas → febre, choque séptico, hipoglicemia).
IL-10	Macrophagos, linfócitos T	↑MHC classe II	Inibe Th1, inibe produção de IFN-γ	Inibe produção IL-12	Coestimula crescimento mastócitos	Células dendríticas: inibe produção citocinas	Regula atividade pró-inflamatória
TGF-β	CD4, Tregs	Estimula <i>switch</i> de classe a IgA	Inibição de proliferação e ativação. Regulação de algumas subpopulações de células T.	Inibição de proliferação e ativação	-	-	Atividade reguladora
IL-17	Th17, macrófagos	Inibe crescimento, <i>switch</i> a IgA	Inibe crescimento, promove sobrevivência	Inibe ativação	Ativa neutrófilos	Regula crescimento celular	Atividade pró-inflamatória
GM-CSF	Th1, algumas Th2 e CTL, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Diferenciação	-	Ativação, diferenciação células dendríticas	↑ de granulócitos, macrófagos e células dendríticas	-	Estimulante para recuperar células após transplante de medula e quimio/radioterapia

5.9.2 Permeabilização da membrana celular

Devido ao fato de que as citocinas são produzidas intracelularmente, uma marcação direta por meio de anticorpos monoclonais anticitocinas sem que haja a permeabilização da membrana celular não será eficiente. Por tanto, a única forma do anticorpo monoclonal penetrar no citoplasma celular é submeter as células a algumas substâncias permeabilizantes, como os detergentes (Triton X; NP40; saponina); os álcoois (etanol; metanol). Podem ser utilizados agentes desestabilizantes das camadas bilipídicas, como os detergentes e surfactantes, para conseguir abrir poros que permitam o acesso dos anticorpos monoclonais anticitocina. Destes compostos detergentes o mais utilizado nos protocolos citofluorimétricos de marcação intracelular de citocinas é a saponina, a qual possui a capacidade de permeabilizar as membranas celulares sem danificar a sua integridade permitindo marcações simultâneas de moléculas na superfície celular (imunofenotipagem).

As moléculas de saponina são semelhantes às moléculas de colesterol contendo grupos de açúcar. Estas moléculas são produzidas por vários tipos de plantas nas quais agem como mediadoras da resistência a patógenos. Possuem grandes regiões lipofílicas que se inserem nas membranas celulares e interagem com os esteróis, fosfolipídios e proteínas, interrompendo as ligações naturais existentes entre as moléculas de colesterol e os fosfolipídios. Este tipo de interações cria estruturas na membrana com forma de anel com poros de 12-15 nm de diâmetro, os quais permitem a entrada de outras macromoléculas (no nosso caso os anticorpos monoclonais anticitocina conjugados aos fluorocromos). Experimentos envolvendo microscopia eletrônica têm mostrado que o tratamento das células com saponina é uma das formas mais brandas de induzir permeabilização das células sem danificar as membranas celulares. Tudo isto porque a formação dos poros, nas células tratadas com saponina, é reversível. Característica crítica na marcação intracelular de citocinas, pois as citocinas somente estarão disponibilizadas para serem marcadas quando as membranas estiverem permeabilizadas e uma vez os poros forem fechados, devido à remoção da saponina, o acesso dos anticorpos às citocinas fica completamente interrompido.

Observações Biossegurança:

Pode ser prejudicial. Irritante ao contato com os olhos, vias respiratórias e pele.

5.9.3 Brefeldina

Com o intuito de impedir a liberação da citocina produzida, visando a amplificação da detecção destas proteínas pelo citômetro, alguns bloqueadores de transporte de proteínas são adicionados nestes protocolos. O mais utilizado é a Brefeldina A, que é um metabólito descrito inicialmente como um antibiótico. Ela é produzida por fungos como o *Eupenicillium brefeldianum* e é capaz de bloquear o transporte de proteínas desde o retículo endoplasmático ao aparato de Golgi. Justamente por esta particularidade, que tem sido utilizada na biologia celular e na citometria de fluxo. No estudo de produção de citocinas intracelulares, a brefeldina é o reagente que permite que as citocinas produzidas pelas células após um estímulo qualquer (vacinas, peptídeos, fármacos, etc.), não sejam secretadas ao espaço extracelular, deixando-as imobilizadas nos compartimentos intracelulares prontas para serem marcadas com os anticorpos monoclonais.

