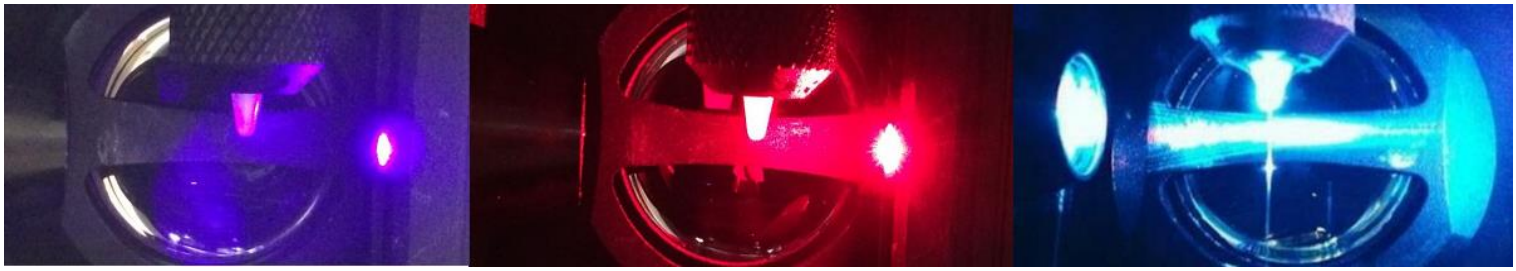
Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

CURSOS DE INVERNO
Instituto Oswaldo Cruz 2018

CITOMETRIA DE FLUXO: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES NA PESQUISA CIENTÍFICA



AUTORES

ALESSANDRO MARINS DOS SANTOS, M.Sc.: Graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Veiga de Almeida (Rio de Janeiro - RJ). Especialista em Biotecnologia pela FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Mestre em Patologia pelo Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense - UFF (Niterói - RJ). Trabalhou como Apoio especializado na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Fenotipagem e posteriormente no núcleo de Purificação Celular (*Sorting*) do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (2006 - 2016). Atualmente, é Doutorando no Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, no qual é bolsista CNPq, desenvolve a Tese intitulada "Análise de precursores de linfócitos T na medula óssea: Correlação com a atrofia do timo durante a infecção oral aguda pelo *Trypanosoma cruzi*" no Laboratório de Pesquisas sobre o Timo do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, sob a orientação do Dra. Juliana de Meis e do Dr. Désio Aurélio de Oliveira Farias. Trabalha com Citometria de Fluxo desde 2005.

ALINNE RANGEL DOS SANTOS RENZETTI, M.Sc.: Graduada em Biomedicina pela Universidade Castelo Branco (UCB - Rio de Janeiro, RJ), Mestre em Ciências da Saúde com ênfase em Doenças Infecciosas, pelo Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia - INI/Fiocruz (Rio de Janeiro, RJ). Atualmente é aluna de Doutorado pelo mesmo Programa de Pós-graduação, e desenvolve a tese intitulada "Avaliação da antigenicidade para células T antígenos candidatos a composição de uma vacina Pan-*Leishmania* contra a Leishmaniose Humana/Canina" no Laboratório de Imunoparasitologia - LIP/IOC, sob a orientação do Dr. Fabiano Figueiredo e Dra. Paula De Luca.

CLARISSA FERREIRA CUNHA, PhD: Biomédica formada pela Universidade Severino Sombra (Vassouras - RJ); mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ (Rio de Janeiro - RJ). Doutora pelo mesmo programa de Pós-graduação, área de concentração: Imunologia e Patogenia. Atualmente biomédica no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, atuando na área de Hematologia e Hemoterapia. Especialização em andamento em Hematologia pela Universidade Cândido Mendes/ Instituto Prominas.

JÉSSICA RIBEIRO DE LIMA, M.Sc.: Graduada em Biomedicina pela Universidade Federal Fluminense - UFF (Niterói - RJ). Mestre pelo programa de Pós-graduação stricto-sensu em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), área de concentração: Imunologia e Patogenia. Atualmente Biomédica do Hospital Universitário Gafree e Guinle (UNIRIO) lotada no setor de microbiologia da Tuberculose (NBIII);

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

STEPHANIE OLIVEIRA DIAZ DA CRUZ, MSc: Cirurgiã-dentista formada pela Universidade Gama Filho (UGF); especialista em Periodontia e mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais pela Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Atualmente é doutoranda do programa de pós-graduação de Biologia Celular e Molecular (BCM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC); FIOCRUZ, bolsista IOC; e atua na linha de pesquisa “Biotecnologia: vacinas e testes diagnósticos”, desenvolvendo a tese intitulada “Construção e avaliação da imunogenicidade de vírus vacinal da febre amarela 17D recombinantes, que expressam antígenos de Vif do vírus da imunodeficiência símia (SIV)”.

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

COORDENADOR

ALVARO LUIZ BERTHO, PhD: Bacharelado em Biomedicina pela Universidade do Rio de Janeiro - UNI-RIO (Rio de Janeiro - RJ). Mestre em Ciências, Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, área de concentração: protozoologia. Doutor em Ciências, Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, área de concentração: imunoparasitologia. Ex-Consultor Científico no Setor de Imunologia do Laboratório Dr. Sérgio Franco (1996 a 2002). Ex-Consultor Científico no Setor de Imunogenética do Laboratório Dr. Sérgio Franco (2002 a 2003). Ex-Professor Adjunto da disciplina de Imunologia Clínica no Curso de Biomédicina na Universidade Severino Sombra (Vassouras, RJ - 2005 a 2012). Pesquisador Titular e Vice-Chefe do Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Coordenador da Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. Expertise nas áreas de Imunologia, Citometria de Fluxo, Imunoparasitologia e Imunogenética. Membro da International Society for Advancement of Cytometry (ISAC) desde 1991 e da Sociedade Brasileira de Imunologia. Trabalha com Citometria de Fluxo no Brasil desde 1989 sendo pioneiro no Brasil.

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

APOIO

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

IOC
Instituto Oswaldo Cruz

ThermoFisher
SCIENTIFIC

BECKMAN
COULTER

BD
BD Biosciences

PREFÁCIO

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

Alvaro Luiz Bertho

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA 1
1.1 Introdução 1
1.2 Processo de formação, maturação e ativação dos linfócitos 2
1.3 Imunidade Inata 5
1.4 Imunidade Adaptativa 10
1.5 Produção de Anticorpos Monoclonais 18
REFERÊNCIAS 21
CAPÍTULO 2. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO 22
2.1 A Citometria de Fluxo 22
2.2 Fluorocromos e *LASERs* 22
2.3 Sistema Ótico 29
2.4 Sistema Eletrônico 32
2.5 Princípios de Funcionamento 32
2.6 Programas Computacionais - *Softwares* 37
2.7 Titulação de anticorpos 40
2.8 Compensação de cores 41
2.9 Controles 43
2.10 Exclusão de *doublets* 45
2.11 Histórico da Citometria de Fluxo 48
REFERÊNCIAS 55
CAPÍTULO 3. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO 56
3.1 Distinção de populações celulares 56
3.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo 57
3.3 Avaliação do conteúdo de DNA 63
3.4 Morte Celular – Apoptose 68
3.5 Proliferação celular 71
3.6 Ensaios funcionais 71
3.7 *Bead-based immunoassay* 72
3.8 Análise de micropartículas 74
3.9 Nanopartículas 77
3.10 Análise de microorganismos 79
3.11 Interação parasito-célula hospedeira 80
3.12 Microbiologia marinha 81
3.13 Vacinas 82
REFERÊNCIAS 85

CAPÍTULO 4. CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA NO ESTUDO DAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS 87
4.1 Infecção pelo HIV 87
4.2 Infecção pela *Mycobacterium tuberculosis* e *bovis* 93
4.3 Leishmaniose Tegumentar Americana 97
4.4 Zika 106
4.5 Vírus vacinal da febre amarela 17DD 110
REFERÊNCIAS 117
5.1 Princípios 119
5.2 Aplicações do *cell sorting* por citometria de fluxo 124
5.2.1 Sexagem de sêmem 124
5.2.2 *Single Cell Sorting* - Clonagem 127
REFERÊNCIAS 129

CAPÍTULO 1. NOÇÕES BÁSICAS DE IMUNOLOGIA

Alessandro Marins dos Santos

1.1 Introdução

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

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

1.2 Processo de formação, maturação e ativação dos linfócitos

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

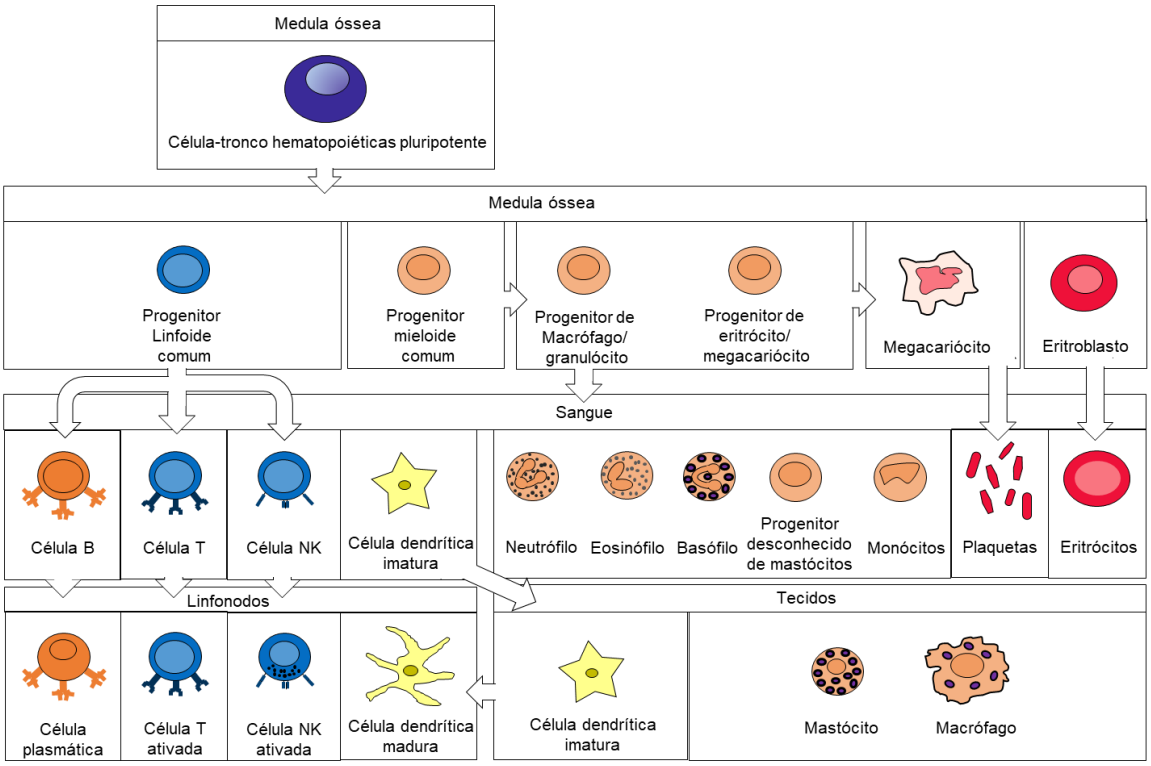


Figura 1.1 - Hematopoiese. Adaptado de Janeway, Travers & Walport (2010).

Os linfócitos circulam pelo sangue, pela linfa e, também são encontrados em grande número nos órgãos linfoides, onde se organizam e formam aglomerados

evidentes dentro da arquitetura original do tecido constituído por células não linfoides. É comum a divisão dos órgãos linfoides em centrais ou primários, onde ocorre a maturação dos precursores linfoides e a produção de linfócitos (medula óssea e o timo), e em órgãos linfoides secundários ou periféricos (baço, linfonodos, tecido linfoide associado a mucosas) que são locais onde os linfócitos virgens (*naïve*) maduros são mantidos e a resposta imune adaptativa é iniciada. Todavia, antes de desempenhar seu potencial na resposta imune adaptativa nos órgãos linfoides secundários, precursores linfoides situados na medula óssea e no timo passam por uma série de eventos oriundos de um programa altamente regulado de expressão sequencial de genes. Tal programa leva a um repertório diversificado, mudanças no perfil de receptores, aquisição de competência funcional não reativa e potencial para migrar para os órgãos linfoides secundários. Esse processo de desenvolvimento e diferenciação é chamado de maturação de linfócitos.

O processo de maturação dos linfócitos B e T ocorre, respectivamente, na medula óssea e no timo, e envolve, principalmente, a proliferação de suas linhagens precursoras, a expressão de genes para o receptor de antígeno e a seleção do repertório de linfócitos maduros. A alta atividade mitótica destas linhagens precursoras durante o processo de maturação é estimulada principalmente pela interleucina 7 (IL-7), produzida pelas células do estroma da medula óssea e do timo, e ocorre para aumentar a variedade do repertório de linfócitos antígeno-específicos. O aumento da variabilidade do repertório de linfócitos é um evento extremamente importante para garantir a grande diversidade de clones de linfócitos com receptor (*T cell receptor*-TCR ou *B cell receptor*-BCR) específico para um determinado antígeno. Cada indivíduo apresenta, aproximadamente, 10^7 ou mais variedades de clones, que constituem os repertórios de linfócitos T e B, com TCR ou BCR diferentes, capazes de reconhecer, de modo específico, uma ampla diversidade de epítopos antigênicos. Os receptores de antígenos de linfócitos T e B são essenciais para a sobrevivência, proliferação e maturação dessas células. Na ausência de expressão do receptor de antígenos, durante seu desenvolvimento nos órgãos linfoides primários, os linfócitos são induzidos à morte programada por apoptose. Mesmo nos estágios intermediários da maturação, as células pré-B ou pré-T apresentam uma forma imatura do receptor (a cadeia pesada da imunoglobulina (Ig) nas células pré-B, ou a cadeia variável β (Vβ) do TCR nas células pré-T, associadas a cadeias glicoproteicas provisórias). Na ausência de expressão dessas estruturas temporárias, as células sofrem apoptose. A expressão dos receptores dos pré-linfócitos permite um estágio de verificação intermediário que assegura o sucesso da primeira recombinação genética, pois os sinais por eles induzidos resgatam

os linfócitos em desenvolvimento e impedem a morte por apoptose e ou por negligência. Nos linfócitos em estágio mais avançado de maturação, o receptor de antígeno definitivo é expresso, gerando sinais que promovem a sobrevivência, proliferação, bem como a continuação do processo de maturação dessas células. Aproximadamente 90 a 95% das células T e B imaturas não expressam receptores adequados e morrem por apoptose. O fenômeno de preservação das especificidades úteis no timo é conhecido como seleção positiva e assegura a maturação das células T nas quais os receptores se ligam com baixa avidez às moléculas próprias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Por outro lado, células T nas quais os receptores se ligam com alta afinidade aos auto-antígenos apresentados pelas células epiteliais tímicas, cabe a seleção negativa eliminar o clone autorreativo, induzindo-o à morte por apoptose. A seleção negativa é um mecanismo fisiológico importante para a manutenção da tolerância aos antígenos próprios. Esse mecanismo é conhecido como tolerância central. Para os linfócitos B, processos semelhantes são responsáveis pela geração do repertório. É importante salientar que o processo natural de diversidade do repertório de linfócitos que ocorre nos órgãos linfoides primários não está ligado à resposta imune adaptativa após um estímulo antigênico.

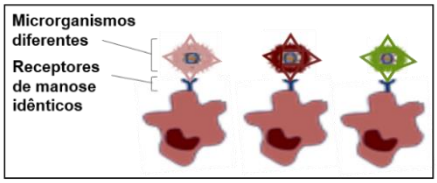
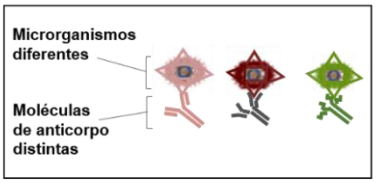
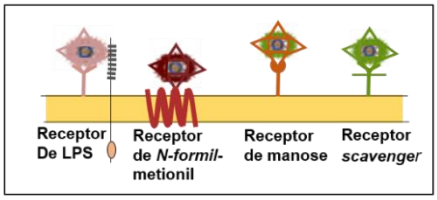
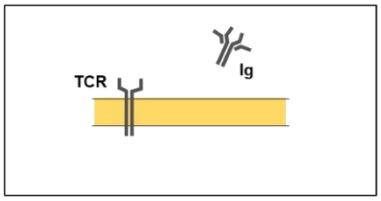
Uma vez completada a maturação dos linfócitos B na medula óssea e dos linfócitos T no timo, os dois tipos de linfócitos deixam esses órgãos, através da corrente sanguínea, seguem para os órgãos linfoides periféricos e recirculam continuamente entre esses órgãos e o sangue. A disposição anatômica dos órgãos linfoides secundários permite que durante o processo de circulação e recirculação linfocitária, possíveis sítios de inflamação sejam inspecionados. Desta forma, os linfonodos ou gânglios linfáticos recebem células apresentadoras de antígenos dos sítios de entrada nos tecidos, o baço as recebe do sangue e outros tecidos linfoides, como as amígdalas e placas de Peyer, as recebem das mucosas do sistema digestório. Os linfócitos *naïves* do sangue e oriundos dos órgãos linfoides primários, migram seletivamente para o estroma do linfonodo através da vênula especializada de endotélio alto (HEVs). O processo de migração desses linfócitos para o linfonodo e dos linfócitos ativados para o sítio de inflamação é dependente de receptores de *homing,* que garantem o endereçamento linfocitário para um determinado local e das adressinas, que são ligantes de adesão vascular presentes no endotélio. Alguns receptores de quimiocinas (CCR7 para linfócitos T e CXCR5 para linfócitos B), integrinas (LFA-1 e VLA-4), Lselectinas (CD62L) e moléculas de adesão vascular são cruciais para o processo de migração celular e de diapedese para o sítio de inflamação.

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

1.3 Imunidade Inata

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

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

	Imunidade inata	Imunidade adaptativa
Especificidade	Para estruturas compartilhadas por classes de microrganismos ("padrões moleculares") 	Para detalhes estruturas de moléculas microbianas (antígenos): Pode reconhecer antígenos não-microbianos 
	Codificados na linhagem germinativa; Diversidade limitada 	Codificados por genes produzidos por recombinação somática de segmentos gênicos; maior diversidade 
Distribuição dos receptores	Não-clonal: receptores idênticos em todas as células de uma mesma linhagem	Clonal: clones de linfócitos com especificidades Distintas expressam receptores diferentes
Distribuição entre "próprio" e "não-próprio"	Sim: células do hospedeiro não são reconhecidas ou Podem expressar moléculas que evitam as reações de Imunidade inata	Sim: baseada na seleção contra linfócitos auto-reativos; pode ser imperfeita (dando origem à auto-imunidade)

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

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

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

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

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

Os fagócitos, incluindo os neutrófilos e os macrófagos, são células cuja função primária é identificar, ingerir e destruir microrganismos. A população de neutrófilos é a mais abundante dentre as populações envolvidas na resposta imune inata, e sua produção e diferenciação terminal é estimulada pelo fator estimulante de colônias de granulócitos, na medula óssea. Os neutrófilos são células polimorfonucleares presentes no sistema sanguíneo, apesar dos neutrófilos serem células de vida curta, possuem um alto potencial migratório e microbicida através da fagocitose, pois seu citoplasma apresenta grânulos líticos compostos por lisozima, colagenase, elastase, lisossomos e

outras substâncias microbicidas que podem destruir os antígenos presentes no fagolisossomo. Outro mecanismo de destruição de microrganismos desempenhado por neutrófilos é a formação de armadilhas extracelulares (NETs), estas consistem num mecanismo *post-mortem* onde os neutrófilos projetam uma rede constituída por material nuclear e grânulos intracitoplasmáticos os quais possuem alto potencial inflamatório capazes de capturar microrganismos. Entretanto, caso não seja recrutado para um local de inflamação, os neutrófilos circulam no sangue por apenas seis horas e após este período, morrem por apoptose e são fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou no baço. Os macrófagos são células residentes nos tecidos, geradas a partir da diferenciação de monócitos sanguíneos, que se transformam em macrófagos ao entrar no tecido. Os macrófagos são células apresentadoras de antígeno profissionais efetoras dominantes nos estágios tardios da imunidade inata, e ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos são residentes em tecidos, podem proliferar num sítio inflamatório e possuem vida longa. Inclusive, os macrófagos podem ser encontrados em processos inflamatórios crônicos, granulomas, formando células gigantes multinucleadas ao redor de antígenos grandes que não podem ser fagocitados. Os macrófagos são residentes em locais estratégicos, como no tecido conjuntivo subepitelial, no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado e do baço, e nos seios linfáticos dos linfonodos. Nestes locais desempenham funções efetoras que atuam no recrutamento ativo de células para o local de infecção após o reconhecimento dos PAMPs, fagocitose e destruição dos microrganismos ingeridos, bem como, produzem citocinas que atuam na resposta imune inata e adaptativa. Os macrófagos são classificados em dois grupos M1 e M2, os macrófagos M1 possuem atividade bactericida e inflamatória, enquanto que os M2 são imunoregulatórios, desta forma os macrófagos possuem atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória. A polarização dos macrófagos para o perfil M1 ou M2 é induzida pelo perfil local de citocinas liberadas pelos diferentes tipos celulares. (Figura 1.2).

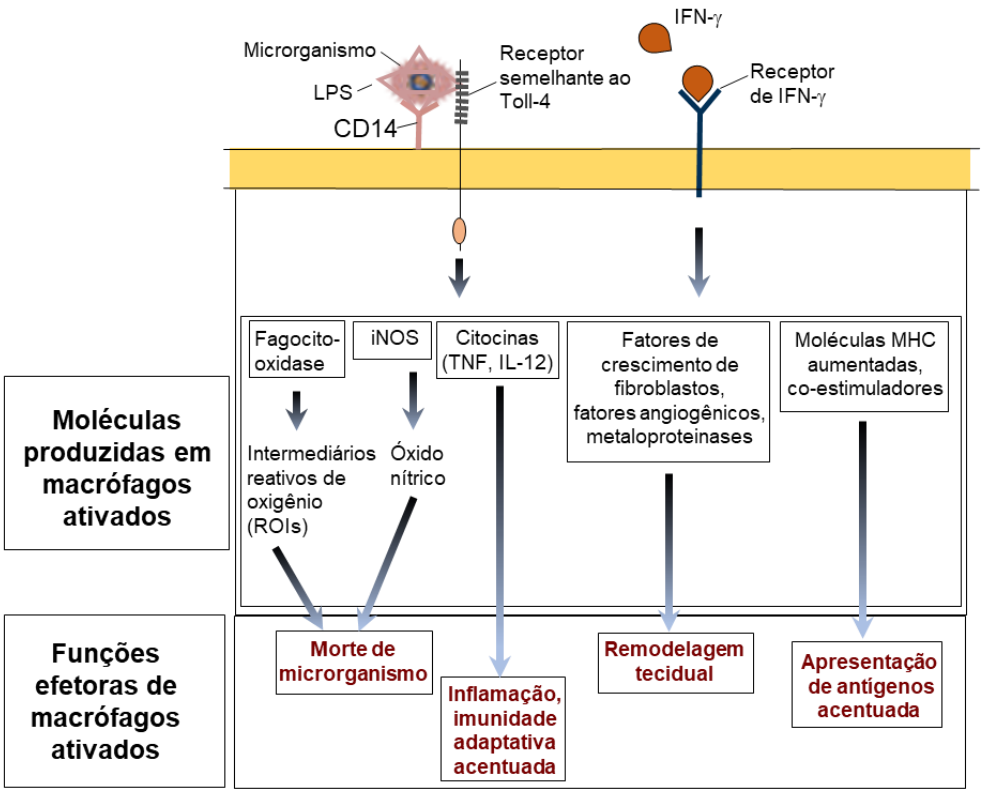


Figura 1.2 - Funções efetoras dos macrófagos, adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

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

tendem a ser dominantes e o desfecho funcional do engajamento de receptores de ativação e de inibição está inclinado a favor da inibição.

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

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

1.4 Imunidade Adaptativa

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

Os anticorpos são glicoproteínas globulares com função imunitária e pertencem à superfamília das imunoglobulinas. A ação dos anticorpos desencadeia vários mecanismos na fase efetora da resposta imune que, frequentemente, resultam em anular a ação de microrganismos, por meio da ativação do sistema complemento, opsonização dos antígenos para fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), onde os anticorpos marcam os microrganismos para serem destruídos pelas células do sistema imune inato (Figura 1.3).

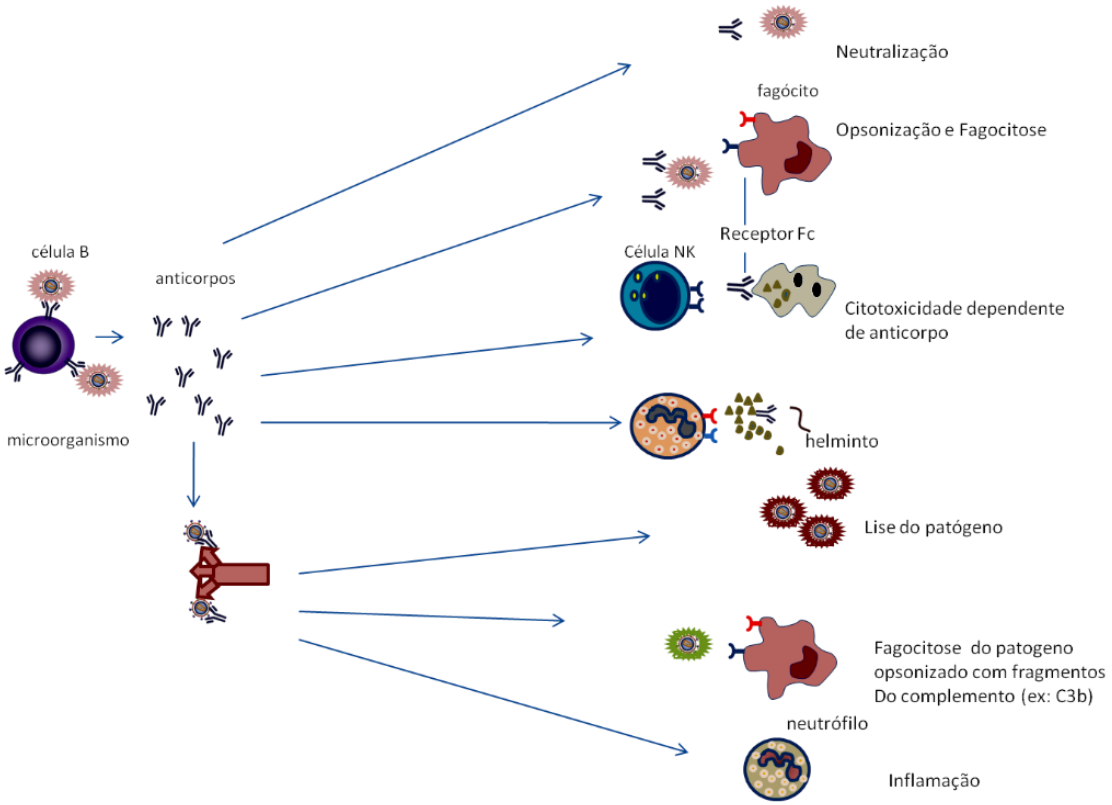


Figura 1.3 - Mecanismos da Resposta Humoral Efetora. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

Os anticorpos são estruturalmente divididos em regiões, as quais desempenham uma determinada função. A região de ligação ao antígeno varia amplamente, sendo conhecida como região variável ou região Fab. A região molecular que participa da função efetora é conhecida como região constante ou região Fc e não varia do mesmo modo, embora apresente cinco formas principais que se especializaram na ativação de diferentes mecanismos. Estruturalmente, a imunoglobulina é formada por duas cadeias leves (L - *light*), idênticas, e de duas cadeias pesadas (H - *heavy*), também idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por pontes dissulfídricas. O número exato e as posições destas pontes entre as cadeias diferem entre as classes e subclasses de Imunoglobulinas. Além disso, ambas as cadeias, leves e pesadas, possuem uma região variável e outra constante. Portanto, a imunoglobulina possui na cadeia leve uma região constante (CL) e uma variável (VL). O mesmo na cadeia pesada, uma região constante (CH) e uma variável (VH) (Figura 1.4).

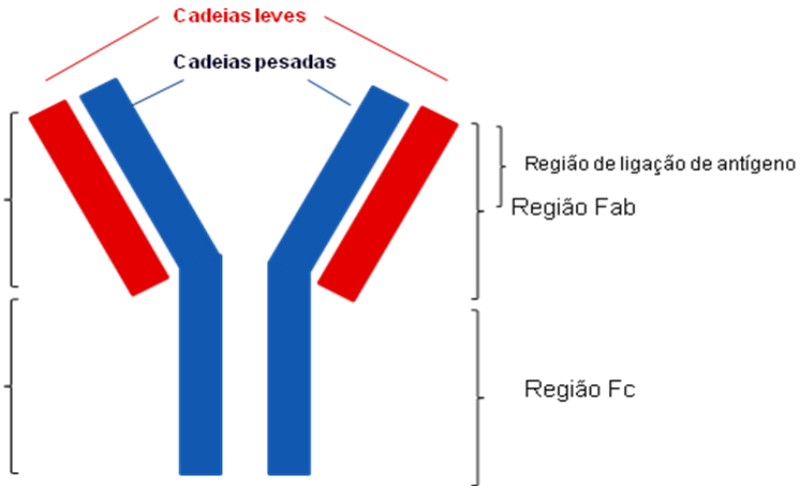


Figura 1.4 - Estrutura da Imunoglobulina.

Conforme a disposição de suas estruturas, as imunoglobulinas (anticorpos) são classificadas em 5 classes ou isotipos (Figura 1.5).

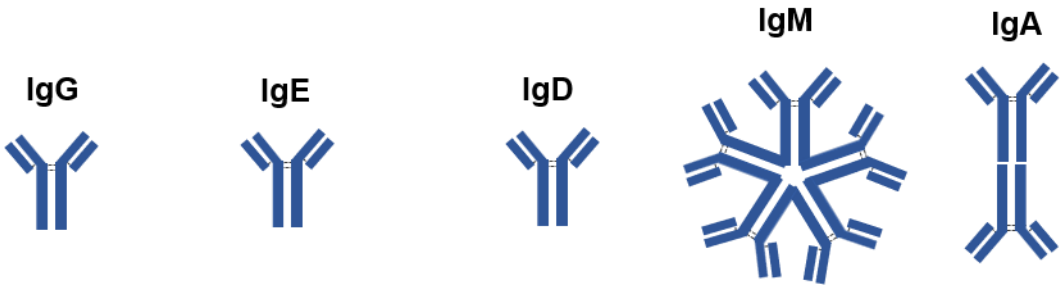


Figura 1.5 - Estrutura das classes de Imunoglobulina.