Biossegurança:

Prejudicial se inalado, ingerido ou se entrar em contato com os olhos. Dose letal LD50 em camundongos por via intraperitoneal 250 mg/Kg.

CAPÍTULO 6. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS

Tatiana Pereira da Silva

As citocinas têm sido avaliadas em diferentes condições patológicas, as quais incluem doença cardiovascular, doenças infectoparasitárias, câncer e doenças autoimunes. Em alguns casos, a análise de suas concentrações em fluidos corpóreos, ou de sua produção intracelular, pode caracterizar-se como marcadores de prognósticos.

Com a finalidade de auxiliar os estudos imunológicos na caracterização e descobertas de potenciais funções das citocinas, as indústrias de produtos biológicos vêm investindo em tecnologia e desenvolvendo kits que facilitam e aperfeiçoam a detecção destes alvos.

6.1 ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*)

O método de ELISA (ensaio imunoenzimático) é um teste que permite a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo, esta metodologia vem sendo utilizada nas últimas décadas na clínica, para diagnósticos laboratoriais, e na área de pesquisa. O aprimoramento e otimização do método de ELISA, considerado “padrão ouro” para alguns exames e testes laboratoriais, vêm permitindo o surgimento de novas tecnologias e metodologias capazes de quantificar em um único experimento um número elevado de diferentes citocinas, em o que não era possível com o método de ELISA convencional. Além disto, a redução das quantidades de material biológico necessárias nas novas metodologias é outro importante avanço (aproximadamente 100µl de amostra).

O kit Multi-Analyte ELISArray™ KITS, por exemplo, é capaz de quantificar 12 citocinas ou quimiocinas em um único experimento. Já o kit comercial Quantibody® Arrays (Glass Based) baseia-se no método de ELISA, mas esta técnica utiliza lâminas como base do método e a leitura é realizada em aparelho de microarray (método molecular), que não é um espectrofotômetro convencional, podendo-se chegar a uma quantificação de até 200 citocina/quimiocinas por teste.

Outra metodologia disponível para a quantificação de citocinas baseia-se em microesferas (*beads*) e sua leitura é feita em citômetro de fluxo. Esta técnica tem como objetivo analisar vários parâmetros imunológicos, citocinas, no caso, pois emprega uma série de partículas com discretas intensidades de fluorescência para detectar simultaneamente várias citocinas solúveis.

A sensibilidade e a especificidade do citômetro de fluxo, para a detecção de fluorescência é utilizada aqui para a quantificação de citocinas solúveis, em um imunoensaio. As *beads* são recobertas por anticorpos que reconhecem citocinas específicas;

a junção de *beads* com diferentes especificidades permite a detecção de múltiplas citocinas utilizando-se um pequeno volume de amostra.

São várias as vantagens desta técnica, entre elas o uso da citometria de fluxo como ferramenta de análise para a detecção das *beads*, a qual permite a discriminação de diferentes partículas com base no tamanho e na cor (fluorescência). Além disto, a análise eficiente de várias citocinas usando-se volumes menores e amostras menos concentradas e num tempo mais reduzido, em comparação ao ELISA convencional são outras importantes vantagens desta metodologia.

Diferentes kits de detecção de citocinas, com base/semelhança no método de ELISA, que utilizam *beads* em seus protocolos, encontram-se disponíveis comercialmente, como o Multiplex Kits, o MILLIPLEX MAG, o CBA, entre outros.

6.2 Cytometric Bead Array System – Kit CBA

O Kit CBA (*Cytometric Bead Array System*) é uma técnica desenvolvida pela BD-Biosciences para a detecção de citocinas usando *beads* acopladas a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. O desempenho do kit foi otimizado para análise de citocinas específicas em sobrenadantes de cultura de tecidos, plasma de amostras de sangue coletados em presença de EDTA e amostras de soro. O kit de CBA II pode ser usado para medir quantitativamente os níveis de Interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), Interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon- γ (IFN- γ), em uma única amostra.

A metodologia usada no kit CBA tem como fundamento *beads* conjugadas com anticorpo de captura, na qual seis populações de *beads*, com diferentes intensidades de fluorescência, conjugadas a um anticorpo de captura específico para cada citocina, foram misturadas para formar o CBA e são lidas em canal FL-3 no citômetro de fluxo. As populações de *beads* são observadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante (Figura 6.1).

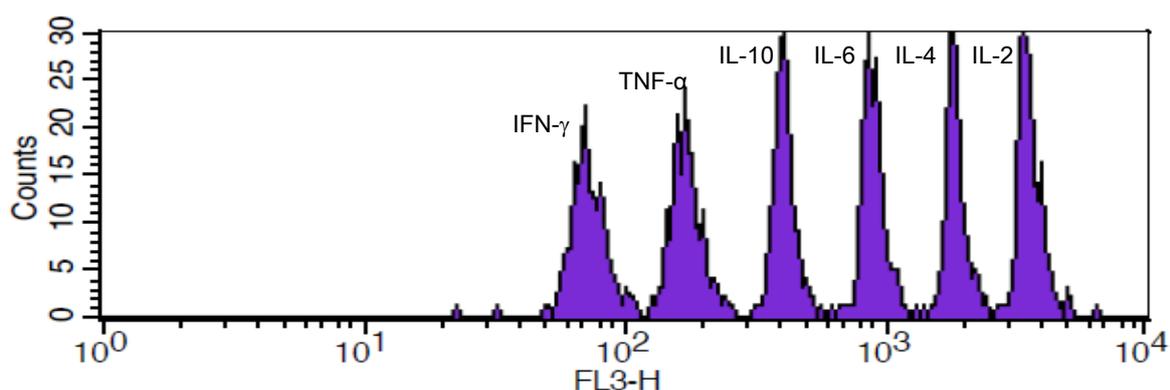
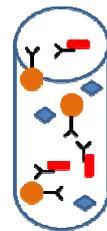


Figura 7.1- Histograma da distribuição das seis populações de *beads* em função de suas diferentes intensidades de fluorescência.

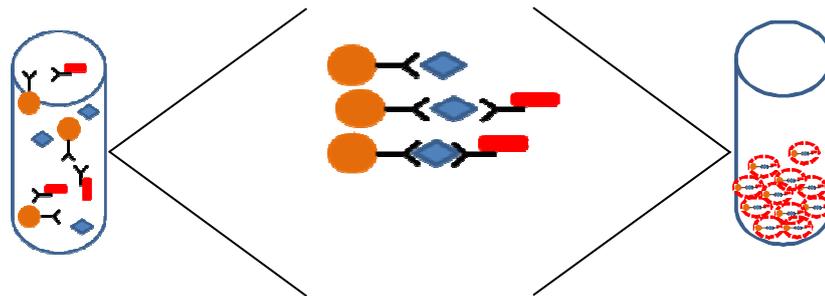
No CBA, as *beads* de captura são incubadas com as amostras e misturadas com o anticorpo de detecção, conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE), para formar o ensaio "em sanduíche".

1- Incubação *beads*, amostra e Ac de detecção conjugado com PE.



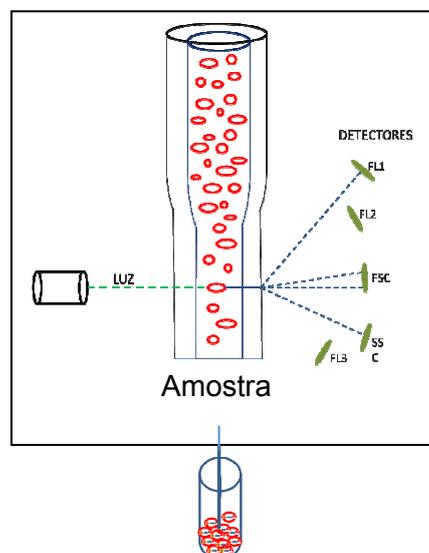
- Bead* de captura
- Amostra
- Ac de detecção conjugado com PE

2- Incubação por 3 horas.