No soro humano cerca de 10% das Imunoglobulinas totais são da classe IgM (não atravessam o endotélio senão em locais inflamatórios e não atravessa a placenta), 70 a 75% são da classe IgG (atravessam a placenta) e 15 a 20% da classe IgA1. Nas secreções encontramos predominantemente IgA2, inclusive nas glândulas mamárias, sob a forma de dímero (IgA das secreções ou sIgA). Os primeiros anticorpos a serem produzidos numa resposta imune humoral são sempre da classe IgM. Estes são produzidos antes que a célula B tenha sofrido ativação por células T para disparar a hipermutação somática e troca de isotipo. Essas moléculas formam pentâmeros cujos 10 sítios de ligação com o antígeno podem se acoplar simultaneamente a antígenos multivalentes, tais como os polissacarídeos de parede celular bacteriana. Esta estrutura pentamérica também torna a IgM capaz de ativar o complemento de maneira mais eficaz, o que contribui para o controle mais eficiente de uma infecção. Quanto à IgD,

não se conhece muito bem a sua função, mas parece exercer um papel na diferenciação dos linfócitos B induzida pelo antígeno.

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

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

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

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

Dentre as subpopulações de linfócitos T, as subpopulações que possuem melhor caracterização são as células T $CD4^+$ auxiliares (*helper*) e células T $CD8^+$ citotóxicas (CTLs). As células T $CD4^+$ *helper* são assim denominadas devido ao perfil funcional que desenvolvem após a sua ativação, este inclui principalmente a secreção de citocinas que estimulam a proliferação e a diferenciação de células T, células B, macrófagos e outros leucócitos, sua função principal é amplificar a reação em cascata que medeia a resposta imune adaptativa. Outro fator importante quanto a resposta por células T $CD4^+$ e CTLs, é que as primeiras reconhecem antígenos que possuem ciclo biológico extracelular e que em geral são apresentados via MHC de classe II após o processo de fagocitose e degradação no fagolisossomo, enquanto que os CTLs reconhecem

antígenos que possuem ciclo biológico intracelular e que em geral são apresentados via MHC de classe I. Não obstante, é comum definir a resposta efetora de linfócitos T $CD4^+$ em células T_H1 (*T helper 1*) ou T_H2 (*T helper 2*), tais populações são assim definidas com base nas citocinas que produzem, apesar da expressão de citocinas ser mista em certos casos e passível de variações de acordo com estado de ativação celular, o padrão de citocinas T_H1 ou T_H2 predomina em reações imunes crônicas e a subpopulação que será induzida possui características funcionais e consequências patológicas específicas que podem determinar uma resposta inflamatória eficaz ou a evasão do microrganismo. O padrão de citocinas produzido por essas subpopulações de linfócitos T também participa do desenvolvimento e expansão de tais subpopulações, por exemplo, o IFN-γ secretado por células T_H1 promove a expansão de células T_H1 e inibe células T_H2, contrariamente, a citocina IL-4 e IL-10 secretada por células T_H2 promove a expansão de células T_H2 e inibe T_H1, assim, essa dinâmica de regulação cruzada faz com que a resposta iniciada seja polarizada e amplificada numa determinada direção.

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

A principal função efetora de células T_H2 é a destruição de microrganismos grandes, como os helmintos, que não são capazes de serem fagocitados e são mais resistentes a atividade microbicida de macrófagos. O mecanismo efetor desempenhado pelas células T CD4 *helper* da linhagem T_H2 ocorre através da secreção de IL-4 e IL-13 que estimulam a produção de anticorpos IgE helminto-específicos que opsonizam os helmintos e através da secreção de IL-5 que ativa os eosinófilos, os quais se ligam aos antígenos recobertos por IgE por meio dos receptores Fc específicos para a cadeia pesada ε. Os eosinófilos ativados liberam proteínas líticas capazes de destruir até o firme tegumento dos helmintos (Figura 1.6). Os mastócitos expressam receptores Fc-ε

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

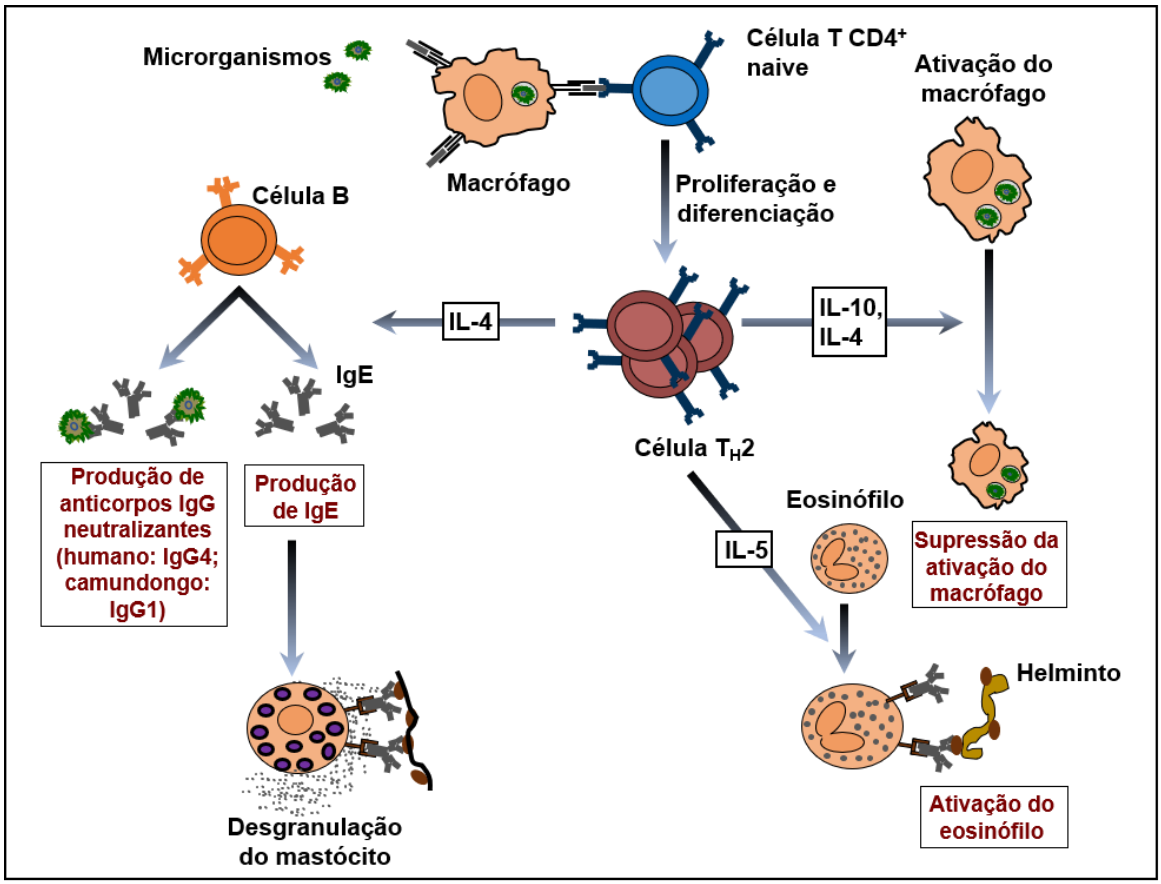


Figura 1.6 - Funções efetoras das células T_H2. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As CTLs se diferenciam de células T CD8 *naïve* após o reconhecimento antigênico, sinais co-estimulatórios e mediadores produzidos por células T $CD4^+$ *helper*. A resposta funcional de CTLs envolve mecanismos de eliminação da infecção através da destruição da célula alvo via apoptose e indução da atividade microbicida em APCs através da estimulação com IFN-γ. A perforina é uma proteína de reação catalítica presente nos grânulos de CTLs e células NK, após ser secretada a perforina entra em contato com o cálcio extracelular e polimeriza-se na bicamada lipídica da membrana citoplasmática da célula alvo formando um canal aquoso, por este entram enzimas do grânulo, as granzimas, que são serina proteases que ativam caspases (Figura 1.7A), as quais clivam vários substratos e induzem apoptose da célula alvo. Uma outra via de morte por apoptose promovida por CTLs ocorre através da interação de uma molécula de membrana, o ligante de Fas (FasL) que se liga ao Fas da célula alvo e ativa uma família de proteases denominada caspases (Figura 1.7B). Em geral a atividade das

caspases e relacionada a morte da célula alvo pelo fato de sua ação não ser dirigida, pois seu mecanismo de ação envolve a clivagem de muitos substratos, incluindo nucleoproteínas, e ativam enzimas que degradam DNA sem distinção entre proteínas do hospedeiro (célula-alvo) e proteínas microbianas.

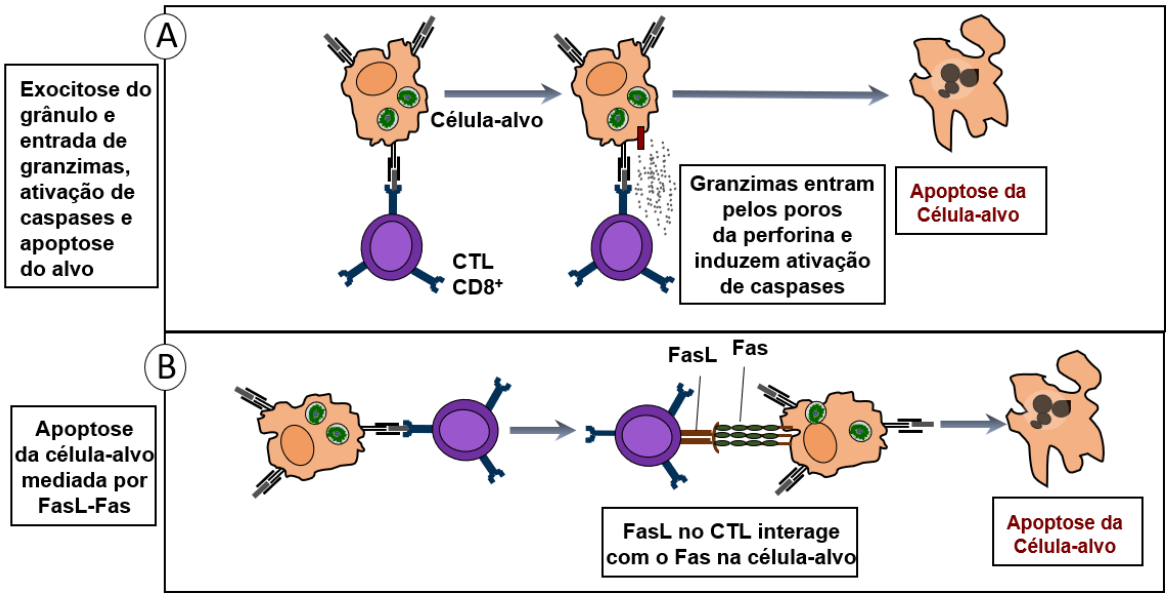
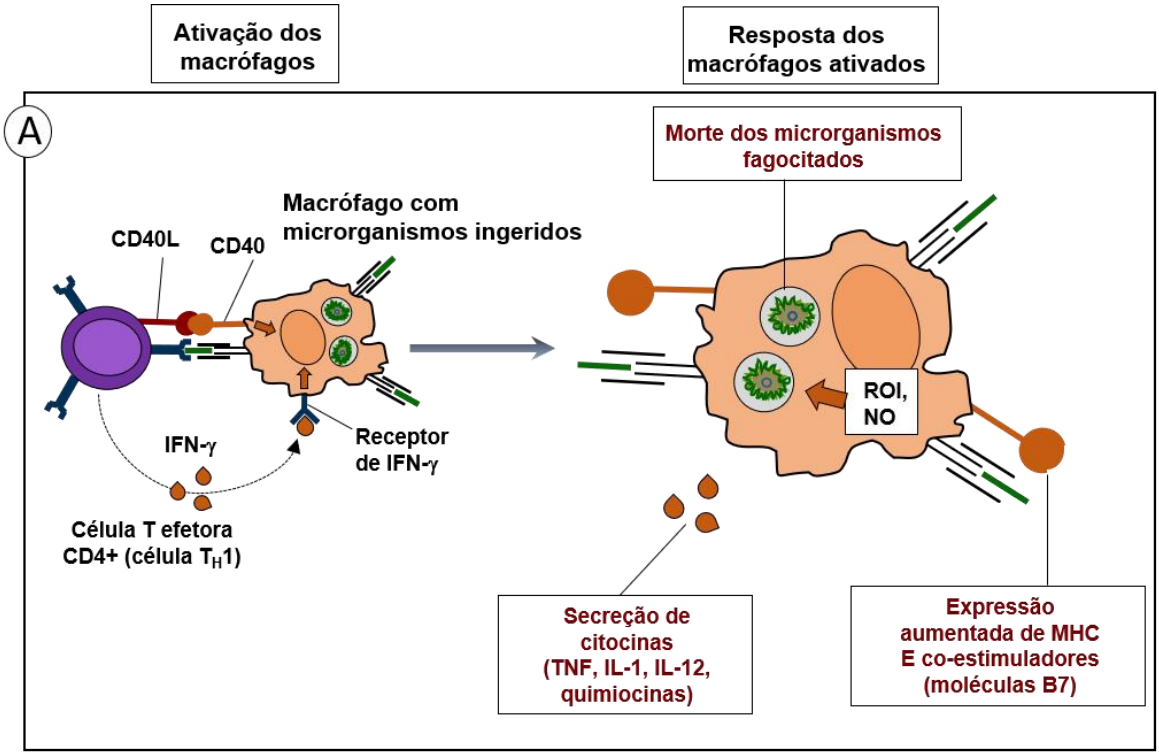


Figura 1.7 - Mecanismos da lise das células-alvo mediados por CTL. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

As CTLs são uma importante fonte de IFN-γ em resposta a agentes virais e parasitos intracelulares em geral, o IFN-γ age em APCs como os macrófagos e nestes induzem mecanismos microbicidas tais como o aumento de enzimas lisossomais, a liberação de intermediários reativos de oxigênio e óxido nítrico, além de estimular a secreção de citocinas, quimiocinas, aumento da ubiquitinização, expressão de MHC e moléculas co-estimuladoras pelos macrófagos ativados (Figura 1.8).



B

Resposta dos macrófagos	Papel na imunidade mediada por células
Produção de intermediários Reativos do oxigênio, óxido Nítrico, enzimas lisossomais aumentadas	Morte dos microrganismos nos fagolisossomos (função efetora dos macrófagos)
Secreção de citocinas (TNF, IL-1,IL-12)	TNF, IL-1: recrutamento de leucócitos (inflamação) IL-12: diferenciação de T_H1 produção de IFN-γ
Expressão aumentada de Co-estimuladores B7, moléculas MHC	Ativação das células T aumentada (amplificação)

Figura 1.8 - Ativação e função de macrófagos ativados pela imunidade mediada por células. Adaptado de Abbas & Lichtman (2005).

1.5 Produção de Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos, de maneira geral, são produzidos no organismo de forma específica para contra a um determinado antígeno. Os plasmócitos expressam e secretam vários anticorpos, cada um com uma especificidade diferente e capaz de interagir com um determinado epítopo antigênico, estes são denominados anticorpos policlonais. Já os anticorpos que são produzidos a partir de um mesmo clone de plasmócitos e, desta forma possuem a mesma especificidade entre si 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 de carcinoma e linfócitos B. Esta descoberta lhes concedeu o prêmio Nobel, juntamente com Niels K. Jerne, em 1984, pelas teorias sobre a especificidade no desenvolvimento e controle do sistema imunológico, e a descoberta do princípio para a produção de anticorpos monoclonais. Esta técnica, denominada hibridoma, consiste na produção de anticorpos que reconhecem apenas um epítopo antigênico e, por isso, são chamados de anticorpos monoclonais, que são produzidos e secretado por um único clone de linfócito B. Para a produção destes anticorpos comercialmente, utilizam-se células B de camundongos estimulados com um antígeno de interesse. Os anticorpos formados são chamados murinos, devido à sua origem em camundongos. Estes anticorpos quando usados continuamente em terapias para humanos, podem gerar uma reação imune contra o próprio anticorpo. Em função desta problemática, técnicas modernas de engenharia genética foram desenvolvidas, as quais permitem a humanização destes anticorpos, isto é, que os genes responsáveis por estas proteínas sejam modificados de forma a evitar essa reação imunológica no organismo humano. Assim são gerados os chamados anticorpos monoclonais humanizados. O processo de humanização não deve alterar a afinidade do anticorpo com o respectivo antígeno, mas sim sua porção isotípica, possibilitando, assim, o seu emprego continuado em procedimentos terapêuticos.

Nos ensaios para a produção destes anticorpos monoclonais, os camundongos estimulados com um antígeno X produzem células B esplênicas, que são retiradas e cultivadas em presença de células de mieloma, em meio HAT, contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (Figura 1.9). Este meio bloqueia as vias normais de biossítese 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 imunodetecção de anticorpos. As células que reagem ao antígeno X utilizado são clonadas, e estes clones expandidos em escala industrial para produção de anticorpos monoclonais específicos. Estes anticorpos são utilizados na pesquisa básica e em aplicações terapêuticas como a identificação de marcadores fenotípicos únicos para determinados tipos celulares e, também, na definição de moléculas típicas de cada célula; na análise funcional de superfícies celulares e moléculas secretadas. Outras aplicações são em diagnósticos de doenças infecciosas

e degenerativas, através da circulação de anticorpos específicos e diagnóstico de tumores, onde anticorpos monoclonais específicos para cada tumor são utilizados para sua detecção.

Desta forma, a utilização dos anticorpos monoclonais tem-se mostrado cada vez mais diversificada, evidenciando a grande importância desta descoberta para a ciência de forma geral, lembrando sempre a sua associação com a citometria de fluxo é que permite a visualização do resultado multiparamétrico e possibilita a caracterização da complexidade molecular de uma célula que passou pelo processo de imunfenotipagem.

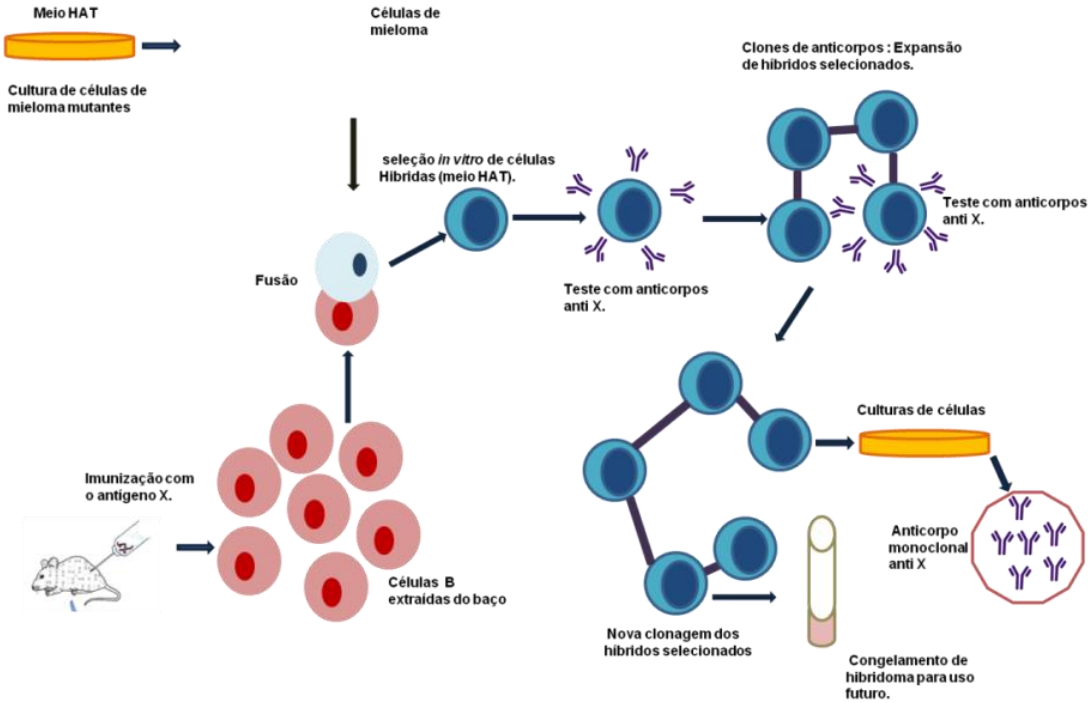


Figura 1.9 - Produção de anticorpos monoclonais, a partir de culturas de hibridomas, constituídas por linfócitos B antígeno-específicas e células tumorais.

REFERÊNCIAS

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

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

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

CAPÍTULO 2. PRINCÍPIOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Clarissa Cunha, Raquel Ferraz e Thaize Chometon

2.1 A Citometria de Fluxo

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

Os citômetros de fluxo são resultado do desenvolvimento de uma variedade de ferramentas e da aplicação de técnicas desenvolvidas na área da computação; da biotecnologia (produção de anticorpos monoclonais e de fluorocromos); da tecnologia da radiação *LASER*; e da eletrônica, possibilitando a avaliação de características físicas, químicas e biológicas de vários tipos celulares (humano, modelos experimentais, protozoários, fungos, bactérias).

Além da definição de características físico-quimicas das células, outra importante aplicação da citometria de fluxo é a separação ou purificação de uma determinada população celular, a partir de uma suspensão heterogênea de células – processo denominado de *cell sorting*. Assim, dois tipos de citômetros de fluxo são produzidos comercialmente – citômetros de fluxo analisadores (*bench-top analyzers*) e citômetros de fluxo separadores/purificadores de células (*Cell Sorters*).

2.2 Fluorocromos e *LASERs*

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

característica quando excitados especificamente por um determinado *LASER* (Figura 2.1).

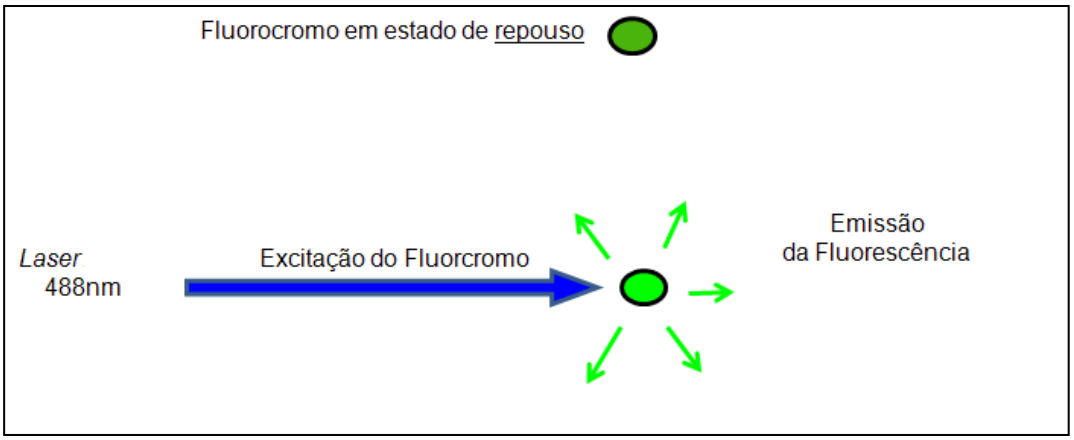


Figura 2.1 - Fluorocromo em estado de repouso e emitindo fluorescência após ser excitado pela luz do *LASER.*

Atualmente, a maioria dos citômetros de fluxo possui um ou mais *LASERs* como fonte de luz para mensuração de células e excitação de fluorocromos, escolhidos por produzirem um feixe de luz monocromático pontual e de alta intensidade. Este é um fator importante uma vez que a luz tem que ser precisamente alinhada de modo a englobar cada célula individualmente. Há uma grande variedade de *LASERs,* sendo que os mais utizados em citometria de fluxo são: iônicos refrigerados a ar (nos citômetros mais antigos) ou de estado-sólido (nos citômetros atuais). O *LASER* mais comum é o *LASER* de 488 nm que emite uma luz azul de 488 nm, por isso é chamado de *LASER* azul. Todos os citômetros de fluxo possuem este *LASER* em suas configurações básicas, pois além de excitar os fluorocromos também são responsáveis por definir as características morfológicas das células (baseadas em tamanho e granularidade). Outros *LASERs* são o Hélio-Cádmio (He-Cd), que pode emitir na luz azul (441,6 nm) e na UV (325 nm); Hélio-Neônio (He-Ne), que emite em vermelho (633 nm), sendo estes dois iônicos. Atualmente, os *LASER*s iônicos estão sendo substituídos por *LASERs* de estado-sólido (*solid-state LASER*), por serem de dimenções menores, mais baratos, de mais fácil calibração e por serem mais estáveis e de maior durabilidade.

De acordo com a demanda de aplicação citofluorimétrica, os citômetros de fluxo podem ser configurados e adquiridos com um ou mais de um *LASERs* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - *LASERs* e seus respectivos comprimentos de onda

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

Os fluorocromos geralmente são acopladas a AcMo que possuem afinidade específica à moléculas biologicamente significativas na superfície ou no interior das células, podendo assim definir o perfil fenotípico, funcional, eventos bioquímicos ou o tipo de resposta imunológica. Essas moléculas são definidas como grupamento de diferenciação ou *cluster* de diferenciação (do inglês, *cluster of differentiation*, geralmente abreviado como CD), sendo esta nomenclatura mundialmente utilizada.

Nos leucócitos, por exemplo, a caracterização dos CDs possibilita estabelecer o fenótipo da célula determinando a população ou subpopulação em questão, bem como permite definir seu perfil de ativação e, função que essa possivelmente executa. Neste sentido, a maioria dos painéis citofluorimétricos envolve a combinação entre biomarcadores que definem populações ou subpopulações celulares, bem como biomarcadores de estado funcional. A expressão de TCR e/ou CD3, por exemplo, caracteriza a célula como um linfócito T; a expressão concomitante de TCR e/ou CD3 e CD4 caracteriza uma subpopulação de linfócito T *helper* (linfócito T $CD4^+$); a expressão concomitante de TCR e/ou CD3e CD8 caracteriza outra subpopulação linfocitária: os linfócitos T supressores e os citotóxicos (linfócito T $CD8^+$); a expressão de CD19 caracteriza os linfócitos B e os CDs 20, 21, 22, 23 caracterizam qual a fase de diferenciação esses linfócitos B se encontram; a expressão de CD14 pode ser observada em monócitos e macrófagos; células *Natural Killer* (NK) expressam CD56; expressão de CD69 indica que a célula se encontra em estado funcional de ativação recente. É importante salientar que além da citometria de fluxo estabelecer a frequência de conjuntos celulares, essa também possibilita definir variações na expressão molecular. A modulação de algumas moléculas como CD27, CD62L, CD44 e as isoformas de CD45 definem células efetoras, naive, de memória efetora e de memória central e etc. (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Exemplos de algumas moléculas de CDs e suas respectivas características.

CD	Principais células que expressam	Nomes comuns/Funções conhecidas ou proposta
CD3	Linfócitos T, timócitos	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 timócitos, 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 timócitos	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, timócitos 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	Precursores de células hematopoiéticas, células endoteliais em vênulas altas	Adesão célula-célula; ligação ao CD62L (L-selectina)
CD44	Leucócitos, eritrócitos	Liga-se ao ácido hialurônico, medeia adesão de leucócitos a células endoteliais
CD45	Células hematopoiéticas	Tirosina fosfatase importante no processo de sinalização mediada pelo receptor de antígenos de linfócitos T e B
CD45RA	Linfócitos T naive, linfócitos B, monócitos	Isoforma de CD45.
CD45RO	Linfócitos T de memória, subconjunto de linfócitos B, monócitos e macrófagos	Isoforma de CD45.
CD55	Células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas	DAF/Regulação da ativação do complemento; liga-se a C3b, C4b
CD56	Células NK, subconjunto de linfócitos T e B	Adesão homotípica
CD59	Ampla expressão	Adesão leucocitária; coestimulação de linfócitos T; liga-se a CD2
CD62L	Linfócitos B e T, monócitos, granulócitos, algumas células NK	L-selectina/Molécula de adesão leucocitária; liga CD34; medeia interações com endotélio no processo de rolamento de leucócitos
CD69	Linfócitos T e B ativados, células NK e macrófagos ativados	Sinalização celular em diferentes tipos de células
CD70	Linfócitos T e B ativados, macrófagos	Liga-se a CD27; tem papel na coestimulação para ativação de linfócitos T e B
CD80	Células dentríticas, linfócitos B ativados, monócitos e macrófagos	B7-1/Liga-se a CD28 e CD152 (CTLA-4); molécula coestimuladora para ativação de linfócitos T
CD86	Monócitos, células dendríticas, linfócitos	B7-2/Ver CD80

Apesar do processo de imunofenotipagem envolver uma série de etapas relacionadas ao protocolo de marcação *per si*, abaixo é demostrado em resumo uma imunomacação com um AcMo anti-CD3 conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual possui excitação em 488 nm e pico de emissão em 525 nm. Esse se ligará a todos os receptores CD3 na membrana dos linfócitos T da amostra avaliada (Figura 2.2); e, ao ser interceptado pelo *LASER*, o fluorocromo (FITC) emitirá uma luz no comprimento de onda de 525 nm (cor verde), que será captada pelo detector após passar por um filtro para este comprimento de onda.

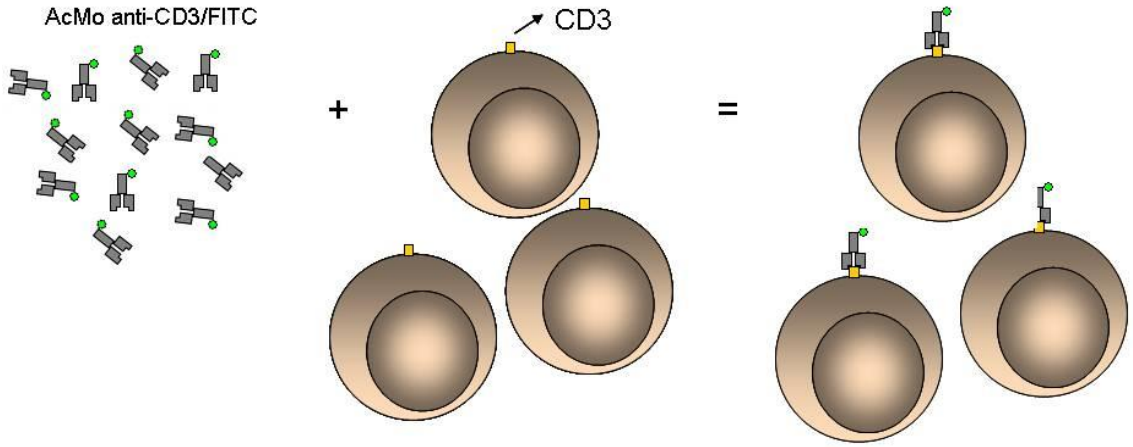


Figura 2.2 - Esquema representativo da marcação de linfócitos T com AcMo (anticorpo monoclonal) anti-CD3 conjugado com o fluorocromo FITC.

Vários AcMo conjugados a diversos fluorocromos estão comercialmente disponíveis por empresas especializadas como, a Beckman Coulter, Becton & Dickinson (BD), ThermoFisher, Biolegend, e etc. A combinação AcMo-fluorocromo deve ser escolhida de acordo com as moléculas (CDs) que se deseja avaliar e, com a configuração do citômetro que será utilizado, *LASERs*, filtros e sensores, uma vez que estes deverão corresponder as propriedades físicas de cada fluorocromo. Alguns dos fluorocromos utilizados em citometria de fluxo estão descritos na Tabela 2.3 com seus respectivos, *LASER* de excitação e pico de emissão.

Tabela 2.3 - Alguns fluorocromos disponíveis no mercado, seus respectivos picos de emissão; e *LASER* de excitação.

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

Os fluorocromos conjugados a anticorpos podem ser simples ou compostos (*Tandem Dyes*), este último é constituidos por dois fluorocromos acoplados, sendo o primeiro a molécula doadora e o segundo a receptora de elétrons gerados pela primeira. Quando a molécula doadora é excitada pelo *LASER* ela transfere a energia de emissão de luz, no respectivo comprimento de onda, para a molécula receptora, que por sua vez libera energia em um comprimento de onda diferente da primeira molécula. Esses fluorocromos *Tandem* foram desenvolvidos no intuito de aumentar as opções disponíveis para analisar mais moléculas (CDs) simultaneamente. É importante ressaltar que os fluorocromos *Tandem* são mais instáveis e lábeis, sendo sensíveis à fixação, variação de temperatura e esposição excessiva à luz, sendo recomendado que a amostra seja adquirida no citômetros de fluxo em no máximo 24 horas após a marcação, devido ao risco de desacoplamento dos fluorocromos em questão (Figura 2.3).

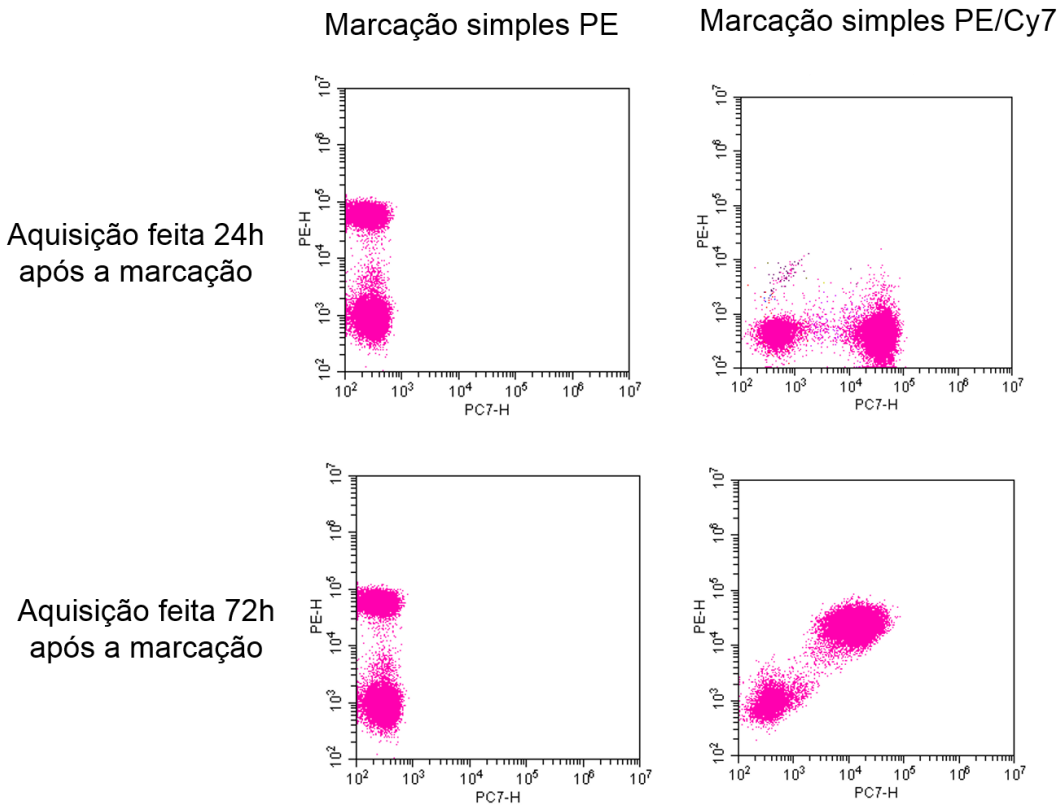


Figura 2.3 - Exemplo de desacoplamento do Tandem PE-Cy7. Na primeira linha mostra uma aquisição feita 24 horas após a marcação das células, onde a marcação simples com o AcMo acoplado a PE se apresentou apenas positivo para PE e negativo para PE-Cy7 (primeiro gráfico) e o AcMo acoplado a Pe/Cy7 se apresentou apenas positivo para Pe-Cy7 e negativo para PE (segundo gráfico). Já na segunda linha mostra uma uma aquisição feita 72 horas após a marcação, a qual a marcação simples com o AcMo acoplado a PE se apresentou semelhante na aquisição feita em 24h. Entretanto o AcMo acoplado a Pe-Cy7 se apresentou positivo tanto para Pe-Cy7 quanto para PE (segundo gráfico). Isso ocorre devido ao desacoplamento do Fluorocromo PE e Cy7 assim a amostra contento apenas PE-Cy7 passa a fluorescer tanto no canal do PE-Cy7 quanto PE, não sendo possível diferenciar as marcações de PE e Pe-Cy7 quando os dois fluorocromos forem utilizados em uma mesma amostra.

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

IMPORTANTE: No caso da marcação com mais de um anticorpo monoclonal, deve-se tomar cuidado para não escolher fluorocromos cujo pico de emissão seja detectado pelo mesmo filtro, como FITC e Alexa Fluor® 488 que são ambos detectados pelo mesmo detector.

Além dos comprimentos de onda de excitação *LASER* e pico de de emissão, outra característica importante para escolha dos fluorocromos é a intensidade de emissão de luz (brilho) dos mesmos. Os fluorocromos possuem diferentes intensidades de brilho e são classificados em uma escala de 1- 5 (Tabela 2.4) ou como muito brilhante (*very bright*), brilhante (*bright*), moderado (*moderate*) e fraco (*dim*). Recomenda-se escolher fluorocromos mais brilhantes (PE, APC e etc.) para moléculas menos expressas ou raras como, por exemplo, receptores de quimiocinas ou citocinas intracelulares, enquanto que para moléculas expressas em maior quantidade como CD4, CD8, CD45, pode-se utilizar fluorocromos menos brilhantes (FITC, Pacific Blue e etc.) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Alguns fluorocromos disponíveis comercialmente e seus respectivos índices de brilho.

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

2.3 Sistema Ótico

O sistema ótico de um citômetro de fluxo é composto por filtros, lentes e espelhos e, tem a função de direcionar a luz (fótons) emitida pelos fluorocromos para os fotosensores. O grande número de fluorocromos disponíveis comercialmente levou ao aumento do número de de componentes óticos de cada equipamento, permitindo que maior número de parâmetros sejam avaliados simultaneamente na mesma célula.

A maioria dos citômetros de fluxo possuem fotosensores denominados tubos fotomultiplicadores (*PMTs* - do inglês *photomultiplier tubes*). Atualmente, novas tecnologias surgiram no intuito de aumentar a sensibilidade dos sensores, um exemplo é o sensor APD (*Avalanche Photodiode*) que equipa os citômetros de fluxo Cytoflex (Beckman Coulter), melhorando a sensibilidade e a resolução desses equipamentos para detecção de partículas pequenas como bactérias, nanovesículas e exossomas e, ainda, de populações celulares com baixa expressão da molécula a ser analisada.

A disposição dos diferentes tipos de filtros, lentes e espelhos (Figura 2.4) determina a configuração ótica do equipamento.

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

Os espelhos são responsáveis por fracionar a luz de modo que as fluorescências e a luz difusa sejam direcionadas para os detectores apropriados, além de auxiliar no direcionamento da luz através do caminho de detecção. Permitindo assim a discriminação entre a dispersão da luz (relacionado aos parâmetros morfológicos) e diferentes fluorescências. Para auxiliar na separação de fluorescências de diferentes comprimentos de onda utiliza-se espelhos dicroicos. Os mesmos são revestidos em um dos lados com um material que permite que a luz acima ou abaixo de um determinado comprimento de onda passe enquanto reflete o restante. Eles são colocados a 45° em

relação à direção da luz, facilitando a reflexão. Os espelhos dicroicos podem ser de dois tipos.

- *Long pass (LP):* deixa passar comprimentos de onda maiores que o valor do espelho e reflete o restante. Isto é, um espelho de 525 LP permite a passagem de comprimentos de onda maiores que 525 nm e reflete comprimentos de onda menores ou iguais a 525 nm (Figura 2.4).
- *Short pass (SP)*: deixa passar comprimentos de onda menores do valor do espelho e reflete o restante. Por exemplo, espelho de 525 SP e, permite a passagem de comprimentos de onda menores que 525 nm e reflete comprimentos de onda maiores ou iguais a 525nm.

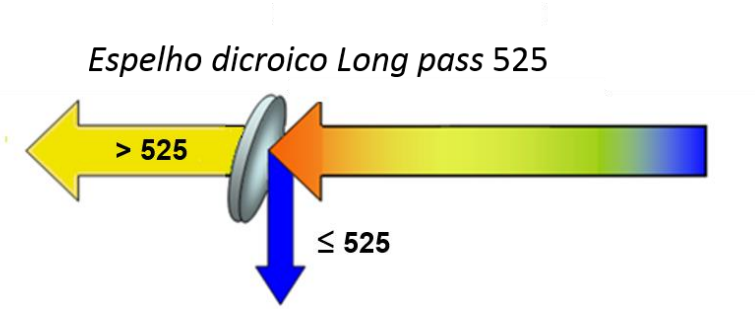


Figura 2.4 - Ilustração de Espelho dicroico *Long pass 525*

Os filtros têm função semelhante a dos espelhos, entretanto, eles estão posicionados na frente dos detectores. Assim, os filtros restringem a luz que chega aos detectores para que cada um deles seja dedicado para captar a fluorescência de um intervalo específico de comprimento de onda. Existem três diferentes tipos de filtro:

- Filtro *long pass (LP):* permite a passagem de comprimentos de onda maiores do que o valor do filtro. Isto é, um filtro 560 LP, deixa passar (atravessar o filtro) os comprimentos de onda maiores que 560 nm e impede a passagem de comprimentos de onda menores ou iguais a 560 nm (Figura 2.5A).
- Filtro *short pass (SP)*: permite passar comprimentos de onda menores do que o valor do filtro, ou seja, um filtro 560 SP, deixa passar (atravessar o filtro) os comprimentos de onda menores que 560 nm e impede a passagem de comprimentos de onda maiores ou iguais a 560nm (Figura 2.5B).
- Filtro *band pass (BP):* permite passar uma faixa de comprimento de onda específico e evita que comprimentos de onda diferentes daquele que se deseja detectar interfiram. Isto é, um filtro *band pass* 560/60, deixa passar (atravessar

o filtro) apenas os comprimentos de onda na faixa entre 530 (560 – 30) e 590 nm (560 + 30) e impede a passagem de comprimentos de onda diferentes dessa faixa (Figura 2.5C).

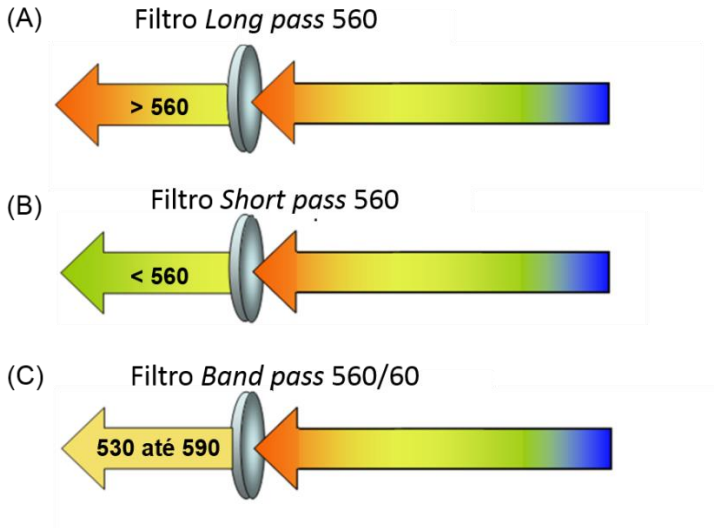


Figura 2.5 - Ilustração de um (A) filtro *long pass* 560, (B) filtro *short pass* 560 e (C) filtro *band pass* 560

2.4 Sistema Eletrônico

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

2.5 Princípios de Funcionamento

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

medula óssea, tecido ou 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 serão imunomarcadas. Por exemplo, em uma amostra de sangue periférico, esta primeiramente poderá ser submetida ao gradiente de densidade, se deseja avaliar o percentual de monócitos e de linfócitos T $CD8^+$, deve-se utilizar uma combinação de AcMo anti-CD14 (que se liga aos monócitos), AcMo anti-CD3 (específico para linfócitos T) e AcMo anti-CD8 (que se liga aos linfócitos T $CD8^+$). Cada um destes AcMo deve estar acoplado a um fluorocromo de cor diferente, como por exemplo: FITC, PE e PE-Cy5. É importante lembrar que para a escolha dos fluorocromos é necessário saber quais são as cores que podem ser detectadas "lidas" no citômetro de fluxo a ser utilizado, isto é, qual o(s) *LASER*(*s*) e a configuração ótica do equipamento.

Após a preparação da amostra (marcação das células com anticorpos monoclonais), o tubo contendo a suspensão de células[1] é inserido no citômetro de fluxo e a suspensão de células é aspirada, aos poucos, por um sistema de pressão e levadas à câmara de fluxo[2]. Além de ser preenchida pela solução salina (*sheath fluid),* esta câmara recebe então a suspensão de células[3], as quais, por conta do formato cônico da câmara e fluxo diferencial da salina em relação a amostra, seguem posicionadas uma atrás da outra até o foco hidrodinâmico[4], onde cada uma delas é interceptada pelo *LASER*. Este encontro resulta na refração da luz do *LASER*[5] e na emissão de fluorescência(s)[6] de acordo com o(s) fluorocromo(s) acoplado(s) aos AcMo, ligado em cada célula. A emissão de fluorescências de diferentes comprimentos de onda (cores) é direcionada para um fotosensor de acordo com uma combinação e disposição de filtros[7]. 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 pontos[8] (*dot plot*) (Figura 2.6).

Cada partícula/célula que o *LASER* intercepta é chamada de evento. Todos os eventos que passam na frente do *LASER* geram uma informação eletrônica, que é avaliada graficamente. Sendo assim, as informações a respeito das células que são marcadas com os AcMo e, também daquelas que não foram marcadas, ou seja, que não possuem a molécula investigada, são analisadas através de histogramas- gráficos monoparamétricos (Figura 2.7A) e/ou *dot plots*- gráficos biparamétricos, os quais podem ser divididos em quatro quadrantes (Figura 2.7B).

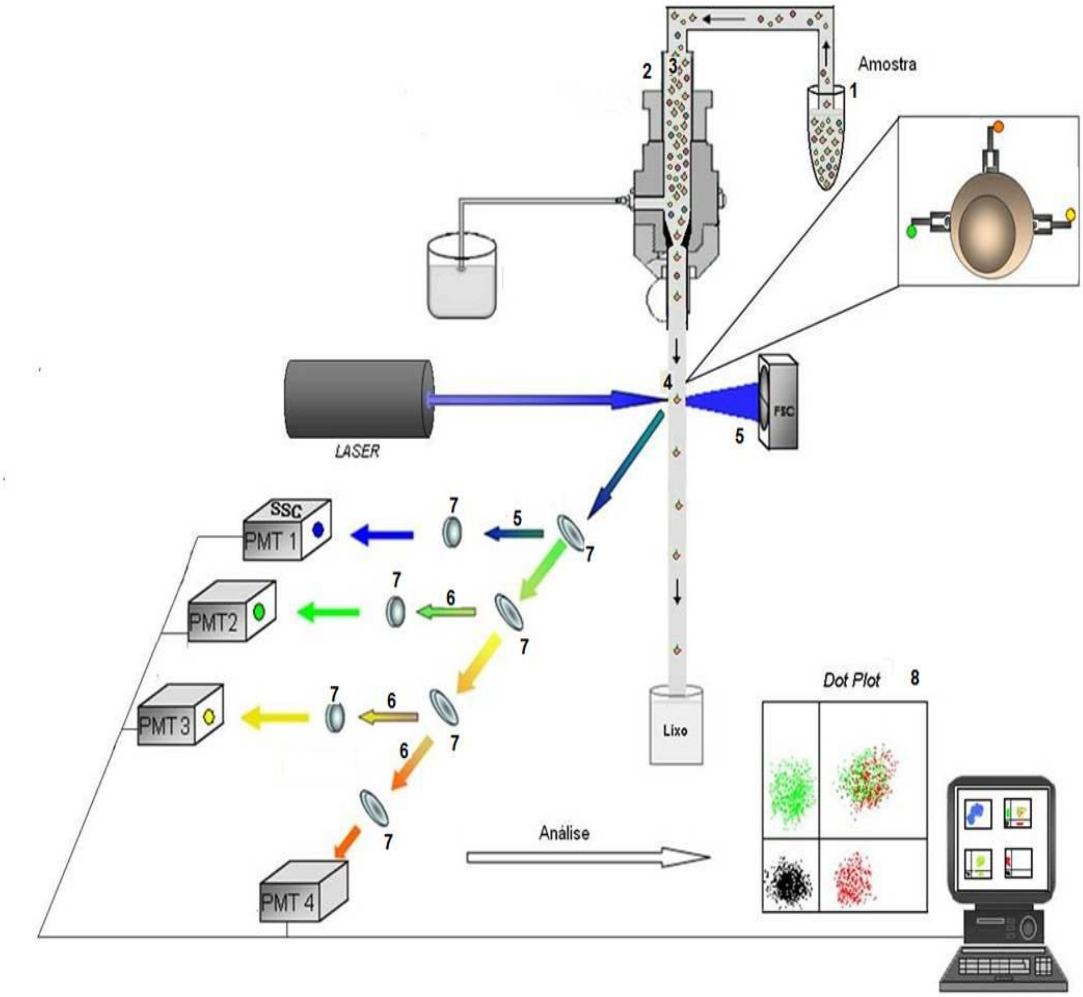


Figura 2.6 - Esquema representativo do funcionamento do citômetro de fluxo. *Flow cell* – câmara de fluxo; *Sheat* – solução salina; FSC – *foward scatter* (dispersçao frontal); SSC – *side scatter* (dispersão lateral); PMT – *photomiltiplier* (fotomultiplicador); *dot plot* – gráfico de pontos.

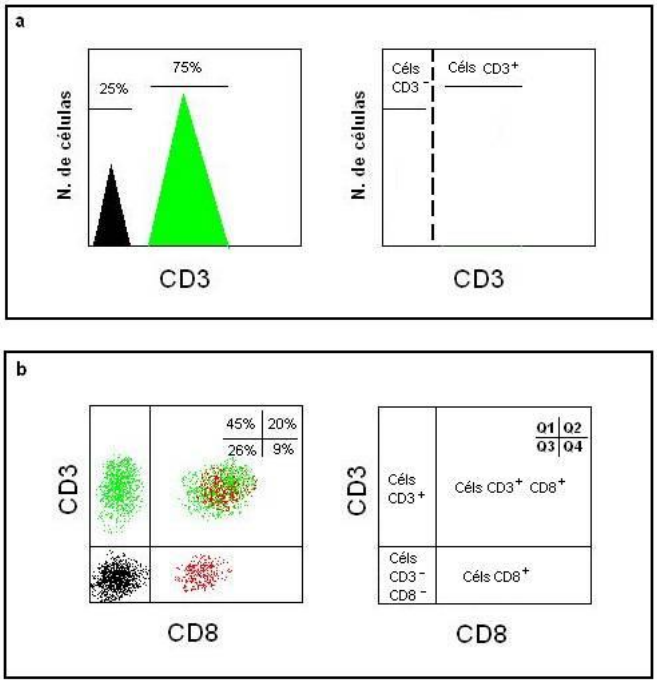


Figura 2.7 - Gráficos de análise de resultados obtidos por citometria de fluxo. (A) gráfico monoparamétrico (CD3) com respectivo pico das células negativas para a marcação com os AcMo anti-CD3 (25%) e pico das células positivas para esta marcação (75% - linfócitos T); (B) gráfico biparamétrico (CD3 x 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* azul, ao interceptar a célula, é refratada e dispersada permitindo que propriedades físicas da célula, como tamanho e granularidade sejam avaliadas. A luz dispersada na mesma direção (dispersão frontal) do *LASER* (*forward scatter* - FSC) permite analisar o tamanho celular. Quanto maior for a partícula, maior será o ângulo de incidência da luz do *LASER*, dispersada pela partícula, que atinge o sensor (Figura 2.8). Simultaneamente, a luz do *LASER* refratada devido à granularidade celular é captada por lentes que as direcionam lateralmente (90°) para um sensor (Figura 2.9).

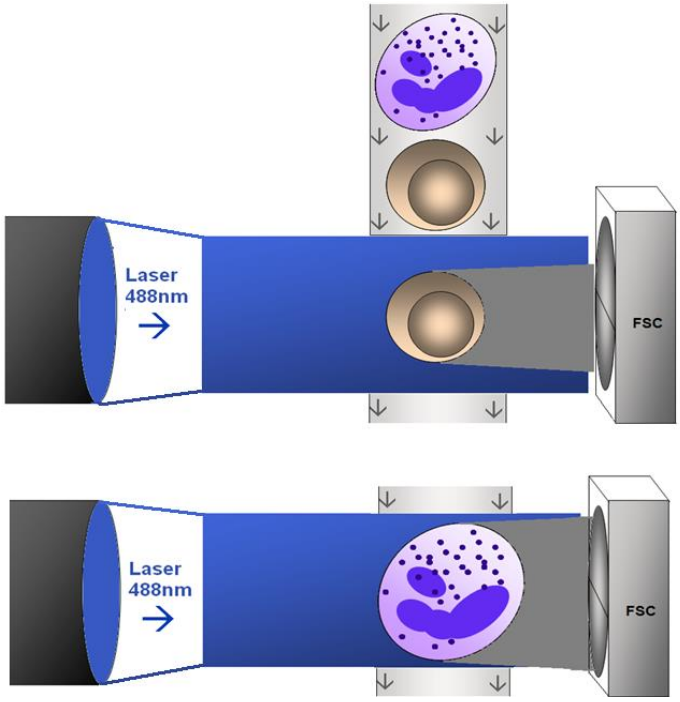


Figura 2.8 - Avaliação do tamanho celular de acordo com a luz do *LASER* refratada. Luz do *LASER* interceptando as células que passam através da solução salina formando um ângulo de refração que é detectado pelo fotossensor. FSC - *forward scatter*.

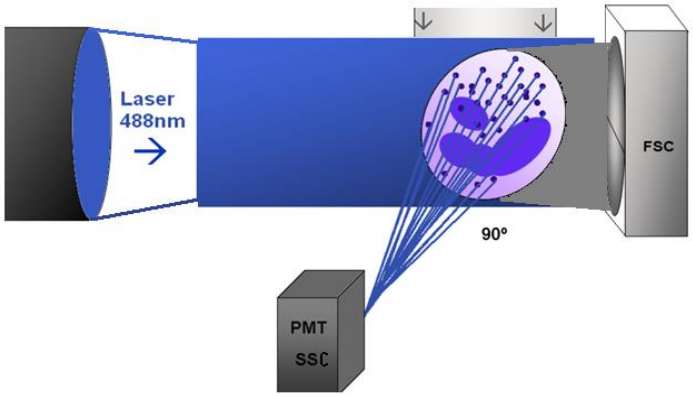


Figura 2.9 - Avaliação da granularidade celular de acordo com a luz do *LASER* refratada a 90º. Luz do *LASER* sendo refratada de acordo com a granularidade celular e sendo direcionada através de espelhos e filtros para o fotossensor. SSC - *side scatter).*

Assim, um espelho dicróico *long pass* 488nm deixa passar todos os comprimentos de onda acima de 488nm (cores emitidas pelos fluorocromos excitados pelo *LASER* 488) e reflete a luz do *LASER* azul refratada pela célula que é então direcionada para um filtro de interferência (*band pass*), o qual, por sua vez, deixa passar o comprimento

de onda de 488nm até o PMT. Chegando ao PMT, a luz detectada determina o que chamamos de *side scatter* (SSC) ou granularidade celular. Ao mesmo tempo, as fluorescências que passam pelo espelho dicróico *long pass* 488nm são refletidas por outro(s) espelho(s) dicróico(s) *long pass* de determinado comprimento de onda, e então chegam ao sensor após passar por um filtro de interferência *band pass* específico para cada fluorescência (Figura 2.10). Hoje, nos citômetros mais modenos também é possível avaliar a granularidade celular (*side scatter* SSC) pela refração de outros *LASER*s com o *LASER* violeta (405 nm) e vermelho (638 nm), sua detecção ocorre de forma semelhante ao do *LASER* azul, atrás de um jogo de espelhos, filtros e um sensor. O parâmetro SSC de *LASER*s como o violeta e o vermelho vem sendo muito uitlzadados em algumas aplicações mais especificas como para detecção de partículas pequenas como bactérias e microvesículas, pois esses *LASER*s produzem menos inferferecia (ruídos) quando comparado ao *LASER* azul.

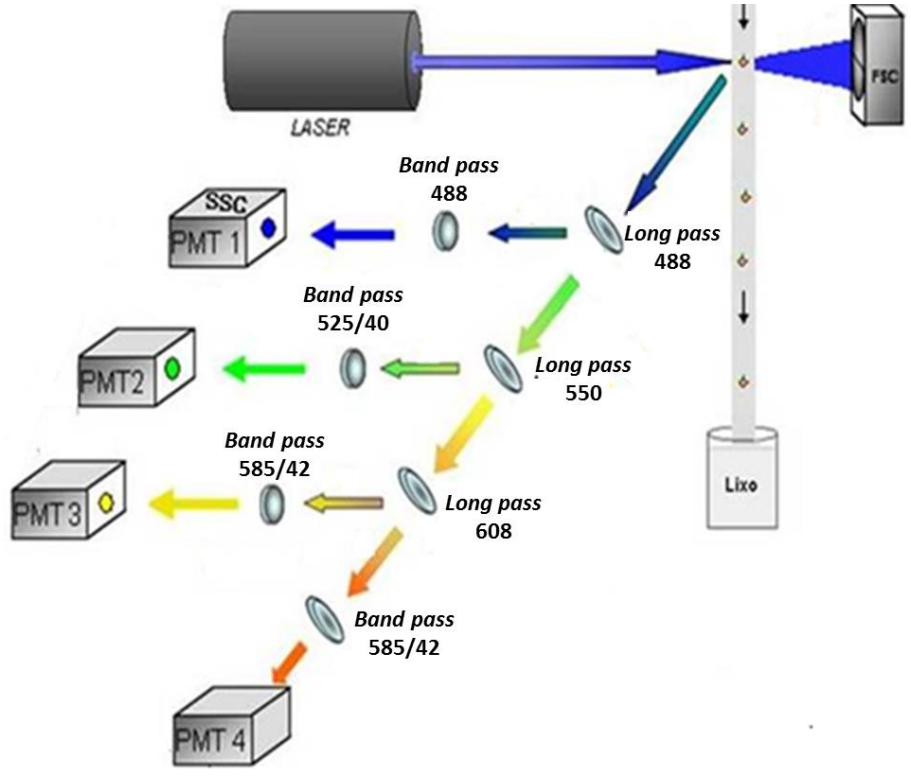


Figura 2.10 - Esquema representativo do caminho de cada fluorescência, direcionada pelos espelhos e filtros até um PMT (fotossensor).

2.6 Programas Computacionais - *Softwares*

Em segundos, milhares de células passam uma a uma pelo *LASER* e toda a informação quanto à refração desta luz e à intensidade de fluorescência dos fluorocromos é detectada e convertida em sinal eletrônico. As informações morfológicas, como tamanho e granularidade, e as intensidades de fluorescência referentes os marcadores fenotípicos e/ou funcionais são obtidas simultaneamente à aquisição da amostra. Através de *softwares* específicos é possível montar histogramas e demais gráficos necessários de acordo com a análise que se deseja realizar. É importante destacar que cada citômetro de fluxo possui um *software* específico para aquisição das amostras, como Summit, CytExpert (ambos da Beckman Coulter) que equipam os citometros de fluxo MoFlo e CytoFlex respectivamente; e o software DIVA (BD Bioscience) que equipa os citômetros de fluxo FACSCanto e FACSAria, por exemplo. Além disso, existem também *softwares* específicos multiplataformas para análises *offline,* dos quais destacamos: Kaluza (Beckman Coulter) e FlowJo (FlowJo, LLC).

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

Toda análise se baseia, primeiro, na identificação das populações quanto às propriedades físicas, isto é, tamanho e granularidade. Deve-se então montar um gráfico *dot plot*, selecionando para o eixo x e y, para esses parâmetros morfológicos geralmente se utiliza uma escala linear (Figura 2.11) para uma melhor visualização de pequenas variações morfológicas da amostra. Apenas para células muito pequenas, como bactérias, é recomendado utilizar uma escala logarítimica.

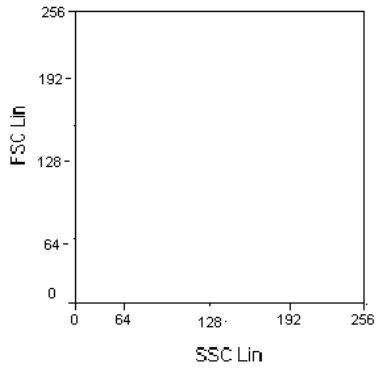


Figura 2.11 - *Dot plot* de tamanho vs granularidade. FSC – *forward scatter (*tamanho); SSC – *side scatter* (granularidade); Lin – escala linear.