3- Após formar o sanduíche, os tubos estão prontos para serem analisados em citômetro de fluxo.

Citômetro de fluxo



Antes da aquisição das amostras, o citômetro de fluxo deve ser calibrado e seus canais/filtros precisam ser ajustados. O fabricante do kit disponibiliza em seu site uma janela que permite fazer a calibração, como aquela observada na Figura 6.2.

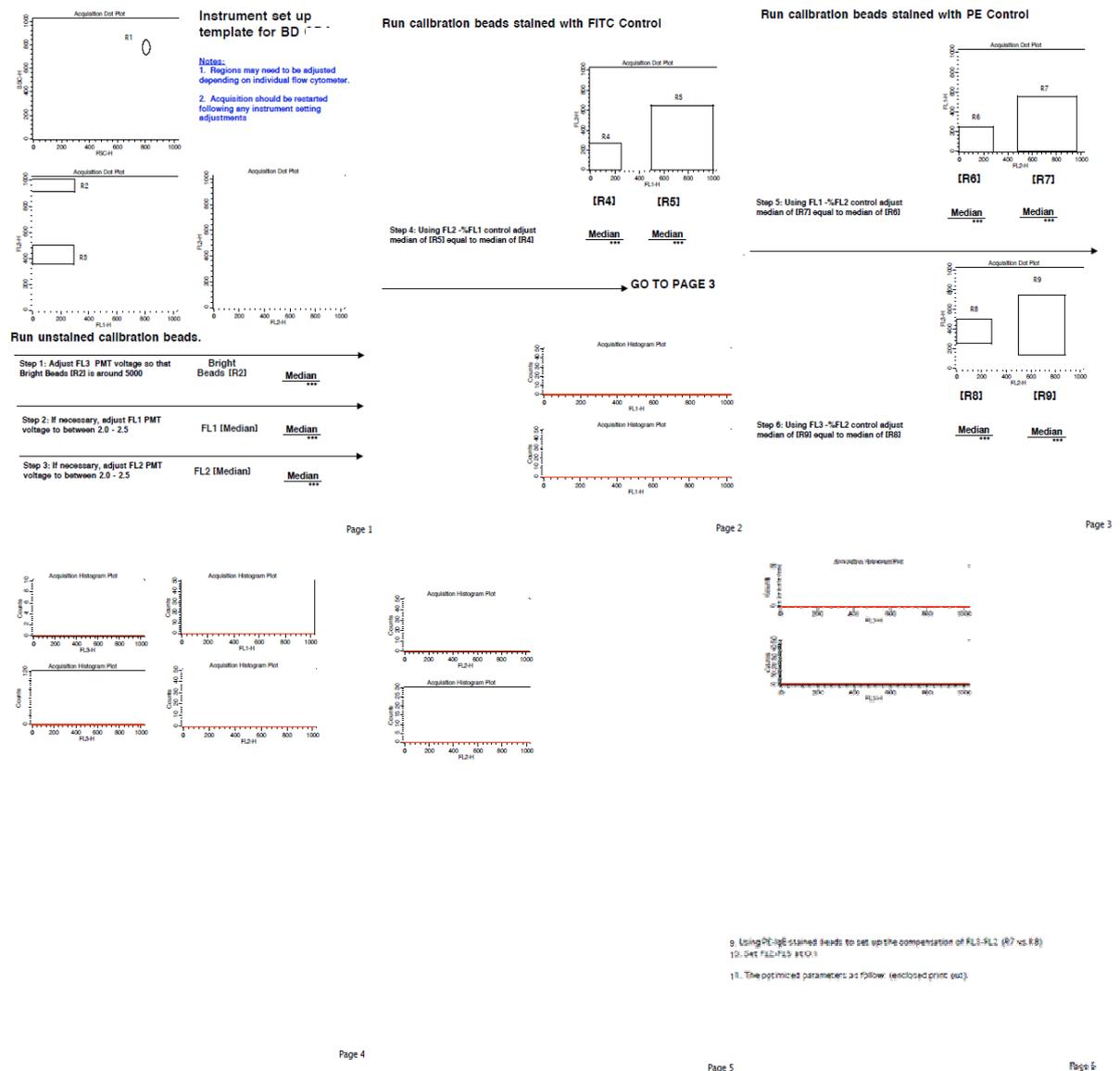


Figura 6.2. Janela para calibração dos canais/filtros do citômetro, utilizando-se as *beads* de calibração inclusas no kit CBA.