A seguir, devem-se montar os gráficos para a avaliação de intensidade de fluorescência dos respectivos fluorocromos utilizados no protocolo de marcação da

amostra. Para esse tipo de parâmetro, relativo as fluorescências, geralmente se utiliza uma escala logarítimica.

A análise de fluorescências pode ser realizada através de histogramas, nos quais se avalia a intensidade de emissão de uma única fluorescência (Figura 2.12); e/ou *dot plots*, onde se avalia a intensidade de emissão de fluorescência por dois fluorocromos simultaneamente. Figura 2.13 ilustra o tipo de análise em quadrantes utilizando-se um *dot plot*, onde a intensidade de fluorescência representada no Q1 é referente às células marcadas com o fluorocromo Y; o Q2 representa a intensidade de fluorescência das células marcadas tanto com o fluorocromo Y quanto com o fluorocromo X; 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 X.

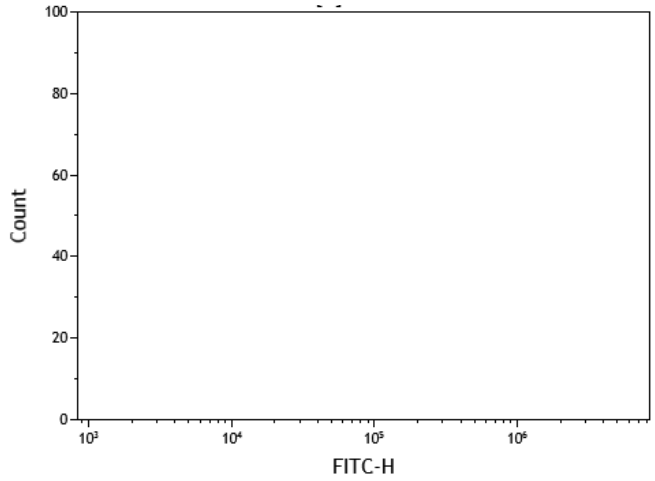


Figura 2.12 - Histograma. Gráfico monoparamétrico para a avaliação de uma única fluroescência vs número de células. *Counts* – número de células; FITC – intensidade de fluorescência do Fluorocromo FITC utilizado em escala logaritimica.

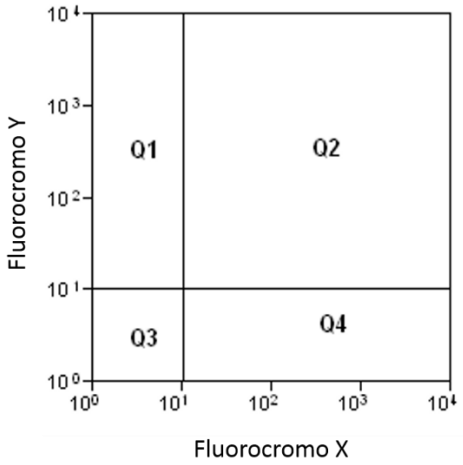


Figura 2.13 - *Dot plot.* Gráfico biparamétrico: fluorocromo X *vs* fluorocromo Y, onde Q representa os quadrantes. Q1 – positivo apenas para o fluorocromo Y, Q2 – positivo para o fluorocromo X e Y, Q3 – negativo para ambos os fluorocromos e Q4 – positivo apenas para o fluorocromo X

É possível montar um protocolo com a variedade de combinações desejadas 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 de cada fluorocromo utilizado. As análises podem ser feitas através do percentual de células e/ou da intensidade de fluorescência.

Ainda como ferramenta de aquisição e análise, os *softwares* permitem a criação de regiões, denominadas *gates*, para delimitar as populações celulares que se deseja avaliar (Figura 2.14). A partir deste *gate* pode-se então criar outros gráficos, histogrmas ou dotplots, com o intuito de avaliar a intensidade da fluorescência emitida pelos fluorocromos utilizados em determinada população do experimento. Assim, é possível determinar o percentual de células em cada *gate* e, desta forma, determinar os dados relevantes das análises de cada amostra.

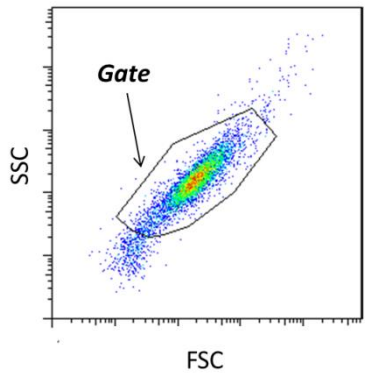


Figura 2.14 - *Gate* envolvendo a população de interesse

2.7 Titulação de anticorpos

A titulação de anticorpos novos é importante para estabelecer a concentração ideal do reagente para avaliação precisa da fluorescência e consequentemente da expressão do marcador estudado.

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

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

2.8 Compensação de cores

Apesar dos fluorocromos apresentarem um pico máximo de emissão, o espectro de emissão de fluorescência é amplo e apresenta variação. A consequência disto é a sobreposição das cores emitidas pelos fluorocromos (Figura 2.15A), sendo necessário subtrair, eletronicamente, a fração da fluorescência emitida pelo PE, por exemplo, que esteja interferindo na fluorescência emitida pelo FITC, o que é chamado de compensação de cores. As Figuras 2.15B e 2.15C ilustram o espectro de emissão de cada fluorocromo antes e depois de realizada a compensação de cores, respectivamente.

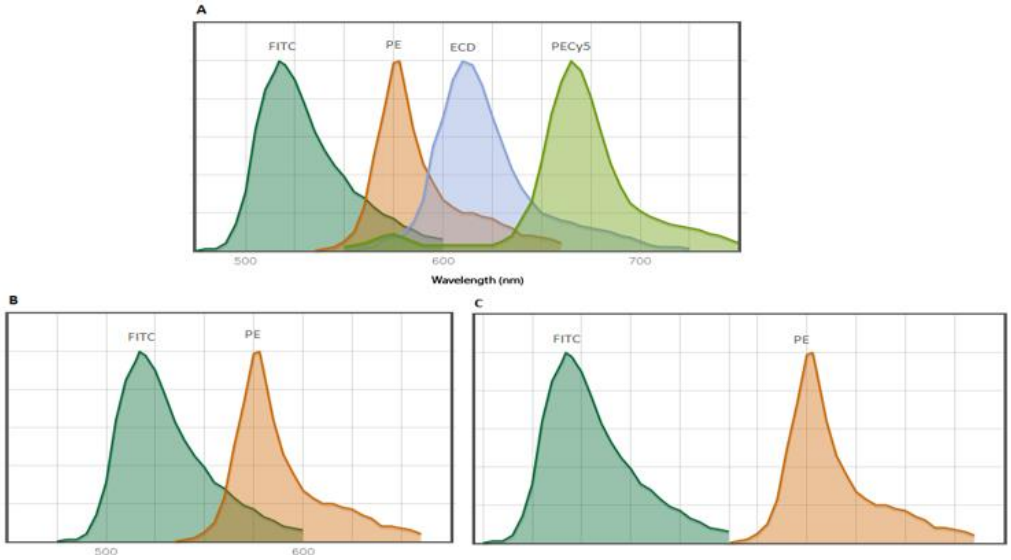


Figura 2.15 - Compensação de cores. (A) Espectro de emissão dos fluorocromos FITC, PE, ECD e PC5 e sobreposição do sinal de fluorescência entre os fluorocromos; (B) Sobreposição do sinal de fluorescência do FITC e do PE e (C) sinais compensados.

Para realizar uma compensação de cores eficiente recomenda-se a utilização de amostras de células marcadas individualmente com cada fluorocromo que será utilizado no painel citofluorimétrico (Figura 2.16). Estas amostras devem ser adquiridas antes da amostra experimental 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).

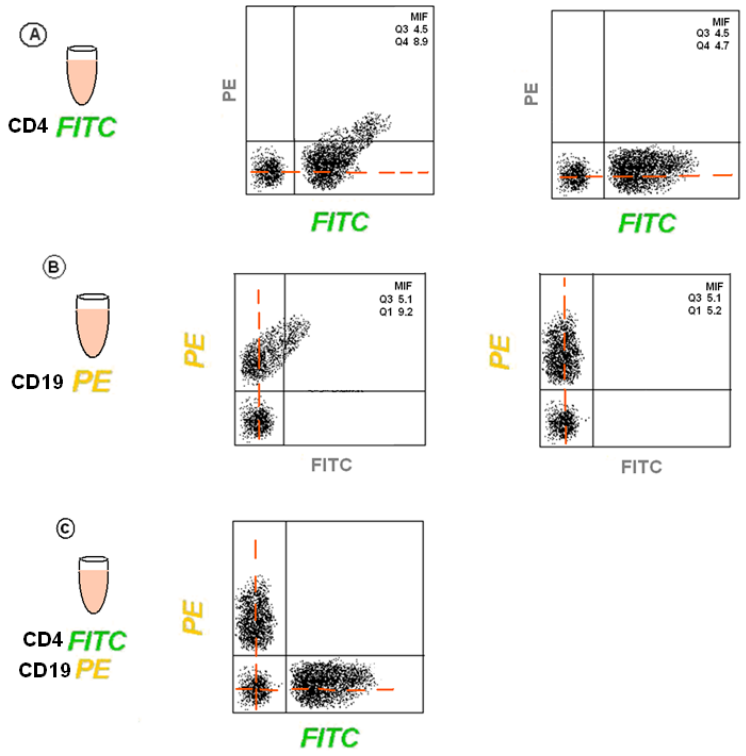


Figura 2.16 - Marcação simples para compensação de cores. (A) Aquisição de uma amostra marcada somente com CD4/FITC (B), e outra somente com CD19/PE seguida da compensação de cores através do ajuste da média de intensidade de fluorescência dos eventos negativos (Q3) e dos eventos positivos (Q4 – A; Q1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

2.9 Controles

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

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

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

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

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

A Figura 2.17 exemplifica o uso dos controles sem marcação e FMO, mostrando a melhor aplicação deste último. Nota-se o fenômeno de deslocamento do espectro de fluorescência negativo do controle sem marcação quando a amostra é marcada positivamente. Neste exemplo temos um protocolo de marcação de linfócitos com anti-CD3-FITC, anti-CD4 PE, anti-CD8 PE-Cy5 e anti-CD45RO PE-Cy7, aonde os seguintes controles FMO são recomendados:

- FITC FMO: células marcadas com anticorpos conjugados com PE, Pe/Cy5 e Pe/Cy7 (sem FITC)
- PE FMO: células marcadas com anticorpos conjugados com FITC, Pe/Cy5 e Pe/Cy7 (sem PE) (representado na Figura 17)
- Pe/Cy5 FMO: células marcadas com anticorpos conjugados com FITC, PE e Pe/Cy7 (sem Pe/Cy5)
- Pe/Cy7 FMO: coradas com anticorpos conjugados com FITC, PE e Pe/Cy5 (sem Pe/Cy7)

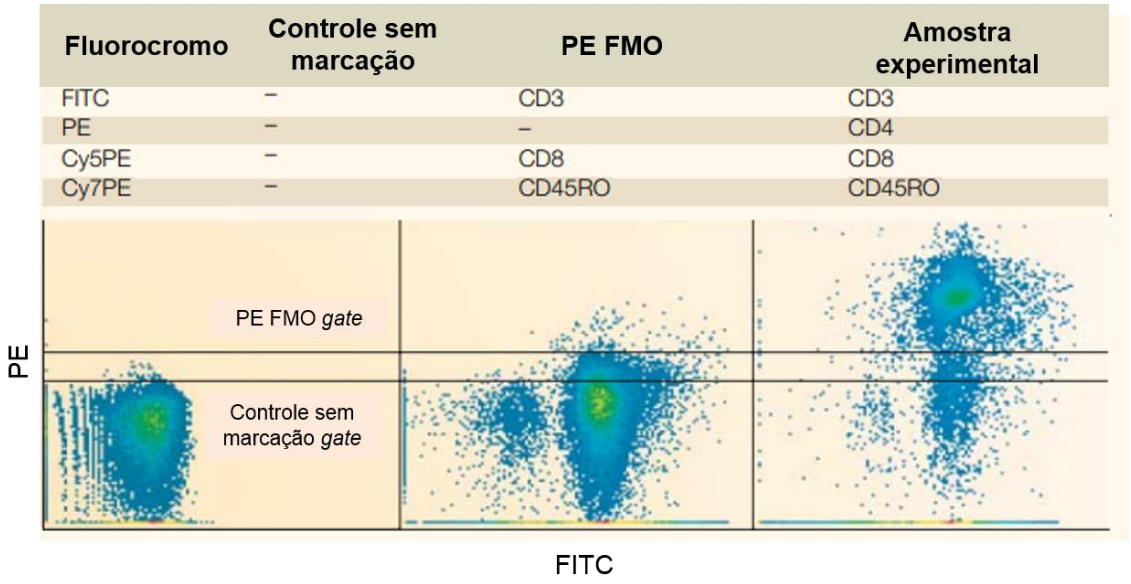


Figura 2.17 - O FMO foi utilizado para otimizar a identificação de células T CD4 $^{+}$ e CD4^{-} em uma população de linfócitos. Para isso utilizou-se o controle FMO PE, o qual a amostra foi marcada com anti-CD3-FITC, anti-CD8-PE/Cy5 e anti-CD45RO-PE/Cy7. Gráficos mostrados após a compensação de cores. Observa-se que o controle FMO (linha FMO PE) é mais indicado para definir a posição do *gate* do que de controle sem marcação (linha Controle sem marcação). **Fonte:** Adaptado de Perfetto SP, Chattopadhyay PK e Roederer M, 2004

2.10 Exclusão de *doublets*

Devido a caracteristica da amostra ou do processo de marcação ao qual ela foi submetida pode haver a formação de *doublets,* que consiste na agregação de duas células que ao passar na frente do *LASER* é caracterizada apenas como um evento. As partículas estão tão juntas que quando passam pelo ponto de interceptação, o instrumento é incapaz de distingui-las como eventos individuais. Quando apenas uma célula passa pelo ponto de interceptação, esta é denomida como *singlet.*

A presença dos *doublets* pode alterar o resultado da análise aumentando e/ou diminuindo os percentuais relativos a intensidade de fluorescência de um determinado marcador (Figura 2.18). Por exemplo, se o *doublet* consistir de uma célula CD4^{+} e uma

célula $CD4^-$, o evento será classificado como $CD4^+$. Entretanto a intensidade de fluorescência do evento será menor (Figura 2.18C) do que a de um evento apenas com *singlet* $CD4^+$ (Figura 2.18A). Enquanto que se o *doublet* representar duas células $CD4^+$ o evento continuará sendo classificado como $CD4^+$, porém com uma maior intensidade de fluorescência (Figura 2.18D) e se o evento consistir num *singlet* $CD4^-$ o evento que será classificado como $CD4^-$ (Figura 2.18B). Além disso, se o *doublet* consistir de uma célula $CD4^+$ e outra célula $CD8^+$, esse evento se caracterizara como uma população $CD4^+$ $CD8^+$, que em sangue periférico, por exemplo, é uma população rara, mas quando na verdade trata-se de um artefato gerado pelo *doublet*.

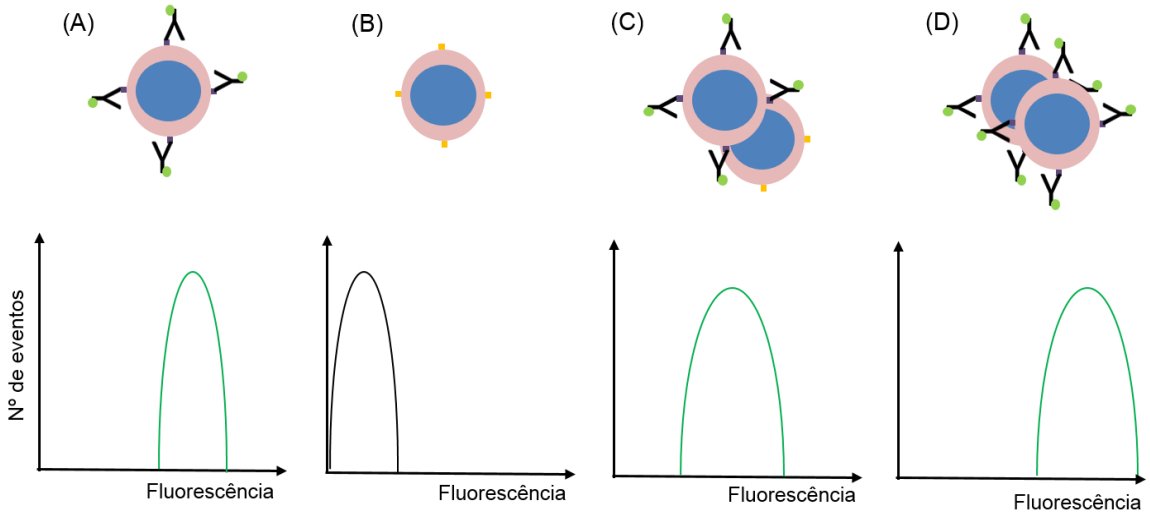


Figura 2.18 - Esquema de formação de *doblets*, o qual nas duas primeiras ilustrações (A e B) apenas uma célula passou pelo ponto de interceptação (*singlet*) enquanto nas duas últimas ilustrações (C e D) duas células passaram juntas pelo ponto de interceptação caracterizando apenas um evento (*doublet*). (A) Célula $CD3^+$ marcada como um anticorpo anti-CD3 ocorrendo assim a ligação entre o anticorpo e o receptor; (B) Célula $CD3^-$ marcada como um anticorpo anti-CD3, ou seja, não há marcação do anticorpo com o receptor; (C) Uma célula $CD3^+$ e outra $CD3^-$ marcadas como um anticorpo anti-CD3; (C) Duas células $CD3^+$ marcadas como um anticorpo anti-CD3. Os gráficos ilustram a intensidade de fluorescência referente as células diretamente a cima. Observa-se a diferença da intensidade de fluorsecência dos mesmos dependendo da quantidade de receptores marcados ($CD3^+$) e não marcados ($CD3^-$)

Um evento é a unidade fundamental de medição em citometria de fluxo e é definido pelo que chamamos de pulso. Pulsos ocorrem quando uma célula passa através do *LASER*, e essa passagem gera sinal para os detectores. Esse sinal é monitorado e processado pela parte eletrônica do citômetro gerando os parâmetros de Área (A), Altura (H do inglês *Height*) e largura (W do inglês *Widch*) (Figura 2.19). A área é a quantidade total de fluorescência associada a um evento, a altura é o sinal do pico e a largura é duração do sinal.

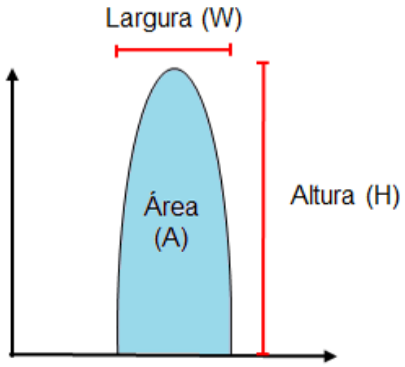


Figura 2.19 - Pulso gerado pela passagem de um evento ao passar pelo *LASER* no ponto de interpretação.

Quando duas células passam juntas na frente do *LASER* o pulso gerado por esse evento é alterado (Figura 2.20). Tanto a área quanto a largura do pulso do *doublet* são maiores do que a do *singlet* já que duas células levam mais tempo passando pelo feixe de *LASER* do que uma única célula, mas as alturas dos dois pulsos são muito próximas, se não idênticas.

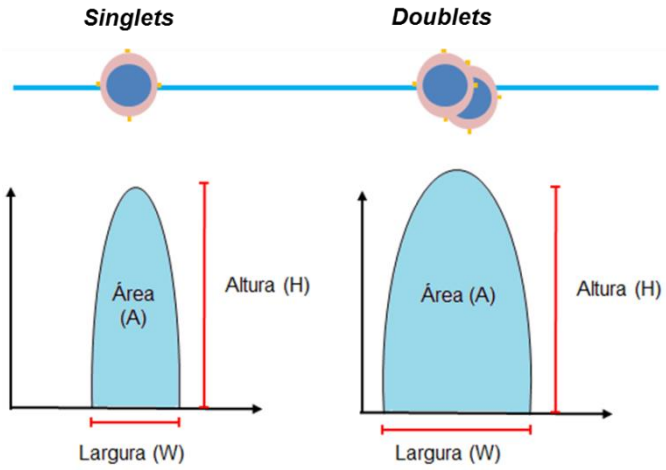


Figura 2.20 - Ilustração do pulso gerado por um *singlet* quando interceptado pelo *LASER* (a esquerda) e do pulso gerado por um *doublet* quando interceptado pelo *LASER* (a direita).

Então como fazer a discriminação de *doublets* e *singlets* na análise dos resultados? Isso pode ser feito de diversas maneiras, o método escolhido é geralmente baseado em preferências pessoais. Os gráficos típicos baseiam-se na dispersão fontral

(FSC - tamanho) podendo utilizar combinações distintas dos três parâmetros de medida do pulso (H, W e A) (Figura 2.21)

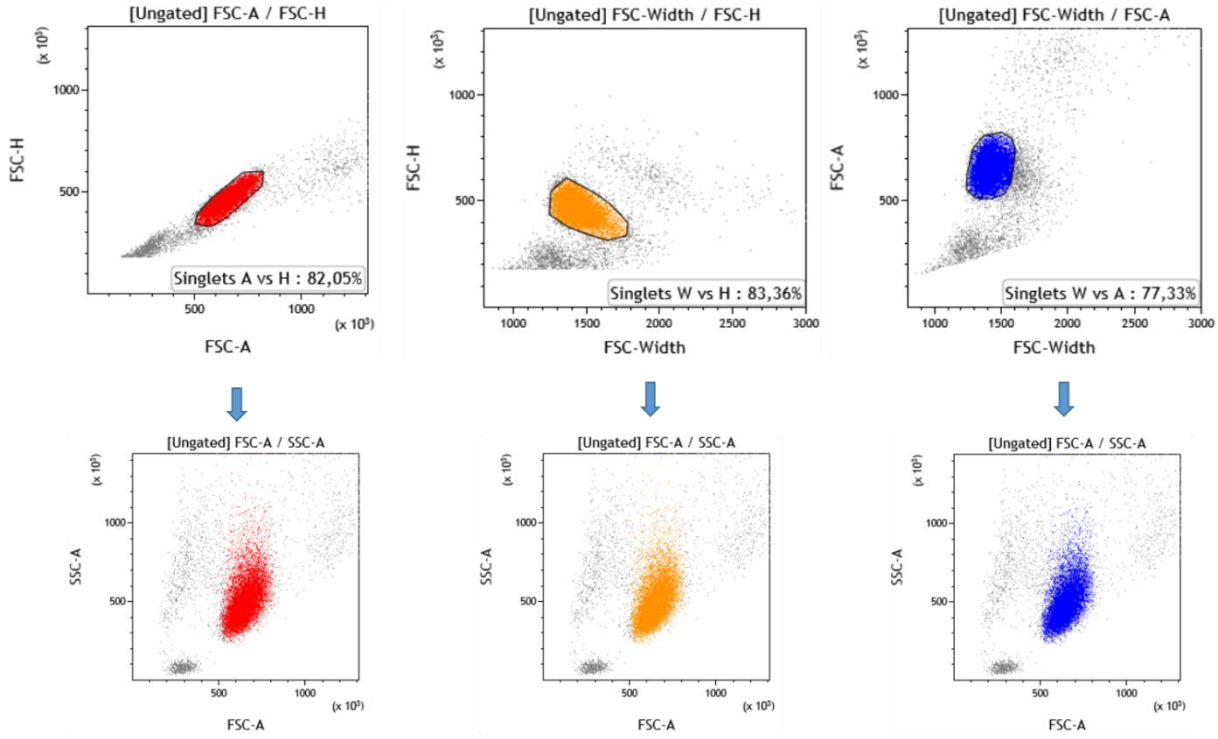


Figura 2.21 - Gráficos para exclusão de *doublets*, feitos de três maneiras diferentes, a partir de uma população enriquecida de granulócitos. Na primeira linha as três combinações possíveis para a exclusão de *doublets*: FSC-*Area* (A) *vs* FSC-*Height* (H), FSC- *Height* (H) *vs* FSC- *Widch* (W) e FSC-*Area* (A) *vs* FSC- *Widch* (W), respectivamente. Na linha abaixo o gráfico de morfologia (FSC- A *vs* SSC-A), mesma amostra, onde a população de *singlets* aparece colorida (*gate color*).

2.11 Histórico da Citometria de Fluxo

A história da Citometria de Fluxo pode ser contada a partir da invenção do microscópio ótico; seguido dos corantes, que permitiram a visualização de constituintes celulares; e das substâncias fluorescentes acompanhadas do surgimento do microscópio de fluorescência. Porém, a partir da construção do primeiro Citômetro de Fluxo *Cell Sorter*, por Mack Fulwyler (1965), baseado no princípio dos contadores celulares desenvolvidos por Wallace Coulter (1956) e a descoberta da técnica para produção de anticorpos monoclonais, por Köhler e Milstein (1975), é que a Citometria de Fluxo tomou um impulso expressivo dentro de diversas áreas de conhecimento. Ainda, a associação de anticorpos monoclonais às substâncias fluorescentes possibilitou uma maior especificidade na identificação dos componentes celulares, com consequente classificação mais detalhada das células. Posteriormente, o surgimento de

vários tipos de *LASER*, o desenvolvimento eletrônico e da informática computacional foram fundamentais para a evolução dos citômetros de fluxo.

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

Ao longo dos anos pôde-se perceber a evolução das máquinas, cujas características e particularidades se resumem no número de *LASERs*, número de 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 Eletronics, Inc.) e a Becton & Dickinson (BD), associadas a dois grandes citometristas: Wallace Coulter e Leonard Herzenberg, respectivamente.

No Brasil, a história da Citometria de Fluxo pode ser contada a partir de 1988, quando o primeiro citômetro de fluxo a ser importado para o país – o EPICS 751 da Coulter Electronics, Inc. (Figura 2.22), foi instalado no então Departamento de Protozoologia, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Figura 2.22 - EPICS 751 *Cell Sorter* da então Coulter Electronics, Inc. Primeiro citômetro de fluxo instalado no Brasil, em 1988 – 2 *LASERs*, 4 cores, *sorting* em duas vias. Dept. de Protozoologia, IOC, FIOCRUZ, de 1989 a 1999. Foto-cortesia: Alvaro Luiz Bertho**.**

Desde então a citometria de fluxo, devido a suas diversas aplicações nas ciências biológicas, apresenta uma crescente demanda de utilização por vários laboratórios

clínicos e de pesquisa em todo o País, e por isso houve um aumento considerável na aquisição destes equipamentos.

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

Pensando desta maneira, o IOC/FIOCRUZ RJ investiu ao longo destes 25 anos no aprimoramento tecnológico com aquisição de alguns citômetros de fluxo FACSCalibur (Figura 2.23), Cyan ADP Analyzer (Figura 2.24), EPICS XL-MCL Analyzer (Figura 2.25), MoFlo ASTRIOS Cell Sorter (Figura 2.26), Cytoflex (Figura 2.27), FACSAria Cell Sorter (Figura 2.28), Accuri C6 Analyzer, FACSCanto, Gallios.

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

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

- **Núcleo de Análise Celular:** com dois citômetros de fluxo – FACS Calibur (BD) (Figura 2.23) e Cyan ADP (Beckman Coulter) (Figura 2.24);
- **Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*):** onde se encontram três citômetros de fluxo - EPICS XL-MCL Analyzer (Beckman Coulter) (Figura 2.25); MoFlo ASTRIOS *Cell Sorter* (Beckman Coulter) (Figura 2.26); e Cytoflex (Beckman Coulter) (Figura 2.27**)**.

Figura 2.23 - FACS Calibur *Analyzer* (BD). 2 *LASERs,* 4 cores. *Software*: *Cell Quest*. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Figura 2.24 - Cyan ADP Analyzer (Beckman Coulter). 2 *LASERs,* 7 cores. *Software*: *Summit* 4.3. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Figura 2.25 - EPICS XL-MCL *Analyzer* (Beckman Coulter). 1 *LASER*, 4 cores. *Software*: Expo 32. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Figura 2.26 - MoFlo Astrios *Cell Sorter* (Beckman Coulter). 3 *LASERs*, 11 cores, *sorting* em 6 vias; *Software*: Summit 6.1. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Figura 2.27 - CytoFLEX (Beckman Coulter). 3 *LASERs*, 12 cores. *Software*: CytExpert. Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Plataforma de Citometria de Fluxo da FIOCRUZ/RJ - PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico e Insumo em Saúde) – onde se encontra o FACS Aria *Cell Sorter* (BD) (Figura 2.28).

Figura 2.28 - FACS Aria II *Cell sorter* (BD). 2 *LASERs* 11cores; *Software*: Diva. Plataforma PDTIS, FIOCRUZ.

Além dos equipamentos das plataformas, a FIOCRUZ-RJ ainda possui no seu parque tecnológico outros citômetros de fluxo, como: Accuri C6 *Analyzer*, FACS Verse e FACS Canto (todos BD Bioscience) instalados em laboratórios do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Gallios *Analyzer* (Beckman Coulter) instalado no Instituto Nacional de

Infectologia (INI), LSRFortessa (BD Bioscience) instalado em Biomanguinhos e um CytoFlow (ParTec) no Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS).

Além dos citômetros de fluxo apresentados acima, existem hoje no mercado outros, como: MoFlo XDP (Beckman Coulter) (Figura 2,29); Influx (BD); FACSVerse (BD); LSRFortessa (BD); FACS Jazz (BD); FACS Aria Fusion (BD) entre outros.

Figura 2.29 - MoFlo XDP *Cell Sorter* (Beckman Coulter). 3 *LASERs*, 11 cores. *Software*: Summit 5.0.

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

REFERÊNCIAS

Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):648-55.

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

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

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

http://www.bdbiosciences.com. Acesso em: maio. 2018

https://www.beckmancoulter.com. Acesso em: maio. 2018

http://www.biolegend.com. Acesso em: maio. 2018

https://expertcytometry.com. Acesso em: maio. 2018.

https://www.merckmillipore.com. Acesso em: maio. 2018

http://www.sonybiotechnology.com . Acesso em: maio. 2018

https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry.html Acesso em: maio. 2018

.