Após a calibração dos canais/filtros, recomenda-se realizar a aquisição da curva padrão, também fornecida pelo kit, para posterior aquisição das amostras e análise dos resultados. Os dados são gerados em formato de gráfico (*dotplot* ou histograma). A curva tem uma variação de concentração de 0 a 5000 pg/mL e à medida que as concentrações vão aumentando, as *beads* vão se deslocando para a direita, como pode ser observado na Figura 6.3 (seta branca).

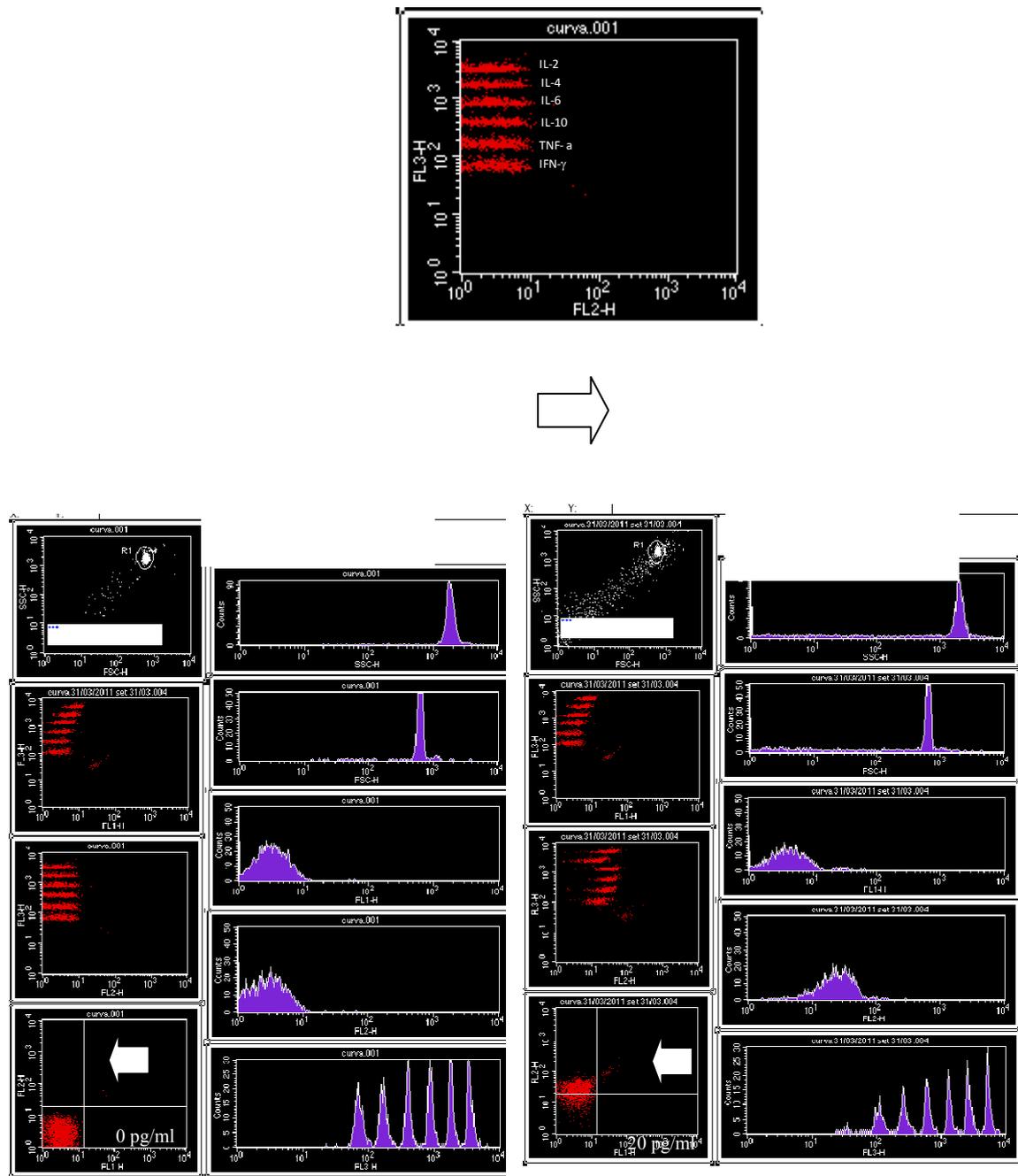


Figura 6.3. *Dot plots* e histogramas utilizados para visualizar a aquisição da curva padrão no software CellQuest-BD. Em destaque duas concentrações avaliadas (0pg/ml e 20pg/ml), observando-se o deslocamento das *beads* para a direita, em função do aumento da concentração (setas).

Para a aquisição das amostras, usa-se a mesma janela da aquisição do padrão. Na Figura 6.4, encontra-se um exemplo de uma amostra positiva para a IL-6.

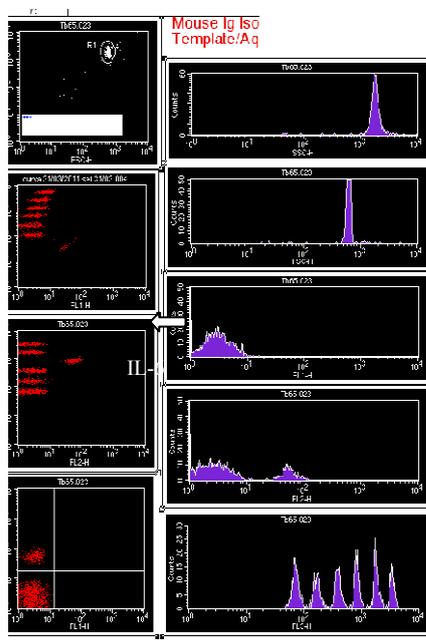


Figura 6.4. *Dot plots* e histogramas utilizados para visualizar a aquisição das amostras no software CellQuest-BD. Em destaque a expressão positiva da interleucina 6 (seta).

Após a aquisição das amostras, os dados são importados para planilhas do software Excel e as análises podem ser feitas pelo software de análise do fabricante do kit ou no próprio Excel.

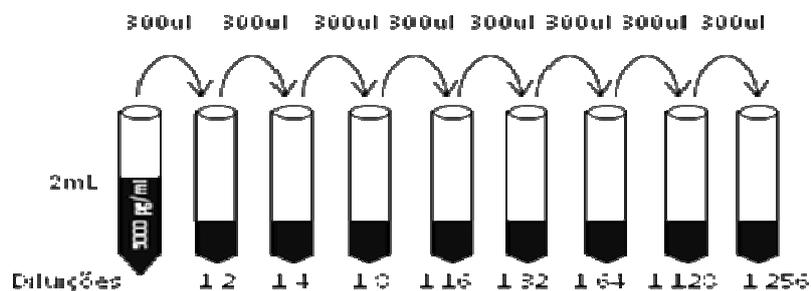
6.3 Protocolo de utilização do Kit CBA

- 1- Homogeneizar cada tubo de *beads* em aparelho de vórtex antes de fazer o mix de *beads*;
- 2- Preparar um mix com 10 μ L de cada suspensão de *bead* (homogeneizar no aparelho);
- 3- Centrifugar a suspensão e remover o sobrenadante;
- 4- Ressuspender o pellet de *beads* em tampão enriquecido com soro (fornecido pelo kit) com o mesmo volume removido, homogeneizar em aparelho e incubar por 30 minutos à temperatura ambiente;
- 5- Transferir 50ul do mix de *beads* para cada um dos novos tubos (podem ser tubos de citometria),

- 6- Adicionar o reagente de detecção PE (50µL/por teste) no tubo contendo as beads;
- 7- Adicionar 50 µL/por teste de amostra no tubo contendo o PE e as beads,
- 8- Incubar por 3 horas à temperatura ambiente;
- 9- Adicionar tampão de lavagem (fornecido pelo kit) em cada tubo, homogeneizar por aparelho, centrifugar, desprezar o sobrenadante e ressuspender em tampão de lavagem;
- 10- Adquirir as amostras em citômetro de fluxo e analisar.