CAPÍTULO 3. APLICAÇÕES GERAIS DA CITOMETRIA DE FLUXO

Alessandro Marins dos Santos, Alinne Renzetti, Clarissa Cunha, Jessica Lima e Thaize Chometon

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

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

3.1 Distinção de populações celulares

Para identificar e distinguir os diferentes tipos celulares, utiliza-se parâmetros morfológicos e/ou fenotípicos. Os parâmetros morfológicos, tamanho e granulosidade celular, são avaliados pela citometria de fluxo através dos parâmetros de dispersão frontal do *LASER* (FSC) e lateral (SSC), descritos anteriormente. O fenótipo celular, conhecido também como imunofenotipagem, pode ser avaliado pela presença de diferentes antígenos presentes em diversos compartimentos celulares como: membrana citoplasmática (receptores de superfície), citoplasma e núcleo.

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

Somente com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), tem a possibilidade de diferenciar algumas populações celulares, um exemplo dessa diferenciação por características morfológicas é a distinção entre linfócitos, monócitos e granulócitos em sangue periférico humano, demonstrado na figura 3.1. Esta diferença

pode ser considerada vantajosa, por não utilizar reagentes, como os anticorpos monoclonais, contudo, somente com esses parâmetros não seja possível distinguir as subpopulações com características semelhantes, como por exemplo os linfócitos B, linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, devido a este fato a identificação morfológica pode ser realizada juntamente com a imunofenotipagem.

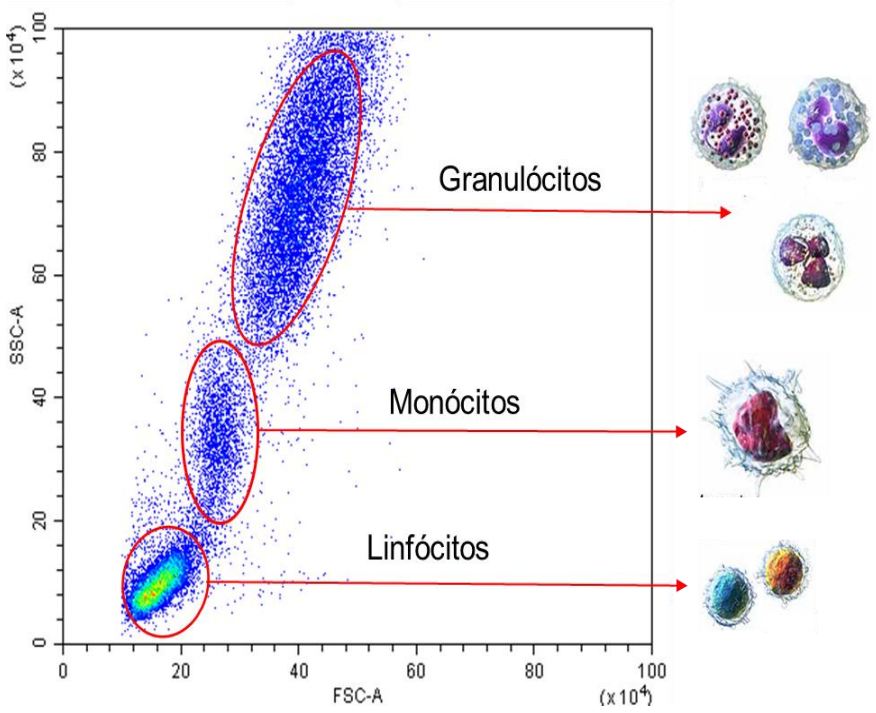


Figura 3.1 - *Forward scatter* (FSC) - tamanho e *Side scatter* (SSC) - granulosidade de sangue periférico humano após a lise de hemácias (*Lysis solution*), onde se observa que as células presentes nesse tipo de amostra possuem características morfológicas distintas. Fonte: Chometon & Bertho, 2017.

3.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Atualmente a imunofenotipagem por citometria de fluxo pode ser considerada uma das ferramentas multiparamétricas mais relevantes para a definição de frequência de subpopulações celulares dentro de um conjunto amostral heterogêneo, e principalmente, analisar o perfil de expressão molecular estabelecendo o fenótipo individual de cada célula, através da imunomarcação de antígenos de superfície celular ou intracitoplasmáticos. A imunofenotipagem auxilia fortemente na execução de diagnósticos clínicos, determinação de progressão da doença, monitoramento da resposta ou eficácia de tratamento; separação de células com determinado fenótipo para ensaios celulares funcionas *in vitro,* transferência celular autóloga ou adotiva para animais isogênicos ou imunodeficientes e análises de expressão gênica, proteica e

metabólica de uma subpopulação celular específica. Vale ressaltar que a grande expansão das metodologias em citometria de fluxo pode estar relacionada diretamente à introdução da técnica de produção de anticorpos monoclonais a partir de hibridomas (Figura 3.2). Com a conjugação de fluorocromos a anticorpos monoclonais teve início a imunofenotipagem, principal aplicação da citometria de fluxo até os dias atuais.

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

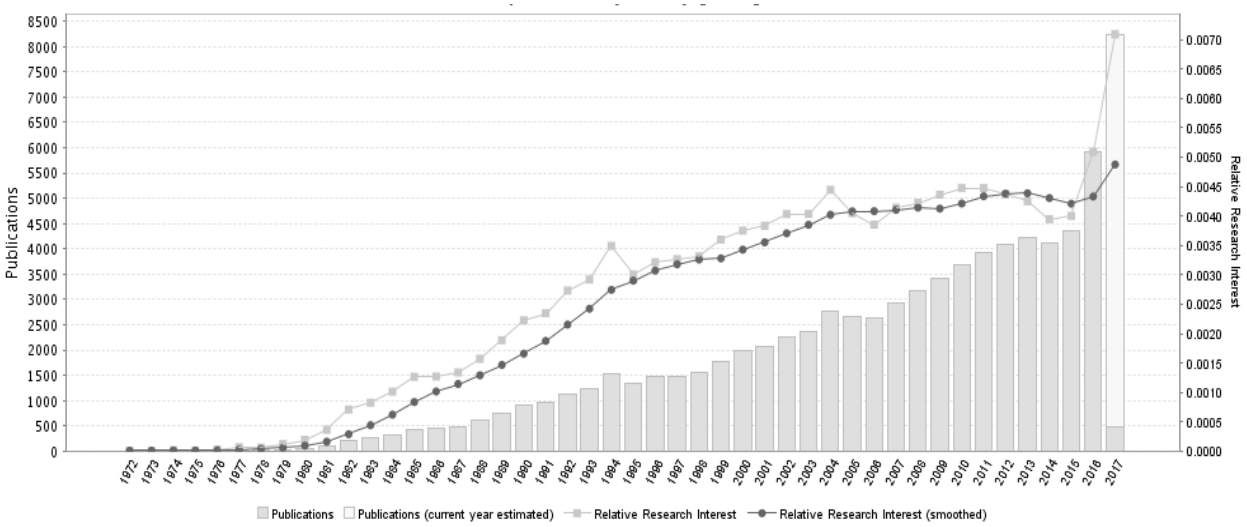


Figura 3.2 - Gráfico mostrando o número de artigos publicados utilizando a citometria de fluxo por ano, desde 1976 até 2016. Fonte: http://www.gopubmed.com

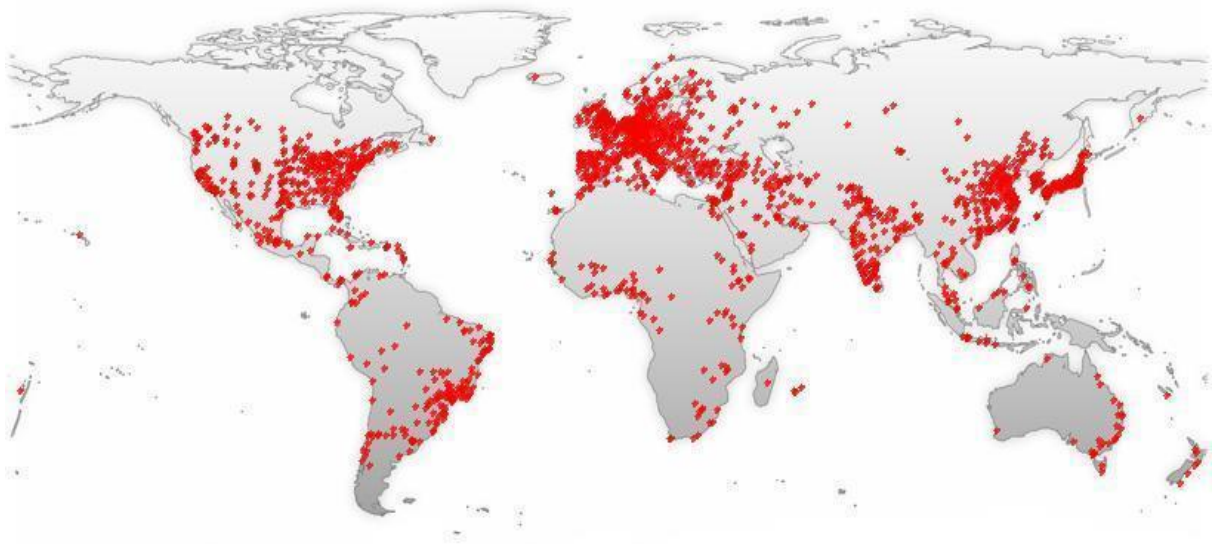


Figura 3.3 - Distribuição mundial (dados de 2017) da utilização da citometria de fluxo.
Fonte: http://www.gopubmed.com

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

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

diagnosticadas e classificadas através da citometria de fluxo. Nestas doenças, a citometria é indispensável na definição da linhagem e estágio de maturação dos blastos.

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

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

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

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

Os eritrócitos também são tipos celulares passíveis de análise por citometria de fluxo. Nos casos de eritroblastose fetal, por exemplo, pode-se detectar, avaliar e quantificar os eritrócitos fetais presentes no sangue materno. Para tal, são utilizados anticorpos anti-Rh (antígeno D) e anti-hemoglobina F. Com a permeabilização dos eritrócitos, os anticorpos se ligam à cadeia γ da hemoglobina humana, o que permite a distinção entre as células maternas com hemoglobina F e as células fetais. Ainda, como um número muito pequeno de células fetais Rh^+ (cerca de 0,1%) é suficiente para sensibilizar a mãe, se faz necessária a aquisição de muitas células para a obtenção de um resultado seguro. Assim, a citometria vem se mostrando muito mais acurada, objetiva e sensível do que o teste tradicional para investigação da eritroblastose fetal. A hemoglobinúria paroxística noturna (PNH), uma doença relacionada a células-tronco clonais, também pode ser diagnosticada através da citometria de fluxo, pela detecção de redução ou ausência de CD55 e CD59. A PNH é causada pela biossíntese deficiente de um glicosilfosfatidilinositol, que ancora várias proteínas imunoregulatórias, e do complemento na superfície de eritrócitos e de outras células sanguíneas (como monócitos, neutrófilos, linfócitos e plaquetas). Esta deficiência resulta em uma susceptibilidade dos eritrócitos à lise mediada pelo complemento, gerando uma hemólise intravascular crônica, que pode se tornar uma anemia aplásica e seguida de uma leucemia aguda.

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

O estudo das plaquetas por citometria de fluxo tem se tornado cada vez mais frequente nos laboratórios clínicos. Ensaios de imunoglobulinas associadas a plaquetas

são aplicados em várias doenças, como na púrpura trombocitopênica autoimune, por exemplo, na qual a maioria dos anticorpos secretados se 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, eventos trombóticos e na avaliação dos componentes do sangue durante procedimentos de circulação extracorpórea e diálise renal.

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

A imunofenotipagem por citometria de fluxo também é uma ferramenta valiosa na área de biologia do desenvolvimento, considerando seu alto potencial e acurácia para estabelecer a caracterização e isolamento de subpopulações celulares para estudos funcionais. Recentemente, estudos de grande impacto científico na área de reprogramação celular tem utilizado a imunofenotipagem por citometria de fluxo como uma metodologia essencial para a obtenção de subpopulações específicas e caracterização de células reprogramadas. Grande parte dos estudos na área de reprogramação celular utilizam fibroblastos humanos de pele, por exemplo. Tais fibroblastos são desdiferenciados até um determinado estágio de pluripotência, e posteriormente diferenciados artificialmente *in vitro,* nestes diferentes estágios torna-se essencial caracterizar o perfil celular e neste sentido, muitos estudos utilizam a imunofenotipagem através de citometria de fluxo. Nesta etapa geralmente são imunomarcados fatores de transcrição determinísticos de pluripotência e não diferenciação (DMNT3B, HTERT, NANOG, OCT4, REX1, e SOX2 por exemplo) e de diferenciação em corpos embriônicos (AFP, FLK1, GATA2, GATA4, NCAM, e PAX6 por exemplo). Num segundo momento nestes estudos, a imunofenotipagem também é utilizada para caracterizar o estado biológico e fisiológico dessas células após ensaios de transferência celular adotiva para camundongos humanizados (camundongos imunodeficientes que possuem menor rejeição transplante), por exemplo. Entretanto, nessa etapa estas células geradas a partir de células pluripotentes induzidas são

imunomarcadas com anticorpos direcionados a antígenos celulares humanos para a caracterização fenotípica de biomarcadores importantes para a manutenção das atividades biológicas e fisiológicas da célula. Nesta etapa essas células também podem ser isoladas através de separação por citometria de fluxo e analisadas quanto a expressão global de genes que permitem comparações destas com células de mesma especialização, porém genuínas do organismo onde os fibroblastos foram obtidos, ou seja, não geradas a partir de células pluripotentes induzidas.

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

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

PRINCIPAIS APLICAÇÕES CLÍNICAS DA CITOMETRIA DE FLUXO		
ÁREA	**APLICAÇÕES CLÍNICAS**	**MOLÉCULAS COMUMENTE AVALIADAS**
IMUNOLOGIA	Histocompatibilidades por crossmatch	IgG, IgM
	Rejeição de transplantes	CD3, OKT3 circulante
	Monitoramento de pacientes HIV+	CD45, CD4, CD3, CD8
	Estudos de Imunodeficiências	CD4, CD8
ONCOLOGIA	Conteúdo de DNA	DNA
	Análise de marcadores de proliferação	PCNA, Ki-67
	Fenótipos de leucemias e linfomas	Antígenos leucocitários do sangue
HEMATOLOGIA	Contagem de células hematopoiéticas progenitoras	CD34
	Contagem de reticulócitos	RNA
	Enfermidades autoimune e aloimunes	IgG, IgM, Proteína do Complemento
	Eritroblastose	Hemoglobina F, antígeno D
BANCO DE SANGUE	Imunohematologia	Antígenos eritrócitos de superfície
	Contaminação leucocitária	Antígenos leucocitários de superfície
DESORDENS GENÉTICA	PNH	CD55, CD59
	Deficiência de adesão leucocitária	CD11, Complexo CD18

3.3 Avaliação do conteúdo de DNA

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

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

Tabela 3.2 - Corantes fluorescentes mais utilizados na marcação de DNA.

FLUOROCROMO	ABREVIAÇÃO	EXCITAÇÃO (*LASER*)	EMISSÃO
Diamidinofenilindol	DAPI	358 nm (UV;Violeta)	461 nm
Bisbenzimidazol	Hoechst 33342	355 nm (UV)	461 nm
	Hoechst 33258	343 nm (UV)	450 nm
Iodeto de Propídeo	PI	535 nm (488, 535)	617 nm
Laranja de Acridina	AO	503 nm (488)	525 nm
7-aminoactinomicina-D	7AAD	546 nm (488; 535)	647 nm

O iodeto de propídeo (PI) é um dos corantes mais utilizados para avaliação do conteúdo de DNA, possui a propriedade de se intercalar em pequenas sequências de

bases nucleotídicas e fluoresce na faixa do espectro luminoso visível do vermelho (617nm), quando excitado por um *LASER* 488 nm (azul). Devido às suas características físico-químicas, o PI tem sido utilizado na citometria de fluxo tanto para avaliação da viabilidade celular e apoptose, quanto para determinação de conteúdo de DNA, dependendo do protocolo de marcação utilizado. Por ser impermeável à membrana plasmática íntegra, o PI é utilizado em protocolos citofluorimétricos como corante vital, de forma que as células negativas para a marcação com PI estão viáveis e as células mortas, que perderam a integridade da membrana plasmática, são positivas para tal marcação (Figura 3.4).

Os protocolos utilizados para identificar as células em diferentes fases do ciclo celular necessitam uma etapa de permeabilização da membrana, através da utilização de detergentes (p.ex. Triton-X100, saponina, NP40) ou alcoóis (metanol e etanol), com o intuito de permitir a entrada do PI na célula. Como o PI também se intercala às bases nucleotídicas do RNA, a utilização de Ribonuclease A é fundamental para especificar a marcação ao DNA nestes protocolos. A análise é baseada na quantificação da incorporação do PI no DNA celular. Assim, após a análise destas células no citômetro de fluxo, pode-se definir as células na fase G0/G1, S e G2/M de acordo com a intensidade de fluorescência, relativa ao aumento do conteúdo de DNA intracelular. Ainda, as células com uma menor intensidade de fluorescência são as células que apresentam uma fragmentação do DNA, característica do fenômeno de morte celular (apoptose) (Figura 3.4). É importante salientar que as escalas utilizadas nos histogramas para análise nos protocolos descritos acima devem ser logarítmicas e lineares, respectivamente (Figura 3.4 e 3.5).

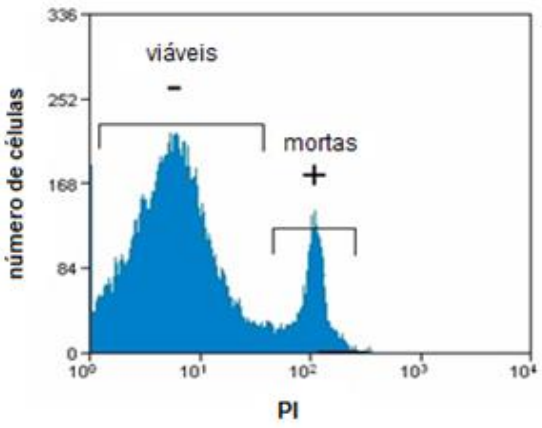


Figura 3.4 - Histograma citofluorimétrico de número de células *vs.* intensidade de fluorescência do PI em diferentes protocolos: para viabilidade celular.

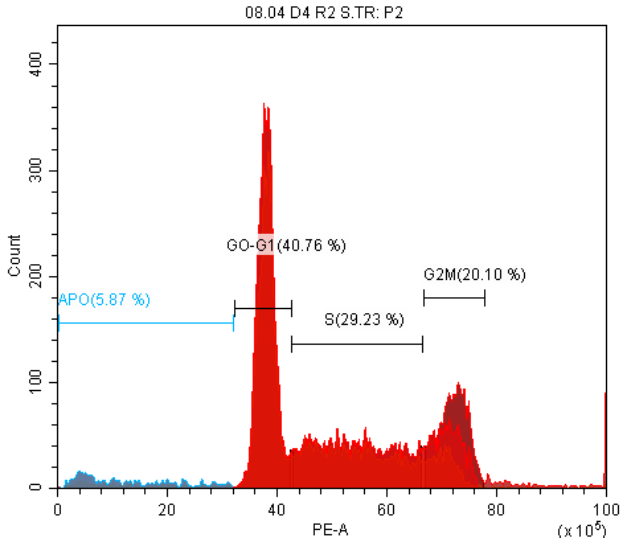


Figura 3.5 - Histograma citofluorimétrico de némero de células *vs* intensidade de fluorescência para avaliação do ciclo celular. Fonte: Chometon & Bertho, 2017

O DAPI possui afinidade pela ligação Adenina-Timina em DNA de dupla fita e emite fluorescência na faixa do azul (461nm) quando excitado pelo *LASER* UV ou Violeta. Também pode se intercalar à ligação Adenina-Uracila do RNA, porém, neste caso, emite fluorescência com um pico de emissão diferente da ligação ao DNA (500nm). Outro corante excitado pelo *LASER* UV é o Hoechst 33342, que apresenta pico máximo de emissão de 461nm (azul). Geralmente é empregado em substituição ao DAPI devido à sua propriedade lipofílica (não necessitando de permeabilização da membrana) e apresenta ótima aplicabilidade em estudos sobre replicação e divisão

celular, assim como apoptose. A grande vantagem dos corantes excitados pelo *LASER* UV é que seus picos de emissão não sobrepõem os picos de emissão dos fluorocromos tradicionais e mais frequentemente utilizados (como FITC e PE), sendo preferencialmente utilizados em protocolos multiparamétricos. Porém a grande desvantagem é o alto custo deste *LASER*, o que torna difícil a incorporação deste tipo de *LASER* nos citômetros de fluxo mais atuais.

A citometria de fluxo fornece também uma maneira mais direta de mensurar a síntese de DNA, através do emprego da bromodeoxiuridina (BrdU), um nucleotídeo sintético análogo à timidina que se incorpora ao DNA sintetizado nas células em proliferação (durante a fase S do ciclo celular). Para avaliação por citometria de fluxo, utiliza-se um anticorpo específico anti-BrdU conjugado a um fluorocromo diferente da ficoeritrina (PE). Vale ressaltar que o DNA pode ser marcado ao mesmo tempo com PI e BrdU, resultando um *dot plot* biparamétrico da fluorescência do PI *vs.* a fluorescência do BrdU incorporado (Figura 3.6).

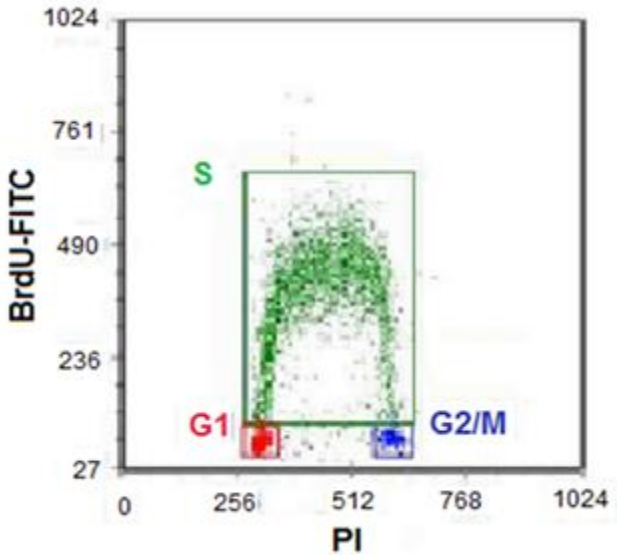


Figura 3.6 - Avaliação das fases G1, S, G2/M do ciclo celular através de *dot plot* da fluorescência de FITC (conjugado a BrdU) *vs* fluorescência do PI.

Existem outras maneiras de explorar o potencial da citometria de fluxo na avaliação de DNA através da combinação da marcação com dois corantes específicos ou com outros parâmetros. O corante laranja de acridina, por exemplo, possui a propriedade de se ligar ao DNA e ao RNA e emitir fluorescência diferente para cada

ligação; isto é, quando se liga ao DNA emite uma fluorescência verde (525nm) e quando intercalado ao RNA emite uma fluorescência vermelha (650nm). Esta diferença ocorre porque a ligação ao DNA é por intercalação enquanto ao RNA a ligação ocorre por atração eletrostática. A análise simultânea dos conteúdos de DNA e RNA fornece dados mais claros acerca da progressão das células durante o ciclo celular.

Outra interessante aplicação é o estudo dos cromossomos através da marcação do DNA com cromomicina A3 e Hoechst 33258. Enquanto a cromomicina A3 é específica para Guanina-Citosina no DNA, o Hoechst 33258 tem afinidade pela interação Adenina-Timina**,** permitindo assim a análise do cariótipo, já que, mesmo cromossomos que possuem conteúdo similar de DNA, diferem na distribuição dos pares de bases (Figura 3.7).

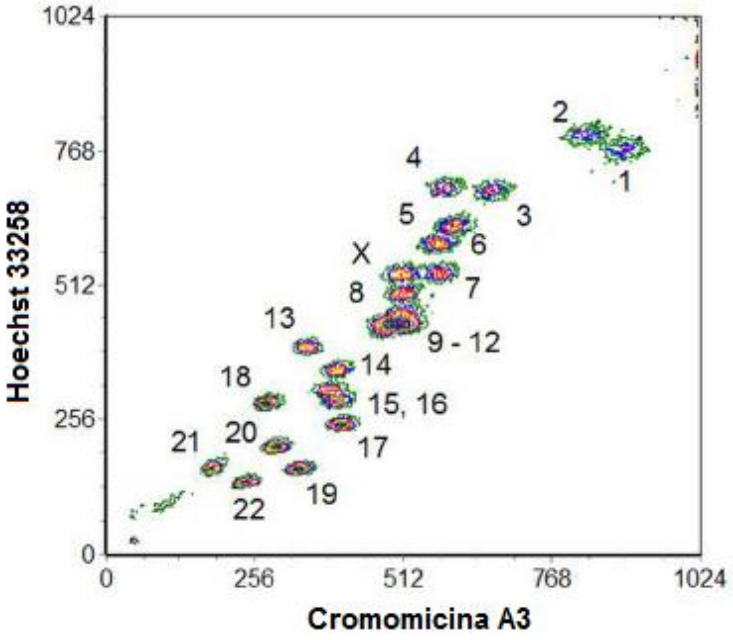


Figura 3.7 - Avaliação de cariótipo normal humano através de *dot plot* da marcação de Hoechst 33258 *vs*. cromomicina A3.

3.4 Morte Celular – Apoptose

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

plasmática, a apoptose é um evento programado, com a função de manter a homeostase do organismo e se caracteriza por manter a integridade da membrana.

Devido a uma grande diversidade de moléculas que podem ser avaliadas para caracterizar os eventos apoptóticos, a citometria de fluxo é uma ferramenta cada vez mais utilizada no estudo de diversas doenças associadas a este processo. A apoptose pode ser observada apenas pelos parâmetros de tamanho e granularidade (Figura 3.8), sem a necessidade de submeter a amostra a um protocolo de marcação, embora o uso de marcadores para determinar tal processo seja muito mais específico.

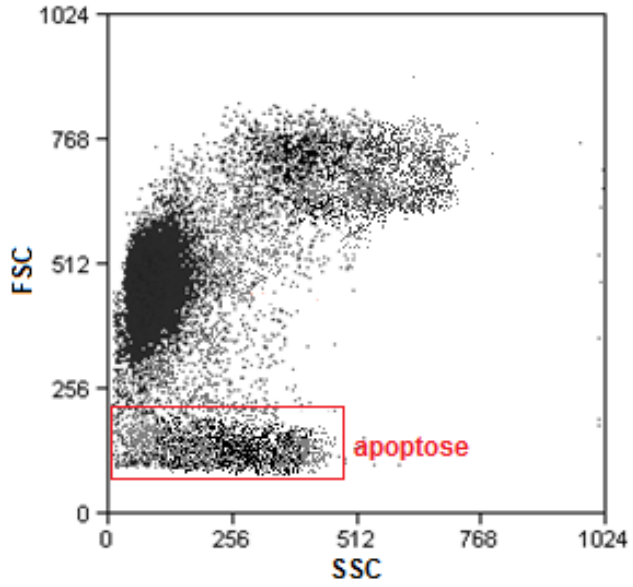


Figura 3.8 - *Dot plot* de tamanho (FSC) *vs*. granularidade (SSC) de uma amostra células mononucleares de sangue periférico, no qual é possível observar as células que provavelmente se encontram em processo de apoptose, devido à diminuição de tamanho, como resultado do encolhimento celular, e aumento de granularidade, como resultado da condensação da cromatina.

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

Diversas proteínas relacionadas com o processo de apoptose podem servir como marcador através da utilização de anticorpos monoclonais específicos, como anti-Fas,

anti-Bax, anti-Bid, anti-Bcl-2, anti-caspase-3, anti-p53. Podem ser utilizados para avaliação de apoptose ainda algumas substâncias fluorescentes relacionadas ao potencial de membrana mitocondrial, como Rodamina 123 e $DioC_6$, 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 3.9A). O uso combinado de Hoechst 33342 com PI permite também a distinção entre os dois processos de morte, pois ambos os corantes marcam as células em necrose, e a intensidade de fluorescência de Hoechst 33342 é maior nas células apoptóticas (devido à cromatina compactada) em comparação às células viáveis. Outra combinação muito utilizada é de Anexina-V e PI, onde as células necróticas são positivas somente para a marcação com PI, as células em apoptose inicial (ainda com a membrana íntegra) são positivas somente para Anexina-V e as células em apoptose tardia e ou necrose são positivas para as duas marcações (Figura 3.9B).

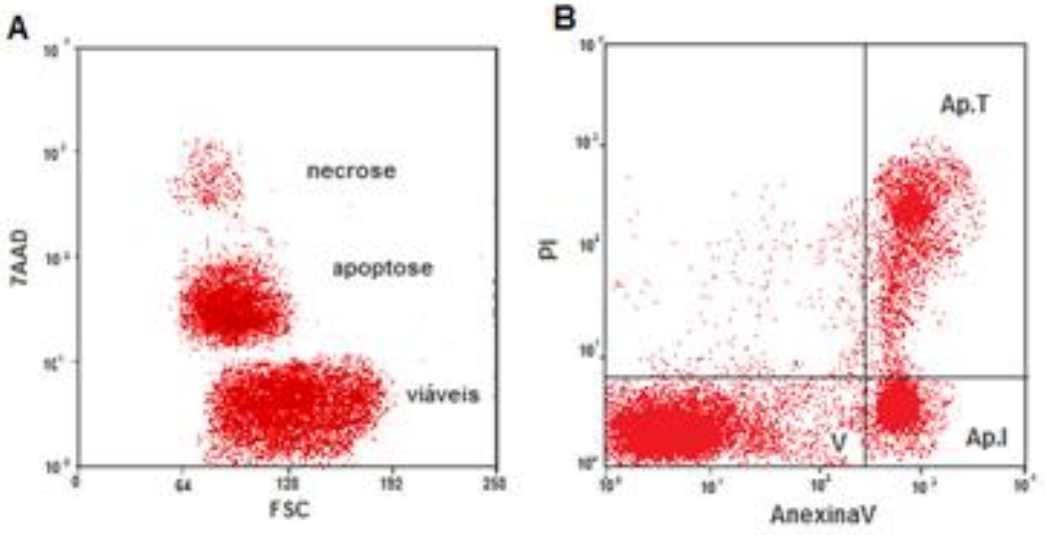


Figura 3.9 - (A) *Dot plot* de tamanho (FSC) *vs* a fluorescência de 7-AAD, permitindo a visualização de três populações: células viáveis, células em apoptose e células em necrose; (B) *Dot plot* da fluorescência do PI *vs* a fluorescência da Anexina V, diferenciando as células em necrose (N), em apoptose tardia e/ou necrose (Ap.T), em apoptose inicial (Ap.I) e as viáveis (V).

3.5 Proliferação celular

Existem duas abordagens básicas para se estudar a proliferação celular: uma através da avaliação do ciclo celular (já exposto), e a outra através da avaliação do número de divisões celulares ao longo de um período de tempo. Nesta última, um número maior de divisões celulares pode ser observado, mas não há informações sobre o ciclo celular. As substâncias mais utilizadas para esta finalidade são o CFSE, que se liga a proteínas citosólicas e de membrana, e o PHK26, que é um corante lipofílico com afinidade com membranas celulares. Recentemente, foi disponibilizado comercialmente, um novo corante chamado *Violet Cell Proliferation* com papel similar ao CFSE, mas que é excitado pelo *LASER* Violeta (405 nm). O princípio destas substâncias é que elas se ligam a estruturas nas células e, de acordo com a divisão destas, o corante também vai se dividindo entre as células-filhas (Figura 3.10).

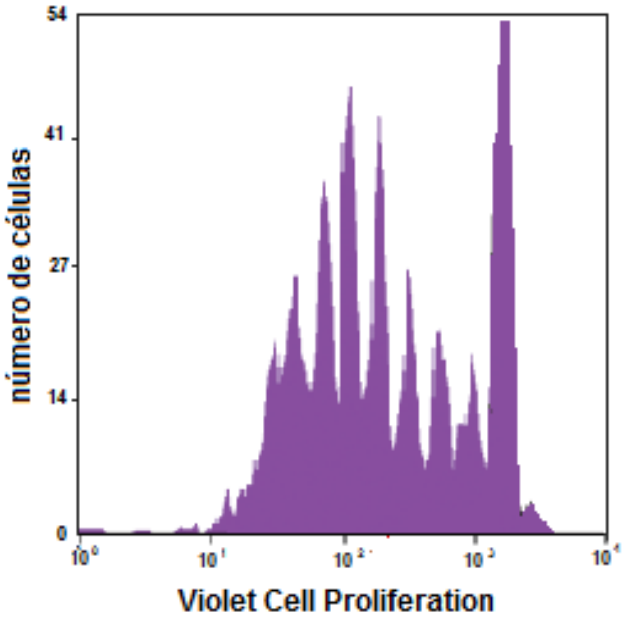


Figura 3.10 - Histograma da intensidade de fluorescência do *Violet Cell Proliferation*. Os picos representam sucessivamente, da maior para a menor intensidade, as divisões das células em análise. Adaptado de http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C34557

3.6 Ensaios funcionais

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

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

O rápido aumento do influxo de cálcio (Ca^{2+}) é uma das primeiras respostas de muitos tipos celulares aos diversos estímulos externos, podendo resultar na ativação de enzimas responsáveis por mudanças no metabolismo e no desenvolvimento dessas células. Muitos corantes fluorescentes são utilizados para avaliar a concentração intracelular de Ca^{2+} e suas fluorescências são proporcionais a esta concentração. Os corantes mais utilizados são *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.

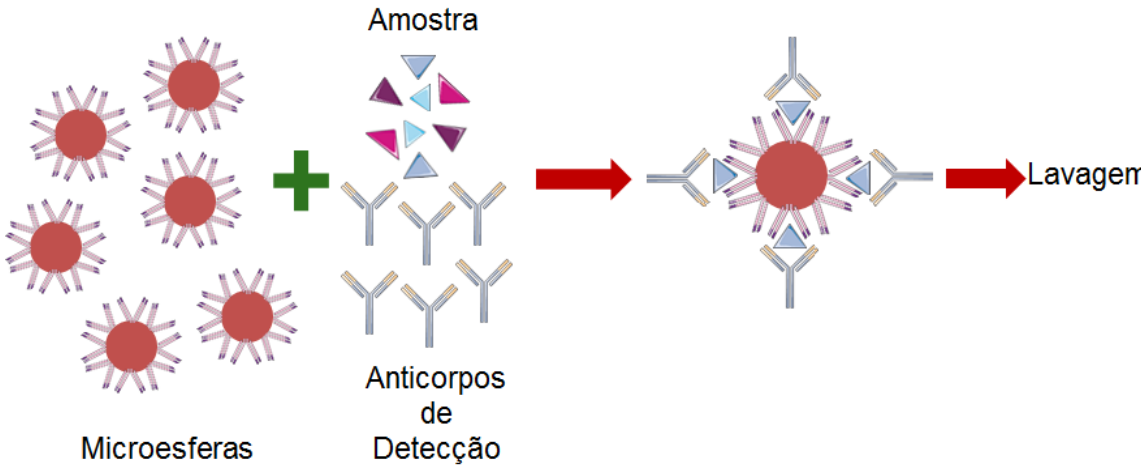
Ensaios para avaliação da produção de espécies oxidativas são empregados principalmente na avaliação de *burst* oxidativo de neutrófilos, de alterações na concentração de produtos oxidativos durante a apoptose e da produção intracelular de espécies oxidativas sob diferentes estímulos. Os compostos mais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

3.7 *Bead-based immunoassay*

O objetivo desta técnica de citometria de fluxo é detectar e quantificar moléculas em fluidos, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas sinalizadoras. Por se tratarem de kits mais específicos, hoje são disponibilizados por

duas empresas BD Bioscience e Biolegend chamados respectivamente de *Cytometric Beads Array* (CBA) e LEGENDplex.

O princípio de tal metodologia é a utilização de microesferas com fluorocromos incorporados em diferentes proporções, ficando cada grupo de microesferas com uma intensidade de fluorescência única, que é associado a um anticorpo específico para um analito. Quando a amostra é incubada com essas microesferas, cada analito se ligará ao seu anticorpo específico, ligado à respectiva microesfera. Após a incubação, são então adicionados anticorpos secundários (anticorpos de detecção), marcados com fluorescência diferente da usada nas microesferas, que se ligarão aos analitos (Figura 3.11). Assim, quanto maior a concentração do analito, maior a marcação do anticorpo secundário e, consequentemente, o deslocamento do grupo de esferas no histograma (Figura 3.12). Após a aquisição dos eventos pelo citômetro de fluxo, a quantificação de cada analito é feita com base nos valores de intensidade de fluorescência da curva padrão.



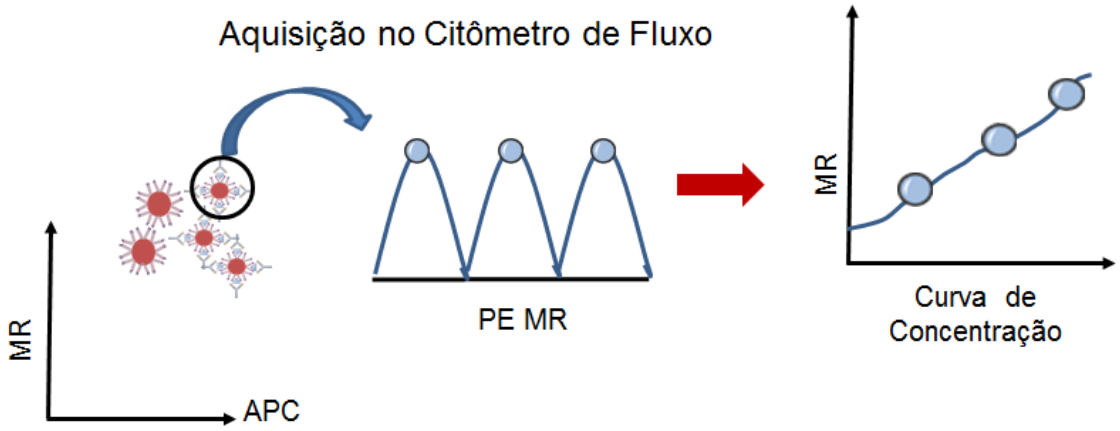


Figura 3.11 - Desenho esquemático do princípio da técnica de *Bead-based immunoassay*. Adaptado de http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Brochure_Intl.pdf por Renzetti, 2018

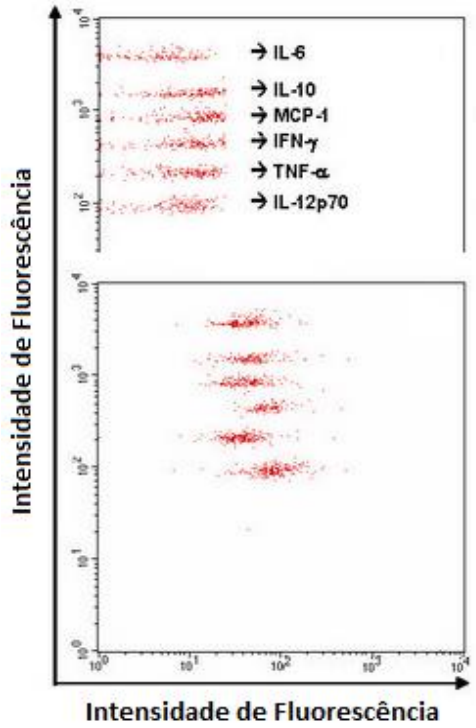


Figura 3.12 - Exemplo de *dot plots* de marcações para citocinas por CBA. O eixo X corresponde à intensidade de fluorescência das microesferas; e o eixo Y à intensidade dos anticorpos monoclonais. Adaptado de Hemdan, 2008.

3.8 Análise de micropartículas

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

Muitos estudos têm sugerido uma associação entre micropartículas e diferentes condições patológicas, como câncer, doença cardiológicas e renais. Entretanto por se algo ainda pouco descrito, os estudos já existentes ainda são controversos principalmente com relação aos níveis de micropartículas que possam ser considerados

patológicos e a necessidade da padronização dos diferentes protocolos utilizados, para que assim seja possível à utilização de micropartículas como biomarcadores úteis na prática clínica.

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

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

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

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

Por se tratarem de moléculas muito pequenas é necessária muita cautela para caracterizá-las por citometria de fluxo. Geralmente *bead* de tamanhos já conhecidos são utilizados para auxiliar na identificação de diferentes MPs de diferentes tamanhos (Figura 3.13).

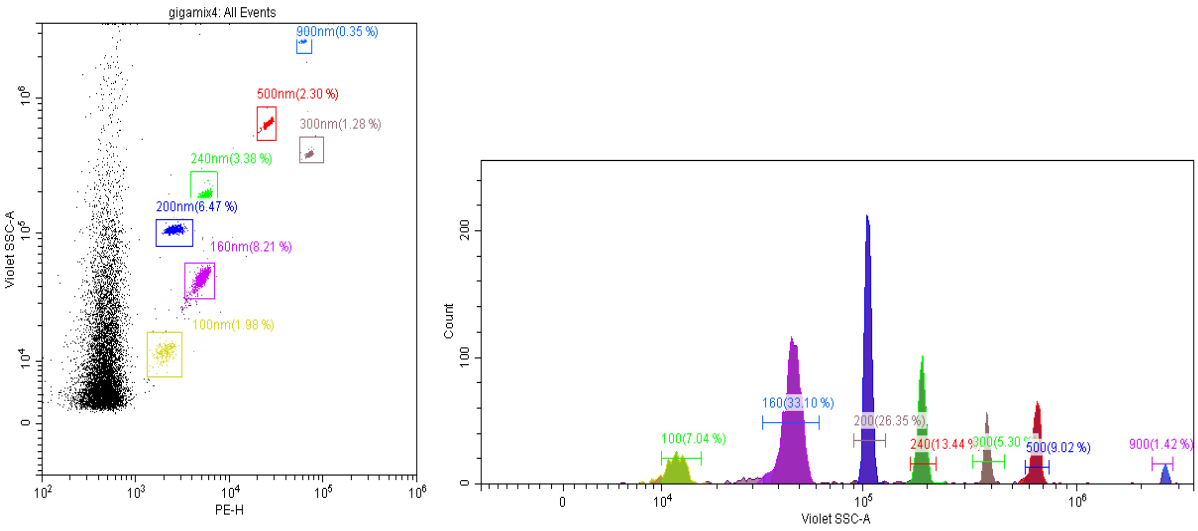


Figura 3.13 - Gráficos representando *beads* de diferentes diâmetros observadas por citometria de fluxo. Fonte: Chometon & Bertho, 2017

Além disso, diferentes marcadores como a calceína, anexina V são utilizados para identificar as MPs de maneira geral. A Calceína AM é uma substância não fluorescente que em partículas íntegras ou em células viáveis é transportada através da membrana celular. Já na parte interna da partícula, esterases hidrolisam a calceína convertendo-a a um produto fluorescente, o mesmo não ocorre em células e partículas não viáveis e íntegras. Enquanto a anexina V se liga à fosfatidilserina presente na membrana das MPs. As verdadeiras MPs são consideradas como os eventos duplo-positivos para anexina V e Calceína AM (Figura 3.14).

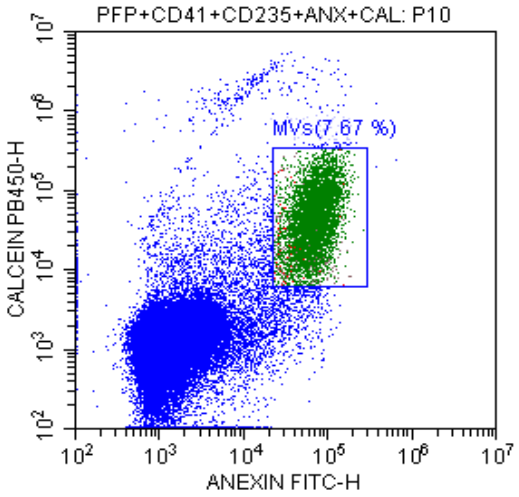


Figura 3.14 - Para definição de MPs após seleção da população pela morfologia (FSC x SSC), todos os eventos positivos para a anexina-V e a calceína AM são definidos como eventos MP "verdadeiros". Fonte: Chometon & Bertho, 2017.

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

Tabela 3.3 - Principais marcadores utilizados para identificação da origem das MPs.

ORIGEM DA MP	MARCADOR
Linfócito T CD4+	CD3 e CD4
Linfócito T CD8+	CD3 e CD8
Monócito	CD14
Linfócito B	CD20 ou CD19
Plaqueta	CD61 ou CD41
Células endoteliais	CD62 e/ou CD144
Granulócitos	CD66b
Eritrócitos	CD235a
Neutrófilos	CD15

3.9 Nanopartículas

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

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

Os neutrófilos participam da primeira linha de defesa contra os patógenos intra e extracelulares, migrando imediatamente para os sítios de inflamação à infecção ou até mesmo a exposição de partículas. Quando ativados, fagocitam e liberam reativos de oxigênio para a destruição dos patógenos, além disso, liberam citocinas e quimiocinas

que são primordiais para a resposta imune adaptativa. Os neutrófilos foram caracterizados como células efetoras homogêneas e diferenciadas terminais, no entanto recentemente, alguns estudos apontam para a sua heterogeneidade e diversidade fenotípica, que podem reconhecer as subpopulações por marcadores de superfícies específicos.

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

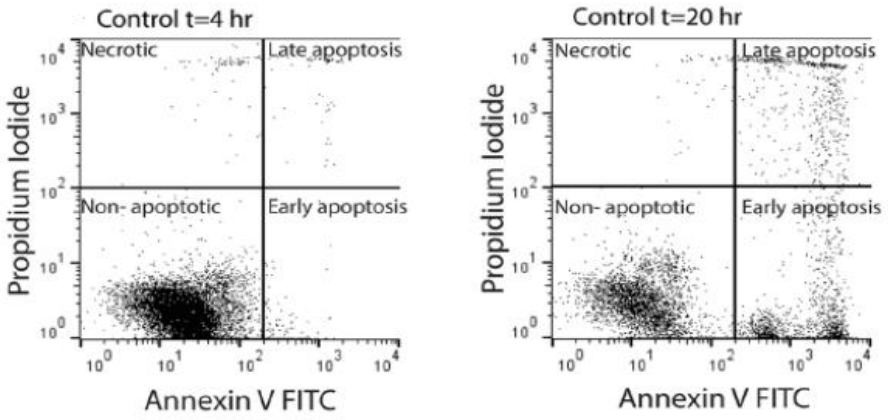


Figura 3.15 - Gráficos de *dot plots* que representam os neutrófilos marcados com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio-PI em cultura por 4 horas e 20 horas. Observa-se que neutrófilos em cultura por 20 horas, estimulam mais a apoptose inicial do que a apoptose tardia, enquanto a cultura de 4 horas, não foi possível observar esse fenômeno. Fonte: Fraser et al., 2018.

As subpopulações de neutrófilos foram analisadas por citometria de fluxo, identificando a diversidade dos fenótipos em: neutrófilos maduros (CD16bright/CD62Lbright), imaturos (CD16dim/CD62Lbright) e apoptóticos (CD16dim/CD62Ldim). Quanto a exposição por AgNP, foi demonstrado que essa nanopartícula pode estar associada ao estímulo da ativação e maturação dos neutrófilos. Por outro lado, o mesmo estudo relata que o AgNP realiza a ativação de neutrófilos sem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e necrose. Este estudo ainda sugere que, as partículas podem ser eliminadas sem causar inflamação prejudicial, já que nanopartículas de prata podem conferir toxicidade aos neutrófilos e assim desencadear reações inflamatórias.

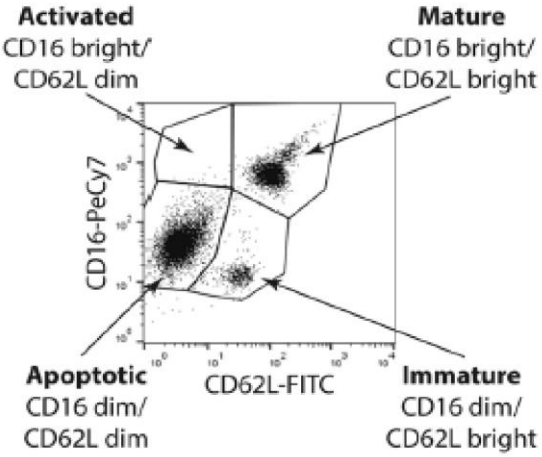


Figura 3.16 - Representação das subpopulações de neutrófilos marcados com anticorpos CD16-PeCy7 e CD62L-FITC em gráficos *dot plots*. As marcações identificadas como: CD16 bright/CD62L dim, são neutrófilos ativados; CD16 bright/CD62L bright, são neutrófilos maturos; CD16 dim/CD62L bright, são neutrófilos imaturos; CD16 dim/CD62L dim, são neutrófilos apoptóticos. Fonte: Fraser et al., 2018.

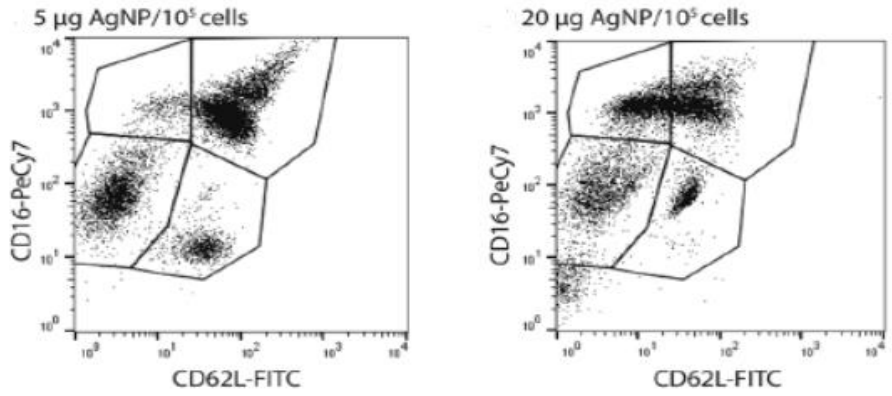


Figura 3.17 - Gráficos de *dot-plots* que representam neutrófilos expostos a nanopartículas de prata - AgNP em diferentes concentrações 5ug AgNP/105 células e 20ug AgNP/105 células, nos quais observam-se as diferentes subpopulações de neutrófilos. Fonte: Fraser et al., 2018.

3.10 Análise de microorganismos

Protozoários, fungos, bactérias e até vírus podem ser detectados e avaliados através da citometria de fluxo. O avanço na descoberta de biomarcadores para os mais variados microorganismos tornam a citometria de fluxo cada vez mais a técnica de escolha para esta análise, visto que é capaz de detectar, caracterizar e até separar populações específicas a partir de uma amostra heterogênea. Além disto, nas culturas purificadas, é necessário a avaliação do crescimento do microorganismo, a proliferação, a viabilidade, seu metabolismo e sua interação com vários agentes químicos e físicos

para diversos tipos de estudo, análises possíveis através da citometria. A citometria de fluxo tem sido utilizada nos estudos microbiológicos em diversas áreas, como na monitorização do processo de fermentação por bactérias, na microbiologia industrial, em diagnósticos clínicos e na toxicologia ambiental.

3.11 Interação parasito-célula hospedeira

Através da citometria de fluxo é possível avaliar a interação de parasitos com suas células hospedeiras, seja através de marcações fenotípicas específicas, da utilização de parasitas geneticamente modificados autofluorescentes, da realização de ensaios funcionais ou simplesmente através da observação da diferença de granularidade (Figura 3.15).

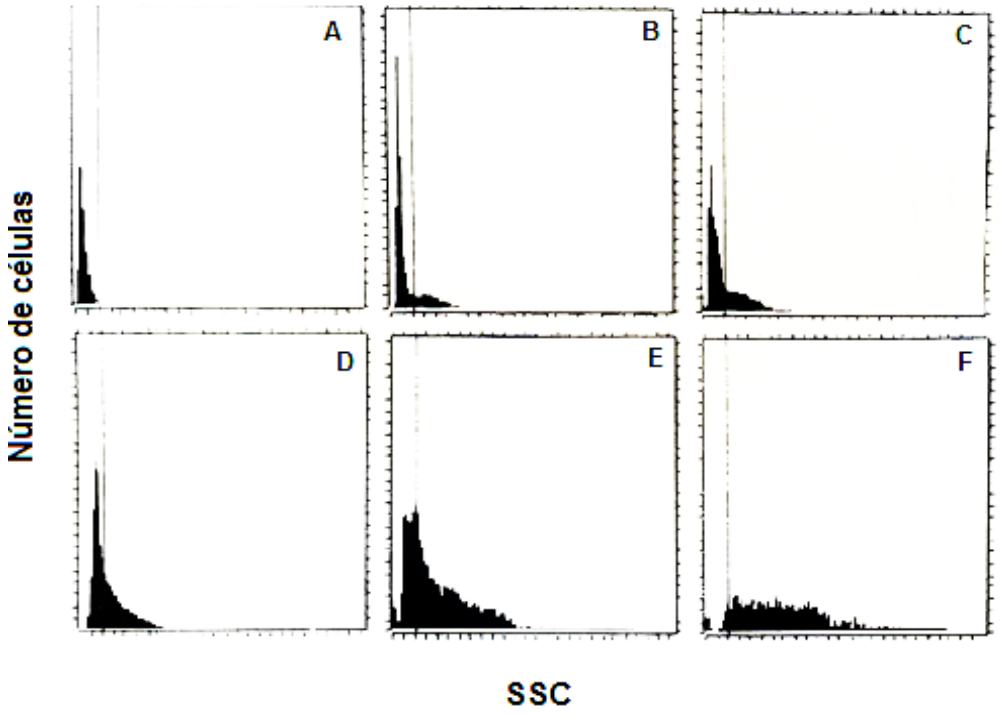


Figura 3.18 - *Dot plots* de número de células *vs.* granularidade (SSC) de uma cultura de macrófagos com *Leishmania* em diferentes momentos (A - tempo zero de cultura). É possível observar o aumento da granularidade ao longo do tempo de cultura, o que representa a invasão das *Leishmanias* nos macrófagos. Fonte: Bertho et al, 1992.

3.12 Microbiologia marinha

Bactérias, cianobactérias, fitoplânctons e zooplânctons estão presentes em altas concentrações nos ambientes marinhos e o estudo de suas funções e comportamento são fundamentais para a compreensão destes ecossistemas. A citometria de fluxo tem sido aplicada no estudo destes microorganismos principalmente através da avaliação de tamanho e granularidade, autofluorescência e análise de DNA e RNA (Figura 3.16), e vem se tornando a técnica padrão para o monitoramento de populações de fito e zooplânctons. A partir destes estudos, novos citômetros são fabricados especialmente para tal aplicação, já que a caracterização e quantificação dos microorganismos presentes nos mananciais aquáticos, como oceanos, lagoas e rios, fornecem um monitoramento acurado da qualidade da água destes ambientes.

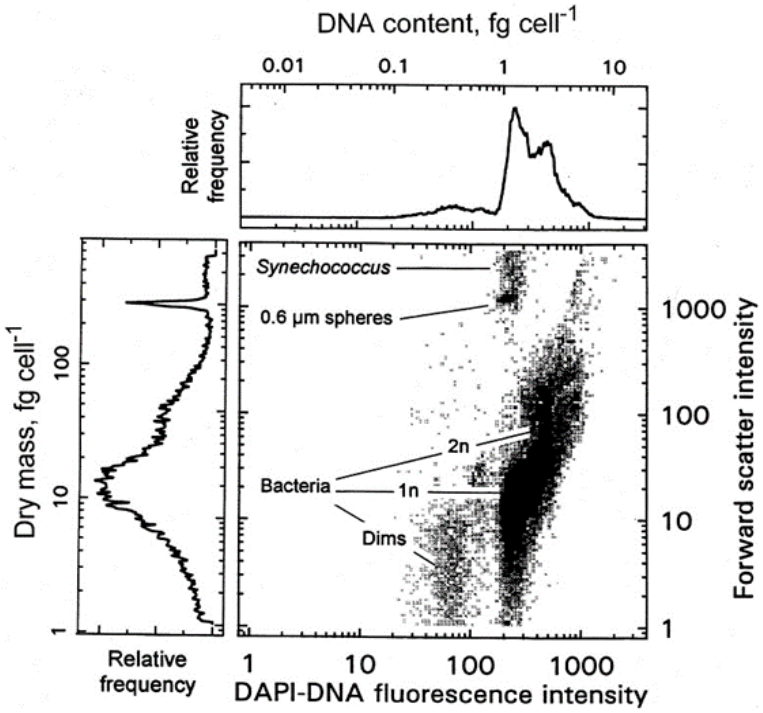


Figura 3.19 - *Dot plot* de bactérias marinhas em uma amostra de água coletada no Golfo do Alaska. A análise de células com baixa intensidade de incorporação do DAPI (*dims*), um agregado na posição semelhante de *Synechococcus*, e células 1n e 2n são indicadas. Avaliação do tamanho (FSC) e conteúdo de DNA (através da marcação com DAPI) de bactérias. Fonte: Button & Robertson, 2011.

3.13 Vacinas

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

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

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

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

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

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

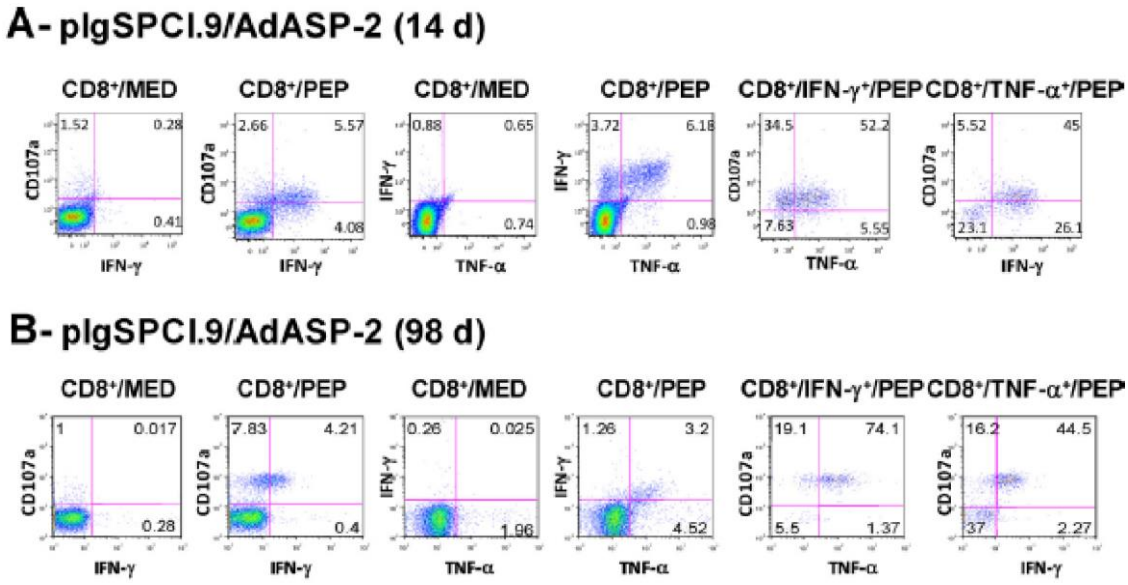


Figura 3.20 - Gráficos de *dot plots* que representam as intensidades de fluorescências das células que foram marcadas com anticorpos anti-CD8, anti-IFN-γ, anti-TNF-α e CD107a. Observa-se a expressão CD107a e citocinas intracelulares por T $CD8^+$ específico que foram induzidas por DNA plasmidial recombinante, iniciando o esquema de vacinação HuAd5 14 (A) ou 98 (B) dias após a última dose da imunização. Fonte: Rigato et al., 2011.

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

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

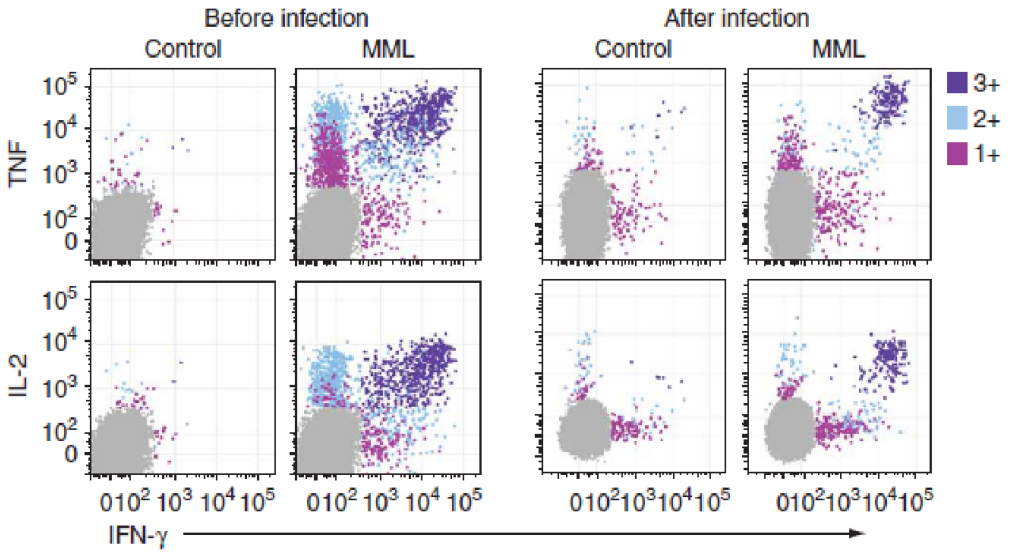


Figura 3.21 - Gráficos de *dot plots* que representam a intensidade de fluorescência que identificam as células multifuncionais (3+), células duplas positivas (2+) e células simples positivas (1+) em camundongos vacinados antes e após a infecção. Fonte: Darrah et al., 2007.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Graff RJ, Buchanan PM, Dzebisashvili N, Schnitzler MA, Tuttle-Newhall J, Xiao H, Schadde E, Gheorghian A, Lentine KL. The Clinical Importance of Flow Cytometry

Crossmatch in the Context of CDC Crossmatch Results. Transplantation Proceedings. 2010;42:3471-3474.