Preparação dos padrões:

1. Reconstituir os padrões em diluente (fornecido pelo kit) por 15 minutos;
2. Fazer diluição seriada dos padrões usando o diluente (proteger da luz);



3. Transferir 50 µL de cada diluição do padrão para o tubo contendo 50 µL de mix de *beads* e 50 µL de reagente de detecção PE;
4. Incubar por 3 horas à temperatura ambiente;
5. Adicionar tampão de lavagem (fornecido pelo kit) em cada tubo, homogeneizar por aparelho, centrifugar, desprezar o sobrenadante e ressuspender em tampão de lavagem;
6. Adquirir as amostras em citômetro de fluxo e analisar.

7. LITERATURA RECOMENDADA

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

Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254(2):149-54.

Barnett D, Walker B, Landay A, Denny TN. CD4 immunophenotyping in HIV infection. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(11 Suppl):S7-15. Epub 2008/10/25.

Barré-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyre M, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-71.

Bernstein A. An HIV/AIDS vaccine: where do we go from here? *Trends Microbiol*. 2008;16(12):553-4.

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

Chattopadhyay PK, Roederer M. Immunophenotyping of T cell subpopulations in HIV disease. *Curr Protoc Immunol*. 2005;Chapter 12:Unit 12.

Coffin J, Haase A, Levy J, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. What to call the AIDS virus? *Nature*. 1996;321(6065):10.

Decrion AZ, Varin A, Drobacheff C, Estavoyer JM, Herbein G. A subset of functional effector-memory CD8+ T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected patients. *Immunology*. 2007;121(3):405-15.

Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, Shearer G, Kaplan M, Haynes B, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 1984;224(4648):500-3.

Gottlieb M, Schroff R, Schanker H, Weisman J, Fan P, Wolf R, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981;305(24):1425-31.

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

Long SA, Buckner JH. CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol*. 2011;187(5):2061-6.

Kanwar B, Favre D, McCune JM. Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(2):151-7.

Pattanapanyasat K, Phuang-Ngern Y, Sukapirom K, Lerdwana S, Thepthai C, Tassaneeritthep B. Comparison of 5 flow cytometric immunophenotyping systems for absolute CD4+ T-lymphocyte counts in HIV-1-infected patients living in resource-limited settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008;49(4):339-47.

Salgado M, Rallon NI, Rodes B, Lopez M, Soriano V, Benito JM. Long-term non-progressors display a greater number of Th17 cells than HIV-infected typical progressors. *Clin Immunol.* 2011;139(2):110-4.

Quixabeira, VBL e Saddi, VA. The importance of immunophenotyping and cytogenetics in the diagnosis of leukemia: a literature review. *RBAC.* 2008; 40(3): 199-202.

World Health Organization. Laboratory Guidelines for enumerating CD4 T Lymphocytes in the context of HIV/AIDS. 2007

Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med.* 2006;203(11):2451-60.

Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008;112(5):1557-69.

Kotb M, Calandra T. Cytokines and Chemokines in Infectious Diseases Handbook. 1st ed. Humana Press; 2003.

Thomson AW, Lotze MT. The Cytokine Handbook, Two-Volume Set, Volume 1-2, Fourth Edition. 4th ed. Academic Press; 2003.

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

Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System. 7th ed. Garland Science; 2007. 928 p.

Peakman M. Basic and clinical immunology. 2nd ed. Edinburgh ;;New York: Churchill Livingstone; 2010.

Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods* 243. (1-2):77-97, 2000.

Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluoresce Activated Cell Sorting. *The Review of Scientific Instruments.* 43(3): 404-409, 1972.

Haugland RP. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th ed. Eugene, OR: Molecular Probes; 2002.

Robinson JP, editor. Handbook of flow cytometry methods. New York: Wiley-Liss; 1993.

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

Watson JV. Introduction to Flow Cytometry, First Paperback Edition. Cambridge University Press; 2004.