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

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

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

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

Sack U, Tárnok A, Rothe G. Cellular Diagnostics. Basic Principles, Methods and Clinical Applications of Flow Cytometry. 2009; 738p [Acesso em maio de 2017] Disponível em: https://www.karger.com/Book/Home/235791.

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

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

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

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

http://www.bdbiosciences.com Acesso: Maio, 2018

http://www.biolegend.com/ Acesso: Maio, 2017

http://www.gopubmed.com Acesso: Maio, 2018

http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/C34557 Acesso: maio, 2018

CAPÍTULO 4. CITOMETRIA DE FLUXO APLICADA NO ESTUDO DAS DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

Alinne Renzetti, Clarissa Cunha, Jéssica Lima, Stephanie Cruz, Thaize Chometon

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

4.1 Infecção pelo HIV

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

Seguindo a transmissão do vírus, ocorre um período de aproximadamente 10 dias no qual o RNA viral não é detectado no plasma. Ao final dessa etapa, o vírus alcança o linfonodo de drenagem, onde encontra células T $CD4^+CCR5^+$, que são alvos para infecção adicional. A molécula de CD4 e o receptor de quimiocina CCR5 (CD195) funcionam como receptor e co-receptor, respectivamente, para a entrada do vírus na célula. Alguns vírus utilizam a molécula CXCR4 (CD184) como co-receptor e são denominados X4 trópicos outros são capazes de se ligar a ambos os co-receptores e são conhecidos como R5X4 trópicos. No gânglio linfático, o vírus replica-se rapidamente e atinge outros tecidos linfóides, particularmente, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT), onde células de memória T $CD4^+CCR5^+$ estão presentes em grande número e são alvos predominantes da depleção inicial de células T $CD4^+$. Quase todas as células T $CD4^+CCR5^+$ são depletadas no GALT. Enquanto o HIV está replicando neste sítio e em outros tecidos linfóides, a viremia plasmática aumenta exponencialmente, podendo atingir um pico de mais de 20 milhões de cópias de RNA por mililitro de plasma, por volta do 14°-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 4.1). Logo após a viremia declina drasticamente, estabilizando-se a um determinado valor conhecido como *set point* viral, caracterizando o início da fase crônica, a qual pode durar de 8 a 10 anos e é marcada por um período de latência clínica e uma queda progressiva na contagem de células T $CD4^+$. Após vários anos de infecção, ocorre um aumento da carga viral acompanhado por uma queda acentuada na contagem de linfócitos T $CD4^+$, atingindo valores inferiores a 200 células/μL e pelo aparecimento de sintomas clínicos e infecções oportunistas, assinalando a fase sintomática, ou AIDS propriamente dita. Este perfil de evolução da doença é observado para a grande maioria dos indivíduos, embora cerca de 10-15% dos indivíduos infectados entrem na fase de AIDS após 2 a 3 anos de infecção, sendo denominados progressores rápidos. Por outro lado, existe um grupo de indivíduos (5%-15%), chamado de Não Progressores de Longo Termo (do inglês LTNP – *long term non-progressors*), que não evoluem para a AIDS mesmo após 10 a 15 anos de infecção.

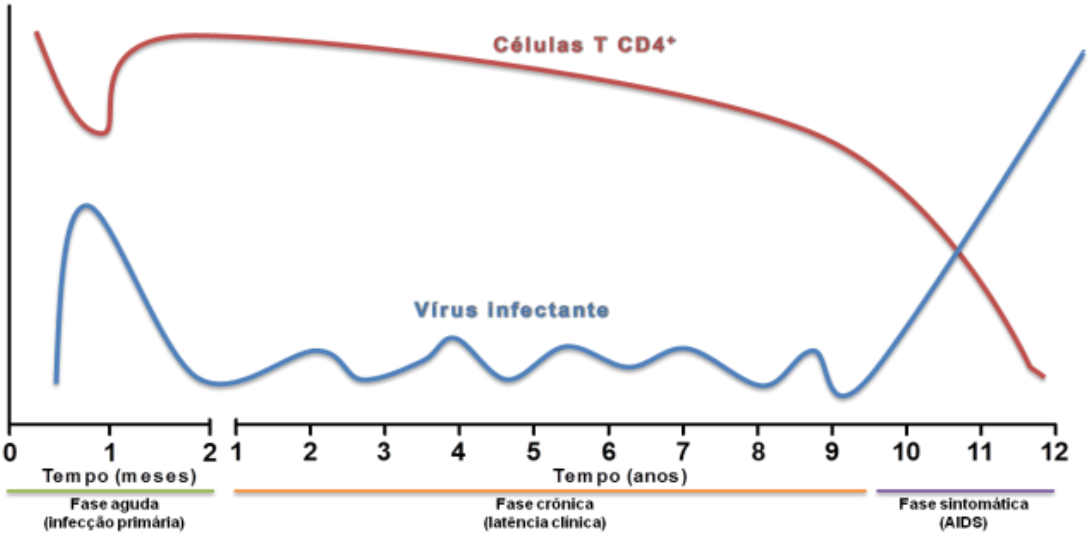


Figura 4.1 - Curso natural da infecção pelo HIV.

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

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

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

níveis de inflamação e ativação da resposta imune, como os encontrados na infecção por Tuberculose, podem proporcionar as condições ideais de citocinas para a replicação do HIV.

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

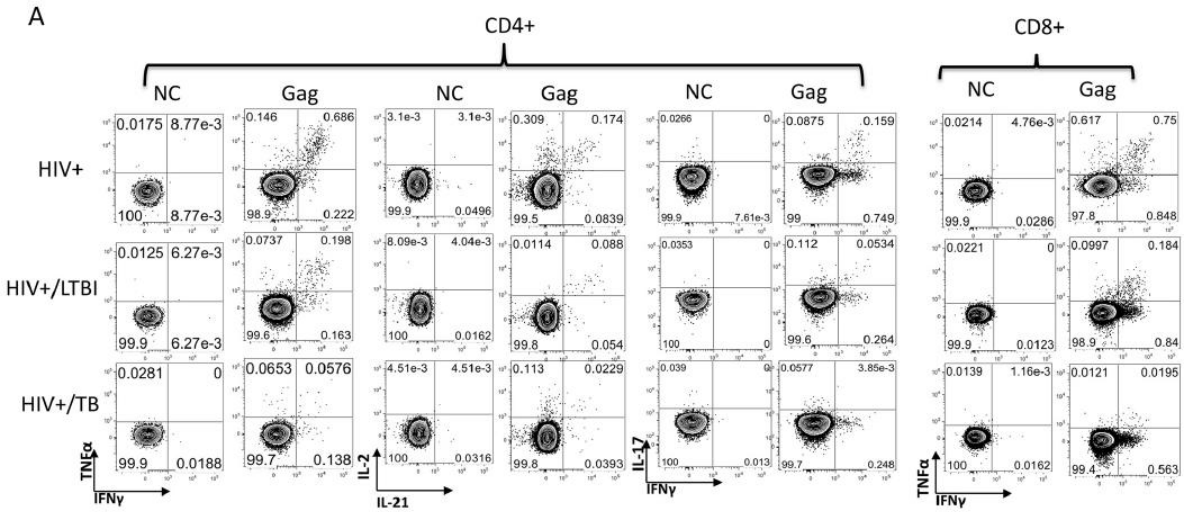


Figura 4.2 - Estratégia de *gate* para a avaliação da polifuncionalidade de células T CD4$^+$ T CD8$^+$ após estímulo com peptídeos de Gag/HIV. *Dot plots* de densidade tipo *contour* representativos de um indivíduo de cada grupo. NC – sem estímulo, LTBI – Tuberculose latente, TB – Tuberculose ativa.

O primeiro passo foi investigar a funcionalidade das células T HIV-específicas em indivíduos com co-infecção, após estímulo com pool de peptídeos de Gag (proteína do HIV). Eles observaram maior população de células T HIV-específicas nos indivíduos monoinfectados (somente infectados com HIV), o que indica que esses indivíduos possuem melhor resposta imune celular que os co-infectados (Figura 4.2). E a co-

infecção de HIV e MTB foi associada com o decréscimo de secreção das citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-2 (Figura 4.3).

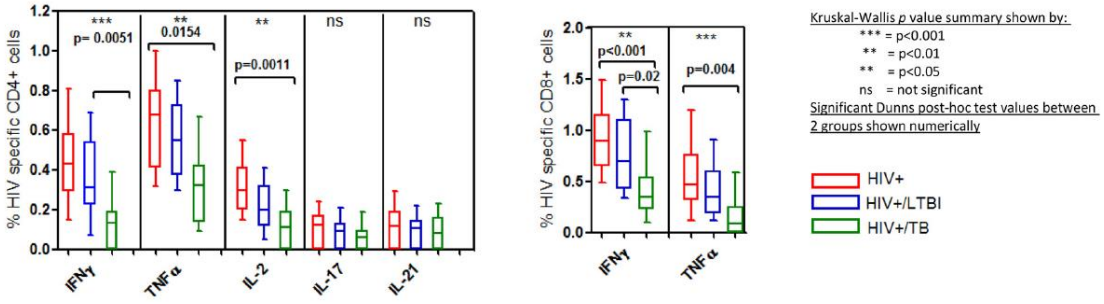


Figura 4.3 - Investigação da secreção de citocinas após estímulo com peptídeos de Gag/HIV. Porcentagem de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ HIV-específicas secretoras de citocinas em indivíduos monoinfectados (HIV^+), co-infectados com Tuberculose ativa (HIV^+/TB) e com Tuberculose latente (HIV^+/LTBI).

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

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

A citometria de fluxo também pode ser aplicada na investigação da resposta imune de possíveis candidatos e regimes vacinais. Freel e cols. (2010) estudaram o perfil fenotípico e funcional de células T $CD8^+$ inibitórias do HIV geradas pela infecção natural e vacinação heteróloga de *prime/boost.* Os autores utilizaram um marcador de viabilidade chamado ViViD (*violet viability dye*), e o anti-CD14 (fluorocromo não citado) e CD19-Pacific Blue para identificar células B e monócitos, e excluí-los da análise. Para a maturação de células T, foram utilizados os marcadores CD45RO QD705, CD57

QD585, CCR7 Alexa 680 e CD28 PE-Cy5. E os marcadores de superfície para a identificação de células T; o anti-CD8 QD800, CD4 PE-Cy5.5 e o CD3 APC-Cy7. A células T funcionais foram identificadas através da sua marcação com IFN-γ FITC, IL-2 APC, TNF-α PE-Cy7, MIP-1 PE e CD107a Alexa 680.

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

Os resultados da imunofenotipagem foram relacionados com o ensaio de inibição viral por células T $CD8^+$ (*VIA assay*). Os indivíduos vacinados e que possuíam atividade antiviral apresentaram um número maior de células em estágios iniciais de diferenciação, e indivíduos HIV^+ apresentaram maior número de células em estágios finais de diferenciação. Entretanto, não houve associação significativa entre fenótipo de diferenciação e atividade antiviral antígeno-específica de células T $CD8^+$. Esses dados sugerem que células T $CD8^+$ em diferentes estágios de diferenciação, foram capazes de mediar a supressão viral, contanto que expressassem MIP-1β ou CD107a (Figura 4.4).

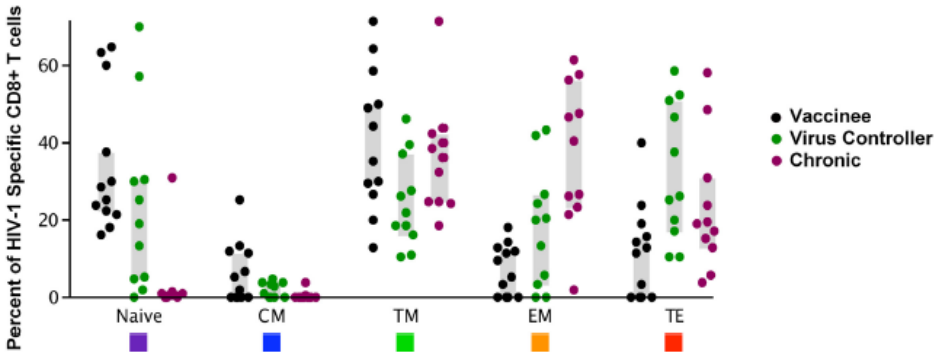


Figura 4.4 - Estado de diferenciação de células T $CD8^+$ de indivíduos com atividade antiviral. Células T $CD8^+$ de 15 indivíduos controladores de vírus, 15 com infecção crônica de HIV e 20 vacinados com atividade antiviral mediada por células T $CD8^+$ foram analisados para a expressão de marcadores de diferenciação CD45RO, CCR7 e CD28. CM – memória central, TM – memória transicional, EM – memória inicial (*naive-like*), TE – efetora terminal.

Na avaliação da função múltipla de células T CD8⁺ efetoras, de uma forma geral, a resposta foi maior nas células estimuladas com Env e Gag; com a resposta para Env correspondendo 60% da resposta total ao HIV (Figura 4.5). As respostas de CD107a, MIP-1β e IFN-γ se correlacionaram com a atividade antiviral. Não foi encontrada diferença significativa na porcentagem de células expressando IL-2 ou TNF-α nos indivíduos vacinados com atividade inibitória em relação aos vacinados sem atividade inibitória. Entretanto, a atividade antiviral foi fortemente associada com o maior número de células T CD8⁺ expressando CD107a ou MIP-1β, depois do estímulo com Gag ou Env.

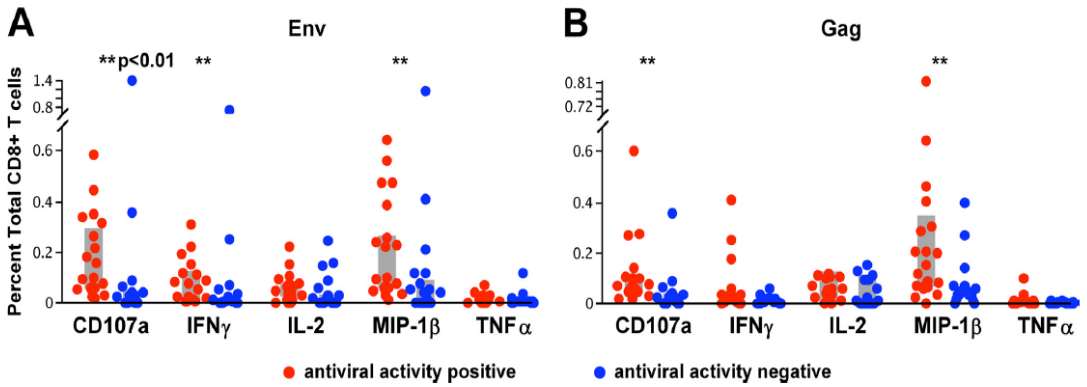


Figura 4.5 - Células T CD8⁺ Env e Gag-específicas nos vacinados se correlacionam com a inibição do HIV-1 *in vitro*. Expressão de citocinas e marcadores de degranulação foram mensurados por citometria de fluxo em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 40 vacinados. Resposta total de células T CD8⁺ para cada função é demonstrada após o estímulo com peptídeos de Env (A) e Gag (B). Os asteriscos mostram as funções que apresentaram diferenças significativas entre vacinados com atividade antiviral e sem atividade antiviral.

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

4.2 Infecção pela *Mycobacterium tuberculosis* e *bovis*

A Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa milenar que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Ela é reportada pela Organização Mundial de Saúde, em seu último relatório (2017), como a nona principal causa de morte no mundo e a principal causa de morto por um único agente infeccioso. Apesar de possuir tratamento ela continua a ser um dos patógenos mais difíceis de

controlar devido a sua fácil transmissão por via aera, dificuldades no seu longo tratamento e casos de multirresistência aos antibióticos.

A transmissão da TB ocorre quando um indivíduo suscetível inala partículas infecciosas provenientes de um paciente bacilífero, ou seja, que está eliminando ativamente, através da saliva e/ou secreções respiratórias, o bacilo da tuberculose. O curso natural da infecção segue com a migração do bacilo para o sistema respiratório, devida às dependências, do mesmo, de concentrações adequadas de oxigênio.

No pulmão, o *M. tuberculosis* infecta primeiramente macrófagos residentes do pulmão, multiplicando-se no interior dessas células. Se o sistema imune do hospedeiro não for capaz de recrutar uma resposta imune celular de contenção, o bacilo irá multiplicar-se ativamente em outras células do sistema fagocítico mononuclear, podendo alcançar a circulação e disseminando-se para outros sistemas, causando as chamadas formas extra-pulmonares da tuberculose. Estima-se que 1/3 da população mundial já tenha entrado em contato com o *M. tuberculosis*, mas aproximadamente 90% nunca irá desenvolver a forma ativa da doença, devido aos eficazes mecanismos de controle do sistema imune.

Estudos mostram que a capacidade do indivíduo de conter a infecção está baseada primeiramente na efetiva ativação do sistema imune inato e a consequente indução da imunidade adquirida. Sabe-se que uma resposta coordenada de células do sistema imune inato e adaptativo desempenha um papel vital no controle da infecção causada pelo *M. tuberculosis*.

Já é sabido que os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) das células da imunidade inata, principalmente macrófagos e células dendríticas, desempenham um papel importante no reconhecimento do *M. tuberculosis*, resultando na ativação da resposta contra o patógeno. A correta ativação desses PRRs induz vários processos celulares críticos de defesa do hospedeiro, incluindo inflamação, apresentação de antígenos, apoptose, autofagia, maturação de fagossomas e produção de citocinas pró-inflamatórias que são críticas para uma resposta imune efetiva contra o *M. tuberculosis*.

A ativação do sistema imune inato leva ao recrutamento das células T, principalmente aquelas da polaridade T_H1 com a participação de TNF-α e IFN-γ. O equilíbrio da resposta do tipo T_H1/T_H2, que tem sido sugerido como crítico na contenção do avanço da infecção. Estudos em citometria de fluxo têm mostrado que é possível rastrear o perfil de ativação das células T e correlaciona-los com a fase da doença. Neste contexto, é possível mostrar que indivíduos sadios não apresentam o mesmo o

perfil de ativação dos doentes em fase ativa, assim como aqueles controles, onde a população T_H1 ativada mostra-se como um marcador importante nesta fase da doença.

A vacina BCG é um dos principais métodos de prevenção da tuberculose, sendo a mesma uma vacina quase secular e a mais utilizada no mundo. A mesma emprega cepas de *Mycobacterium bovis*, contendo o patógeno vivo e atenuado. Quanto a proteção fornecida pela vacinação, esta é considerada limitada, conferindo proteção contra casos graves e disseminados de TB na infância. Contudo, a TB pulmonar principalmente em adultos, ainda um problema de saúde pública, apesar da extensa cobertura vacinal. Na literatura, discute-se que a melhoria na vacinação contra a TB depende, por um lado, de uma compreensão da natureza da sua imunidade protetora, por outro, de um melhor controle de qualidade da vacina, visando principalmente a sua eficácia/potência. A complexa interação de células da imunidade inata com as da adaptativa, que leva a imunidade protetora após a vacinação, ainda não são completamente compreendidos. No entanto, esta informação pode ser crucial para o desenvolvimento de novas vacinas ou melhorar a vacina atual com relação à eficiência.

A utilização da citometria de fluxo vem sendo proposta em diversos estudos. Um exemplo é o estudo de Yang e colaboradores (2015), o qual propõe a utilização da citometria de fluxo como uma metodologia para discriminar as formas ativa da Latente da tuberculose por meio da expressão de CD161 em células $CD3^+$ (estratégia de *gates* utilizada demostrada na Figura 4.6). Como resultado, o trabalho mostra que pacientes com a forma ativa possuem baixa ou nenhuma expressão de CD161 em seus linfócitos, sendo possível utilizar essa molécula como um biomarcador.

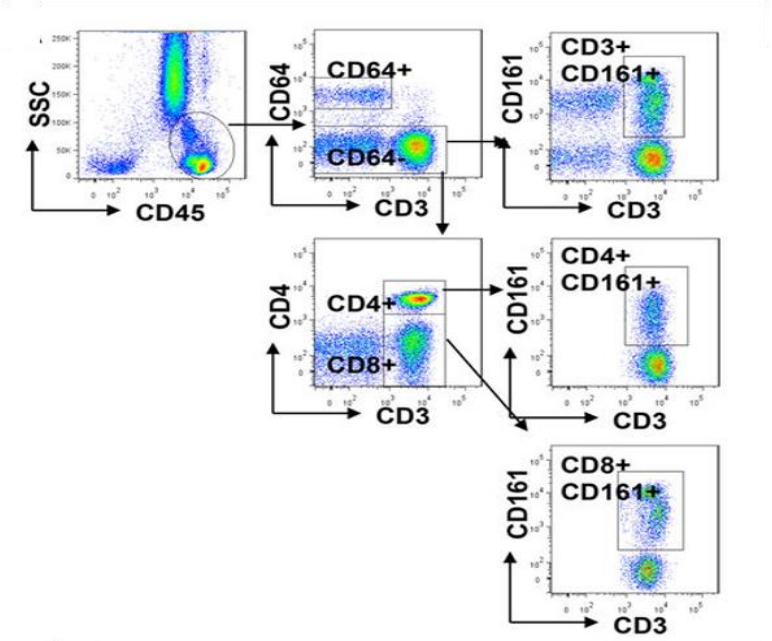


Figura 4.6 - Estratégia de *gates* para enumerar populações $CD161^+$ para a comparação das formas da tuberculose ativa e latente ou controle saudável. Os linfócitos ($CD45^+$ $CD64^-$) e os monócitos ($CD45^+$ $CD64^+$) foram selecionados pelo marcador CD45 no primeiro gráfico de CD45 *vs*. SSC e depois separados pela presença e ausência de CD64. Os diferentes subconjuntos de linfócitos foram selecionados através de diferentes combinações de marcadores CD3, CD4 e CD8. Sendo as células $CD4^+$ e $CD8^+$ selecionadas a partir das células $CD3^+$ e as células $CD161^+$ selecionadas a partir das populações $CD4^+$, $CD8^+$ ou $CD3^+$ Fonte: Yang et al., 2015.

Outro trabalho, Smith e colaboradores (2015), propõe utilizar a citometria de fluxo como uma ferramenta para ensaios clínicos de novas vacinas contra tuberculose avaliando a resposta de células T por meio da a produção de citocinas (Figura 4.7). Esse trabalho descreve e compara vários protocolos comumente usados e fazer algumas recomendações para possível padronização futura e melhor avalição da liberação de citocinas.

Além disso, a citometria de fluxo também vem sendo aplicada, no intuito de propor um possível ensaio para o controle de qualidade na produção da vacina BCG, avaliando a reprodutibilidade da vacina dentro de um mesmo lote, por meio da capacidade de maturação de células dendríticas. A maturação foi avaliada pela expressão de moléculas co-estimulatórias (CD86, CD80 e CD40) e HLA-DR na presença de diferentes ampolas de um mesmo lote. Como resultado observou-se que dentro de um mesmo lote da não há variação significativa na expressão desses marcadores (Figura 4.8).

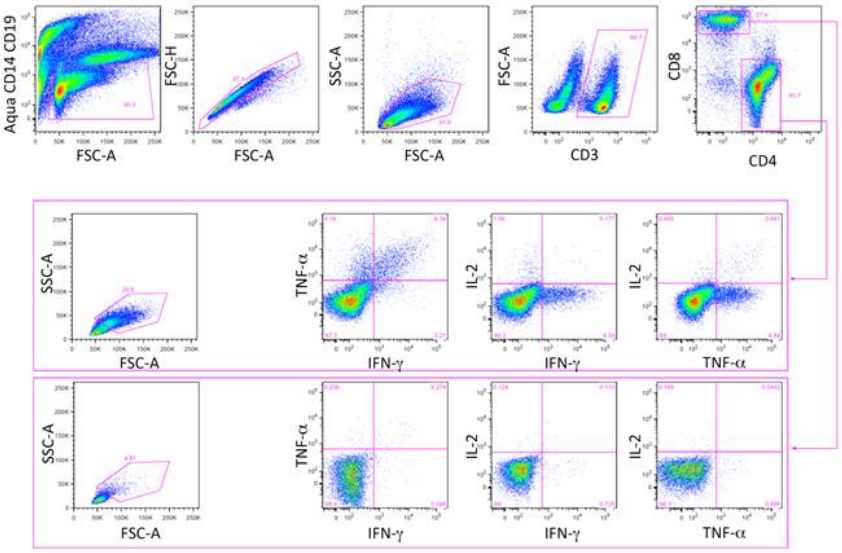


Figura 4.7 - Estratégia de *gates* para avaliação da produção de citocinas, mais especificamente IFN-γ, TNF-α e IL-2, pelos linfócitos. Primeiramente aplicou-se um *gate* para excluir células mortas, células $CD14^+$ ou $CD19^+$. A partir desse *gate* foi feita a identificação dos *singlets* utilizando o *dot plot* FSC-A *vs* FSC-H linfócitos e subsequentemente a seleção de células $CD3^+$ e células $CD3^+CD4^+$ ou $CD3^+CD8^+$. As análises detalhadas para células $CD3^+CD4^+$ ou $CD3^+CD8^+$ estão representadas nos painéis intermediário e inferior, respectivamente. A frequência dos linfoblastos é definida a partir do *gate* baseado em FSC-SSC (gráficos a esquerda). A avaliação da produção de citocinas, mais especificamente IFNγ, TNFα e IL-2 após estimulo como PPD, é mostrada nos painéis a direita. Fonte: Smith et al., 2015.

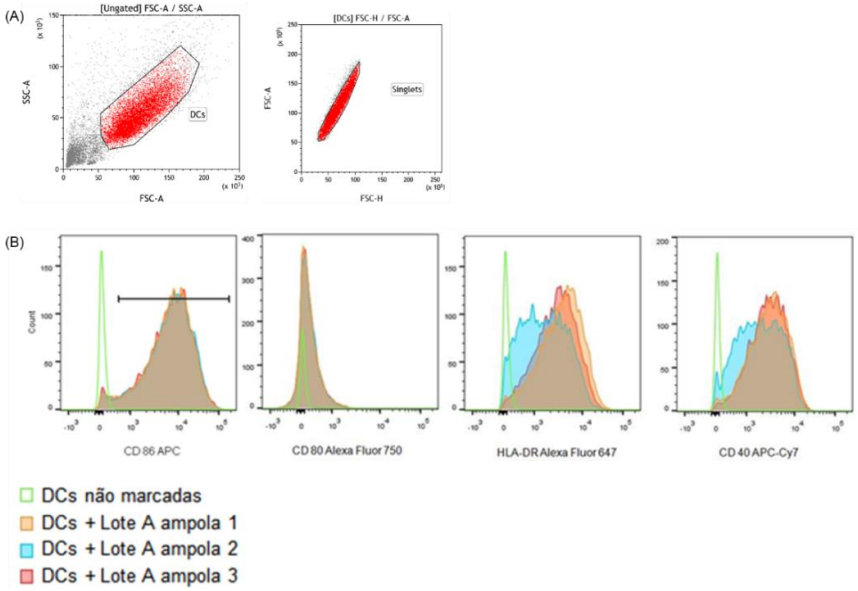


Figura 4.8 - Células dendríticas derivadas de monócitos infectadas com 3 ampolas distintas do lote A por 24 horas. Figura representativa de 1 doador de um total de 8. (A) *Dot plot* de tamanho (FSC-A) *vs* granulosidade (SSC-A) onde selecionou-se a região de células dendríticas (DCs). A partir da região de DCs foi feita a exclusão de *doublets* utilizando o *dot plot* FSC-H *vs* FSC-A, representado pela região de *singlets* (B) Overlay dos histogramas de CD86, CD80, HLA-DR e CD40, respectivamente, cada cor indicando uma ampola diferente e a linha verde indicando moDCs não marcadas. Fonte: Chometon, 2016.

4.3 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada uma doença infecto-parasitária, de caráter zoonótico, sendo causada pelo protozoário do gênero *Leishmania spp*, e transmitidas pelo inseto vetor, o flebotomíneo. O protozoário *Leishmania spp.* apresenta o ciclo heteroxeno, com a presença de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. A transmissão para o homem envolve complexos ciclos silvestres, secundários ou peridomésticos, já que algumas espécies desse gênero são mais facilmente adaptadas ao ambiente modificado pelo homem e/ou são capazes de infectar uma larga variedade de mamíferos, dentre estes animais domésticos que agem como reservatórios da doença.

Sabe-se que a *Leishmania spp*., assim como outros patógenos intracelulares, ativa o direcionamento da resposta imune do hospedeiro à uma polaridade do tipo T_H1, com ativação das células efetoras, como macrófagos, que são ativados por citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ e TNF-α), levando a produção de intermediários reativos de oxigênio (IROs) e intermediários reativos de nitrogênio (IRNs), para a destruição do parasito. Os macrófagos, assim como as células dendríticas, são células que fazem parte do sistema fagocítico, onde o parasita consegue se multiplicar ativamente no pH ácido do interior do fagolissosomo. Estudos já demonstraram que a espécie do parasito interfere diretamente nos mecanismos imunológicos do hospedeiro, evidenciando diferenças principalmente no perfil de citocinas liberadas pelas células infectadas.

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

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

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

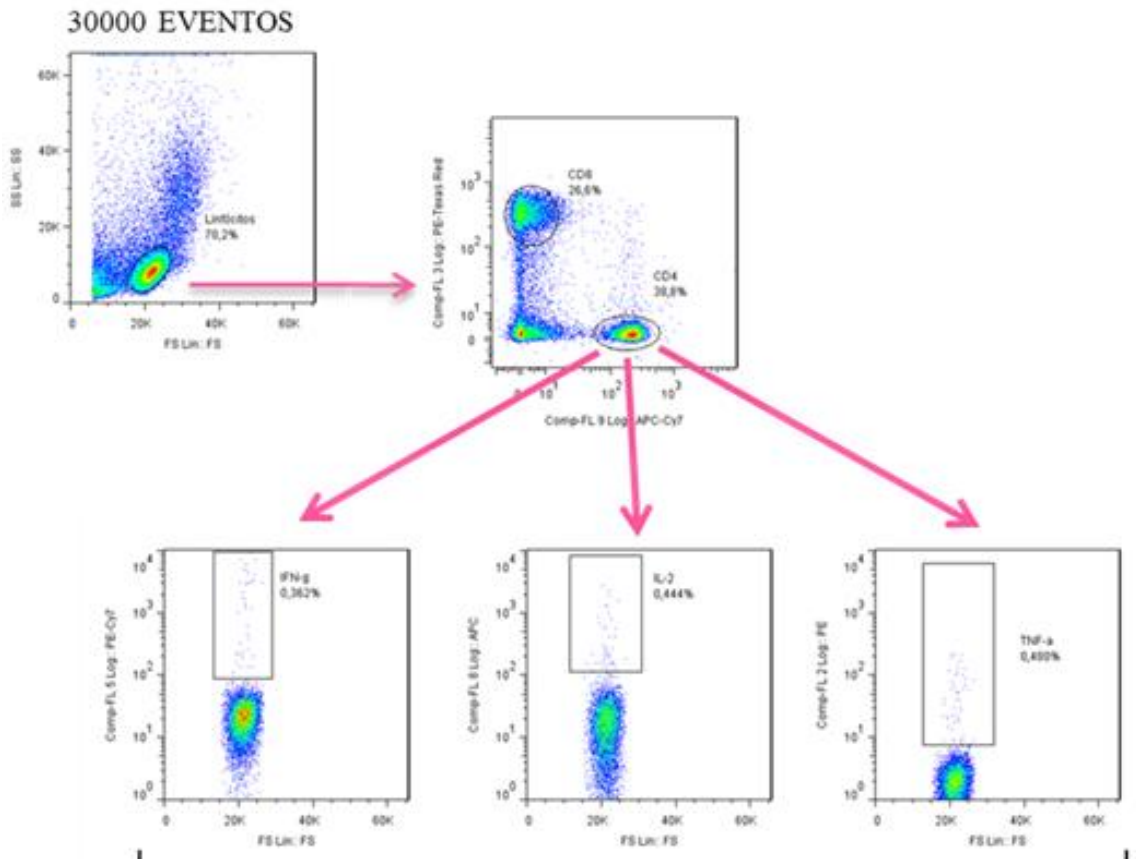


Figura 4.9 - Protocolo de estratégia de *gates* de população de linfócitos T $CD4^+$ e de células produtoras de citocinas IFN-γ, IL-2, TNF-α. Fonte: Esquematizado e cedido por Macedo, Renzetti & De Luca, 2014.

Em células de pacientes com leishmaniose cutânea, que foram estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, foi encontrado diferenças significativas

do perfil de linfócitos T $CD4^+$ e sua produção de citocinas (Figura 4.5). Com relação a qualidade da resposta de T_H1, observou-se maiores porcentagens de células T $CD4^+$ multifuncionais (IFN-γ^+IL-2^+TNF-α^+ simultaneamente) e células duplas positivas (IFN-γ^+ e IL-2^+) em células de pacientes com leishmaniose cutânea estimulados com o antígeno de *L. braziliensis* quando comparados com o antígeno de *L. amazonensis*, que induziu maiores porcentagens de células simples produtoras de IFN-γ (Figura 4.6). Isso indica que esse tipo celular pode estar relacionado com formas de manifestações clínicas de pacientes com Leishmanioses.

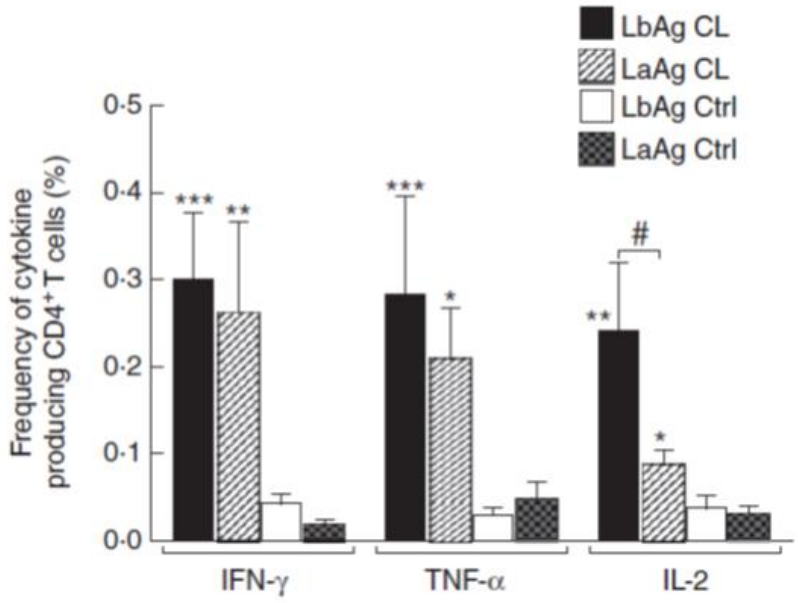


Figura 4.5 - Frequência de produção de citocinas (IFN-γ, TNF-α e IL-2) por células T $CD4^+$ após a estimulação com antígenos de *L. braziliensis* (LbAg) e *L. amazonensis* (LaAg) de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea (CL) e controles sadios (Ctrl). Fonte: Macedo et al., 2012.

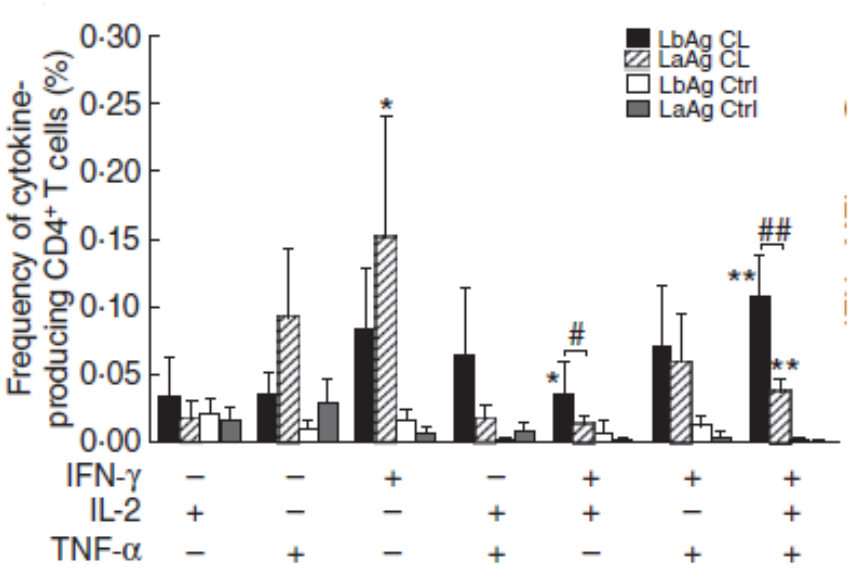


Figura 4.10 - Diferença na qualidade da resposta de células T CD4$^+$ do tipo 1 (T_H1**)** após a estimulação com antígenos de *L. braziliensis* (LbAg) e *L. amazonensis* (LaAg) de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea (CL) e controles sadios (Ctrl). Foi utilizado a citometria de fluxo multiparamétrica para identificar a frequência de células apresentando cada uma das sete combinações de IFN-γ, TNF-α e IL-2. Fonte: Macedo et al., 2012.

Os linfócitos T CD8$^+$ participam ativamente na resposta imune na leishmaniose, com função de citotoxicidade e produção de citocinas, principalmente pro-inflamatórias, sendo associados à cura da doença, principalmente em estudos de infecção por *L. braziliensis*. Neste contexto, tem sido demonstrado um menor percentual de linfócitos T CD8$^+$ durante a fase ativa da infecção e este se restabelece durante o processo de cura. Ainda, Bertho e cols. (2000) observaram um maior percentual de linfócitos T CD8$^+$ apoptóticos em lesões de pacientes na fase ativa da doença quando comparados a pacientes que curaram espontaneamente. Ferraz e cols. (2015) demonstraram, através da citometria de fluxo (Figura 4.11), que pacientes sob a terapia apresentam maiores percentuais de apoptose dos linfócitos T CD8$^+$ totais e efetores, o que foi também observado após cultura de estimulação com antígeno de *L. braziliensis*. Também mostraram que quanto maior o tamanho da lesão, menor a frequência de linfócitos T CD8$^+$ efetoras nos pacientes com doença ativa e sob tratamento; bem como uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8$^+$ efetoras em apoptose e o tamanho da lesão nos pacientes durante o tratamento (Figura 4.12). Deste modo, as alterações nas frequências dos linfócitos T CD8$^+$ efetoras, durante e após o tratamento,

representam um estágio crítico na geração de uma resposta imune eficiente e estão envolvidas no desencadeamento ou na resolução da lesão sob a influência da terapia.

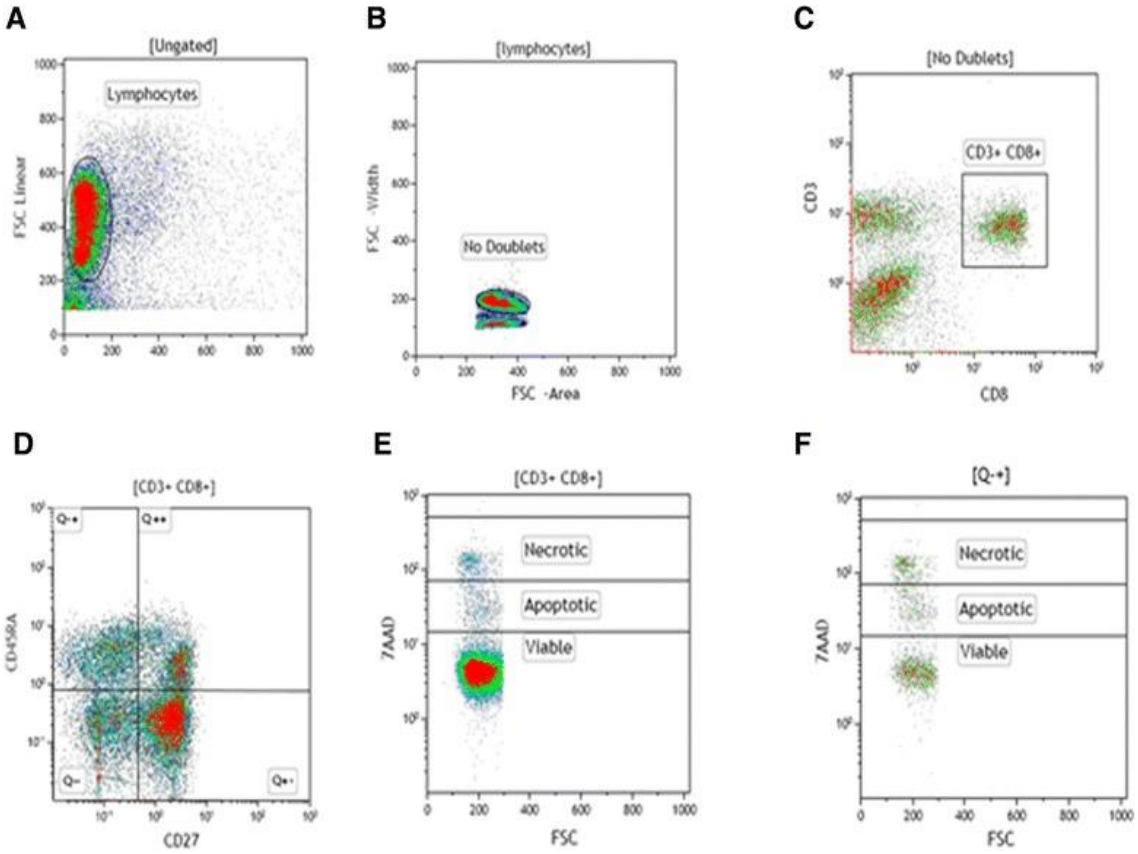


Figura 4.11 - Protocolo de citometria de fluxo para determinar as frequências de subpopulações de linfócitos T $CD8^+$ e apoptose. Células do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea foram marcadas *ex vivo* e após serem cultivadas na presença de antígenos de *Leishmania*, com CD3-FITC, CD8-APC, CD45RA-ECD, CD27-PE-Cy7 e 7-AAD. (A). Os linfócitos foram definidos através do *gate* no *dot plot* de tamanho (FSC) *vs* granularidade (SSC); (B) *Doublets* foram excluídas da análise através de um *density plot* de FSC Area *vs* FSC Width. (D) *Dot plot* de CD27 *vs* CD45RA foi criado baseado no *gate* $CD3^+CD8^+$ (C) e usado para definir as frequências de linfócitos T $CD8^+$ efetores e naïve. A frequência de células apoptóticas ($7AAD^{low}$) nos linfócitos T $CD8^+$ totais e nos linfócitos T $CD8^+$ efetores foram determinadas pelos *dot plots* FSC *vs* 7AAD (E) e (F), baseado nos *gates* $CD3^+CD8^+$ (C) e $CD45RA^+CD27^{neg}$ (D), respectivamente. Fonte: Ferraz et al., 2015.

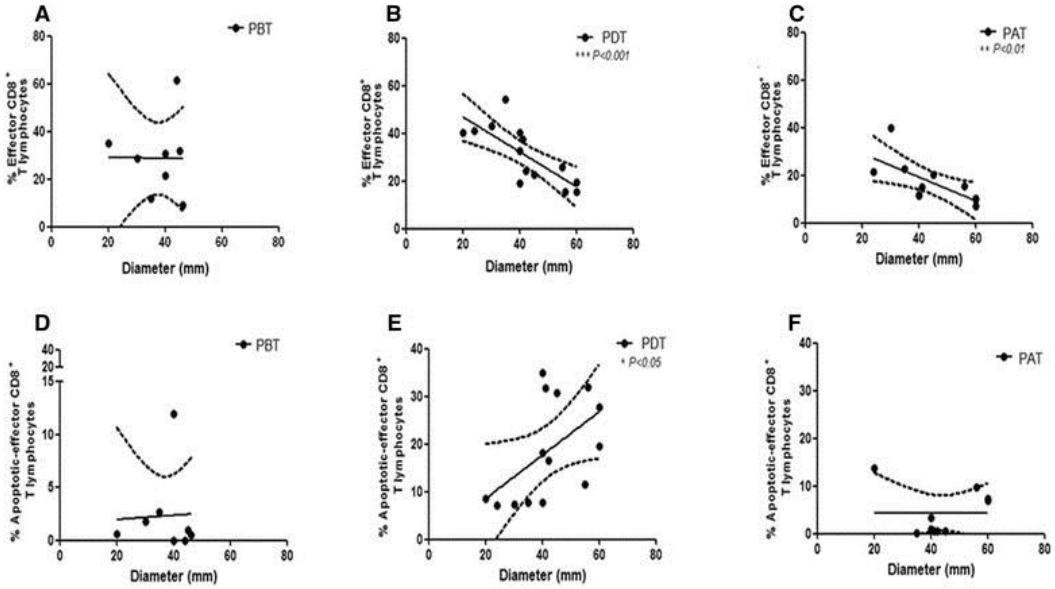


Figura 4.12 - Correlação entre o percentual de linfócitos T CD8$^+$ totais (A, B, C) e linfócitos T CD8$^+$ apoptóticos (D, E, F) com o diâmetro das lesões (mm). (A, D) PBT – pacientes antes do tratamento; (B, E) PDT – pacientes durante o tratamento; (C, F) PAT – pacientes após o tratamento. Análises estatísticas foram realizadas usando o teste de correlação de Spearman. Resultados foram considerados significantes com $P < 0.05$. Fonte: Ferraz et al., 2015.

A função citotóxica dos linfócitos T CD8$^+$ vem sendo bastante discutida, com alguns autores relacionando-a com a progressão da doença, enquanto outros não observaram tal associação. Cunha e cols. (2016) mostraram recentemente o envolvimento de outras populações celulares, além dos linfócitos T CD8$^+$, com atividade citotóxica na evolução da LCL, como os linfócitos T CD4$^+$ citotóxicos, células NK e células NKT (Figura 4.13).

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

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

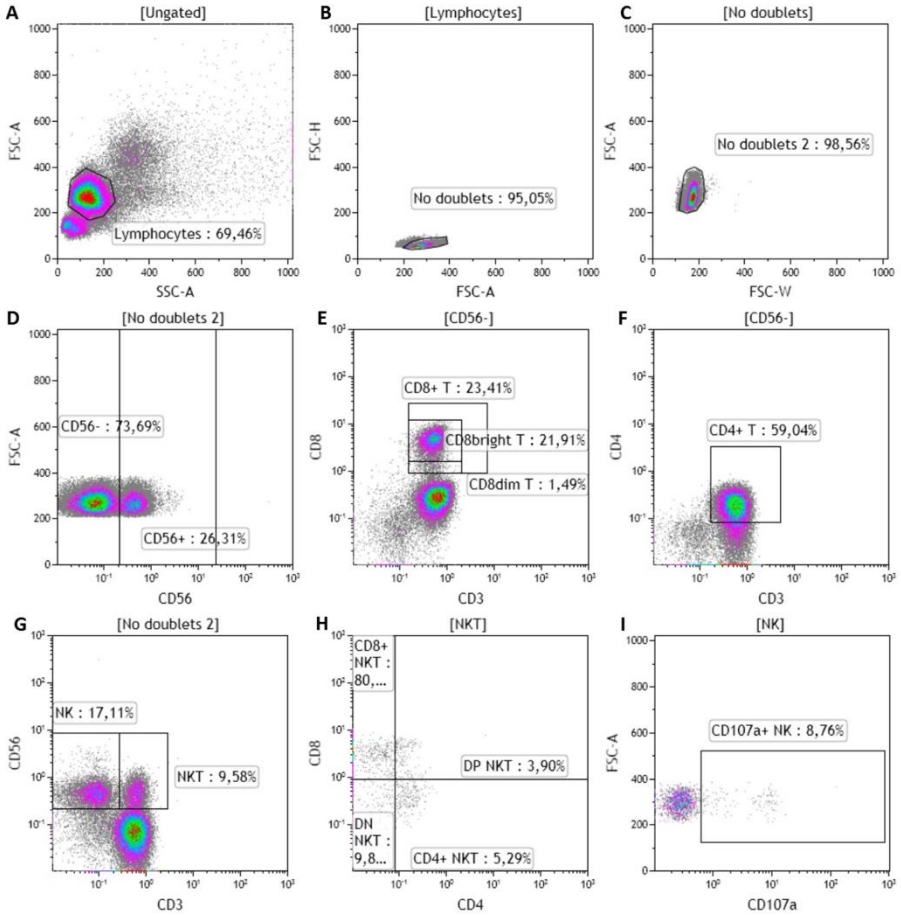


Figura 4.13 - Protocolo de citometria de fluxo para determinar as frequências de subpopulações de linfócitos T CD3$^+$, células NK e NKT citotóxicas. Células do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 e anti-CD107a. (A) Os linfócitos foram definidos através do *gate* no *dot plot* de tamanho (FSC) *vs* granularidade (SSC); (B) *Doublets* foram excluídas da análise através de dois *density plots* de FSC-Area *vs* FSC-Height (B) e FSC Area *vs* FSC Width (C) Linfócitos T CD8$^+$ e CD4$^+$ foram definidos usando CD8 *vs* CD3 (E) and CD4 *vs* CD3 (F) *dot plots*, baseados no *gate* CD56^{neg} criado no *dot plot* FSC *vs* CD56 (D), respectivamente. Células NK e NKT foram definidas através do *dot plot* CD56 *vs* CD3 (G). Subpopulações de células NKT CD8$^+$ e CD4$^+$ foram definidas no *dot plot* CD8 *vs* CD4 (H), baseado no *gate* NKT (G). A expressão de CD107a foi determinada no *dot plot* FSC *vs* CD107a, baseada em cada população celular definida – representada aqui pelas células NK (I). Fonte: Cunha et al., 2016.

As células T regulatórias (Tregs) são uma pequena percentagem das células T circulantes, que adquirem durante o processo de ontogenia e maturação a capacidade de regular a resposta imune inata e adaptativa por mecanismos de: supressão da proliferação de células T, via secreção de citocinas com efeito supressor (IL-10 e TGF-β1) ou através da indução de apoptose. São mais recentes nas descrições imunológicas, mas seu papel já tem sido descrito em processos imunes associados a

patógenos. Da-Cruz e cols. (2010) demonstrou que as Tregs migram para o sítio de lesão e lá tem capacidade supressora da resposta imune, mostrado pela técnica de supressão celular e confirmado pela inibição na produção de citocinas do perfil T_H1, esse estudo também foi pioneiro ao mostrar que a quantidade de Tregs na lesão diminuía progressivamente no decorrer do tempo de evolução da mesma, o que poderia explicar uma forte regulação negativa que as Tregs exercem sob as células do sistema imune nas fases iniciais da infecção, o que acabaria por acarretar uma irresponsividade do sistema imune o que poderia explicar alguns eventos de falha terapêutica na LTA.

4.4 Zika

O flavivírus Zika é o agente etiológico da doença que leva o mesmo nome. É uma arbovirose, sendo transmitido através da picada de um inseto vetor. O principal vetor dessa doença é o mosquito *Aedes aegypti* que também é o transmissor de outras arboviroses como dengue e febre amarela, além de ser também o transmissor da febre Chikungunya. Esse agente foi isolado em 1947 do sangue de um macaco *rhesus* (sentinela) da floresta de Zika na Uganda, e isolado da pela primeira vez de uma infecção humana em 1952, na Nigéria. O primeiro isolamento de mosquito Aedes ocorreu em 1953.

O vírus foi classicamente descrito como causador de algumas manifestações brandas como febre, mialgia, exantema e conjuntivite. Os primeiros casos relatados ocorreram principalmente na África e Ásia tendo caráter local. Entretanto, alguns indivíduos infectados podem desenvolver a síndrome de Guillain-Barré; que é uma desordem autoimune do sistema nervoso periférico, que leva a fraqueza muscular, parestesia, paralisia, e morte em alguns casos. Em 2013, no entanto, foi declarado um dos maiores surtos dessa doença na Polinésia Francesa, o que acarretou em aproximadamente 70% de infecção da população. Em 2015 foi decretado situação de atenção em saúde no Nordeste do Brasil e Colômbia devido ao grande número de casos da doença, e ao registro de crianças nascidas com más formações congênitas após suas mães terem sido infectadas pelo Zika vírus durante o período gestacional (síndrome congênita do Zika vírus).

Vários estudos têm focado na avaliação do sistema imune a fim de melhor compreender quais mecanismos o vírus utiliza para ultrapassar a barreira hematoencefálica e causar infeção no tecido neuronal dos fetos. Estudos recentes tentaram avaliar a composição do infiltrado celular após a infecção de modelo

experimental com o vírus. Já foi avaliado que o melhor modelo experimental para avaliação do efeito do vírus sobre o SNC são camundongos jovens incapazes de produzir ou responder à interferons (INFAR-KO), o intuito de novos estudos é avaliar se o vírus seria capaz de causar o mesmo efeito em modelos animais ditos imunocompetentes. Mangeeswaran e cols. (2016) mostraram que o infiltrado celular é composto por macrófagos e células da micróglia ativadas, além de linfócitos T (Figura 4.14). Os principais marcadores utilizados para a avaliação do infiltrado celular foram: CD4, CD8, CD11b, CD19, Ly6G, NK1.1 e F4/80. Além da expressão de CD45 como marcador de ativação celular.

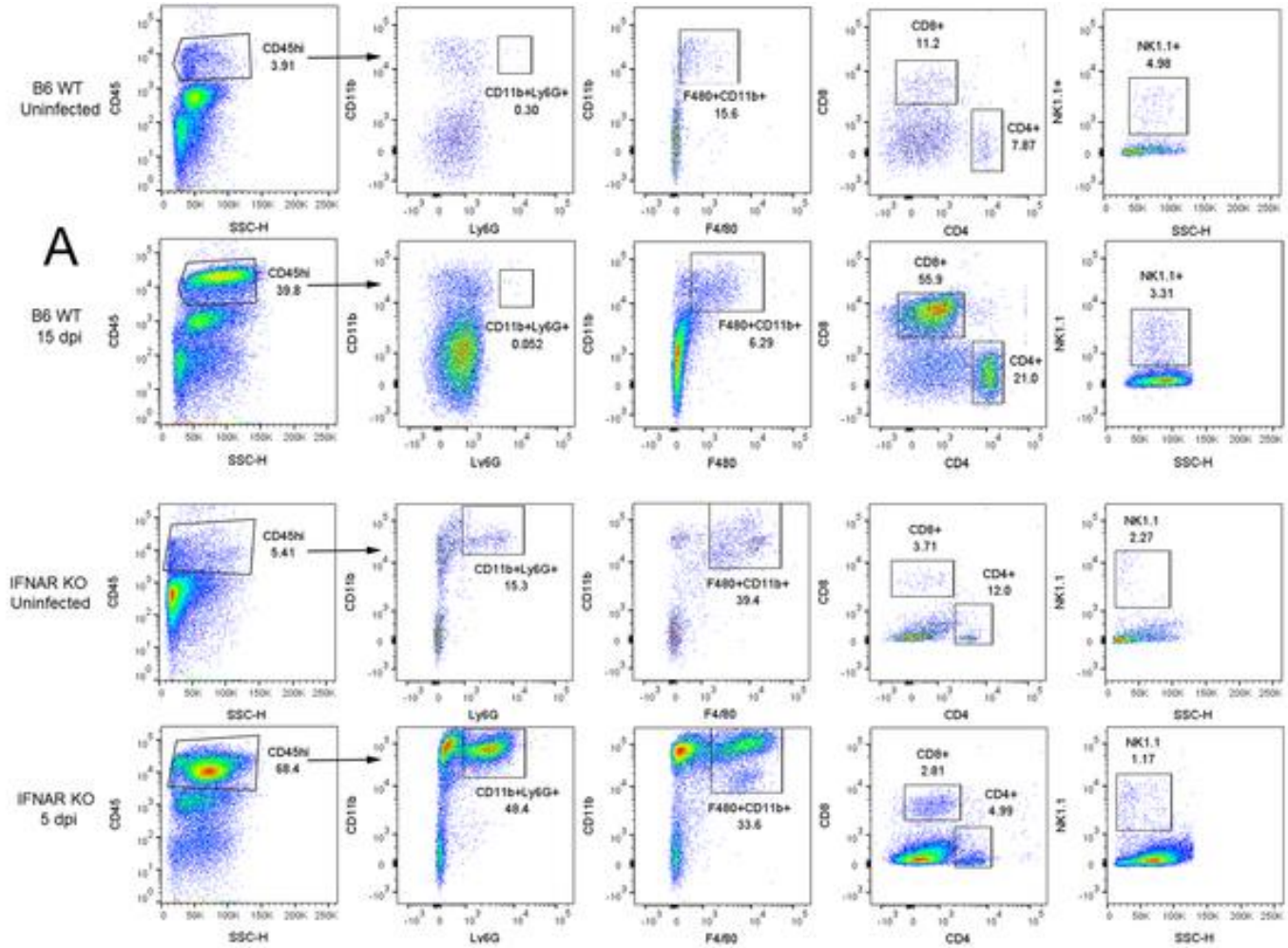


Figura 4.14 - Células imunes infiltrando no SNC em resposta à infecção pelo vírus da Zika. (A) Protocolo de citometria de fluxo de células isoladas do SNC de camundongos B6 WT a IFNAR KO no 15 e 5 dias por infecção, respectivamente. As células viáveis foram definidas pela expressão de CD45. Células $CD45^{hi}$ foram definidas através de um *gate* no *dot plot* SSC *vs* CD45 e as populações de neutrófilos $Ly\text{-}6G^{+}$, macrófagos $CD11b^{+}F4/80^{+}$, células T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ T e células $NK1.1^{+}$, respectivamente, foram determinadas baseadas neste *gate*.

Na literatura já existem dados demonstrando que existe a relação causal entre infecção pré-natal pelo ZIKV e sérias anormalidades cerebrais. A presença desse vírus já foi detectada no cérebro de um feto microcefálico, e estudos mostraram que o mesmo atenua o crescimento de neuroesferas e organóides cerebrais, além de induzir patologias cerebrais em fetos de camundongos. Mas Lum e cols. (2017) se perguntaram se esses modelos já publicados, seriam bons modelos para infecção em diferentes tipos celulares cerebrais de fetos humanos. Eles desenvolveram um estudo para buscar evidências diretas da infecção pelo Zika vírus nos tecidos fetais cerebrais humanos, especialmente em células hematopoiéticas como a micróglia (células fagocitárias do córtex cerebral).

Foram utilizadas amostras cerebrais de 9 fetos de gravidez interrompida (14 a 24 semanas) para a imunofenotipagem de micróglias e CMSPs de outros doadores para o isolamento de monócitos por *beads* e macrófagos derivados de monócitos (MDMs). O vírus foi do surto de 2013 da Polinésia Francesa. Eles empregaram a marcação intracelular de citocinas (ICS), para determinar se as células microgliais de cérebros de fetos humanos são alvo da infecção pelo ZIKV; e se as células fagocitárias da periferia seriam susceptíveis a infecção pelo ZIKV (macrófagos e monócitos de CMSPs).

A detecção do antígeno do ZIKV foi realizada por marcação intracelular indireta em dois passos. As células foram fixadas e permeabilizadas para a marcação com o anticorpo primário monoclonal 4G2 (anti-proteína de envelope do vírus), seguido do anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluorocromo Alexa Flúor 488. A marcação de superfície foi realizada com PE-Cy7 CD45 e APC CX3CR1 para a imunofenotipagem das células microgliais, CD14 para os monócitos, e as células mortas foram excluídas da análise através da utilização do marcador de viabilidade LIVE/DEAD Aqua.

A análise da infecção viral das células totais do cérebro por citometria de fluxo mostrou que a extensão da infecção variou muito entre os doadores (Figura 4.15A). Uma análise posterior revelou que antígenos de ZIKV foram detectados em larga escala em células hematopoiéticas $CD45^+$ e não na população $CD45^-$ (Figura 4.15.B). Analisando as células $CD45^+$, eles observaram que a população CD45 intermediária e $CX3CR1^+$, fenótipo das micróglias, foram infectadas com o vírus (Figura 4.15.C).

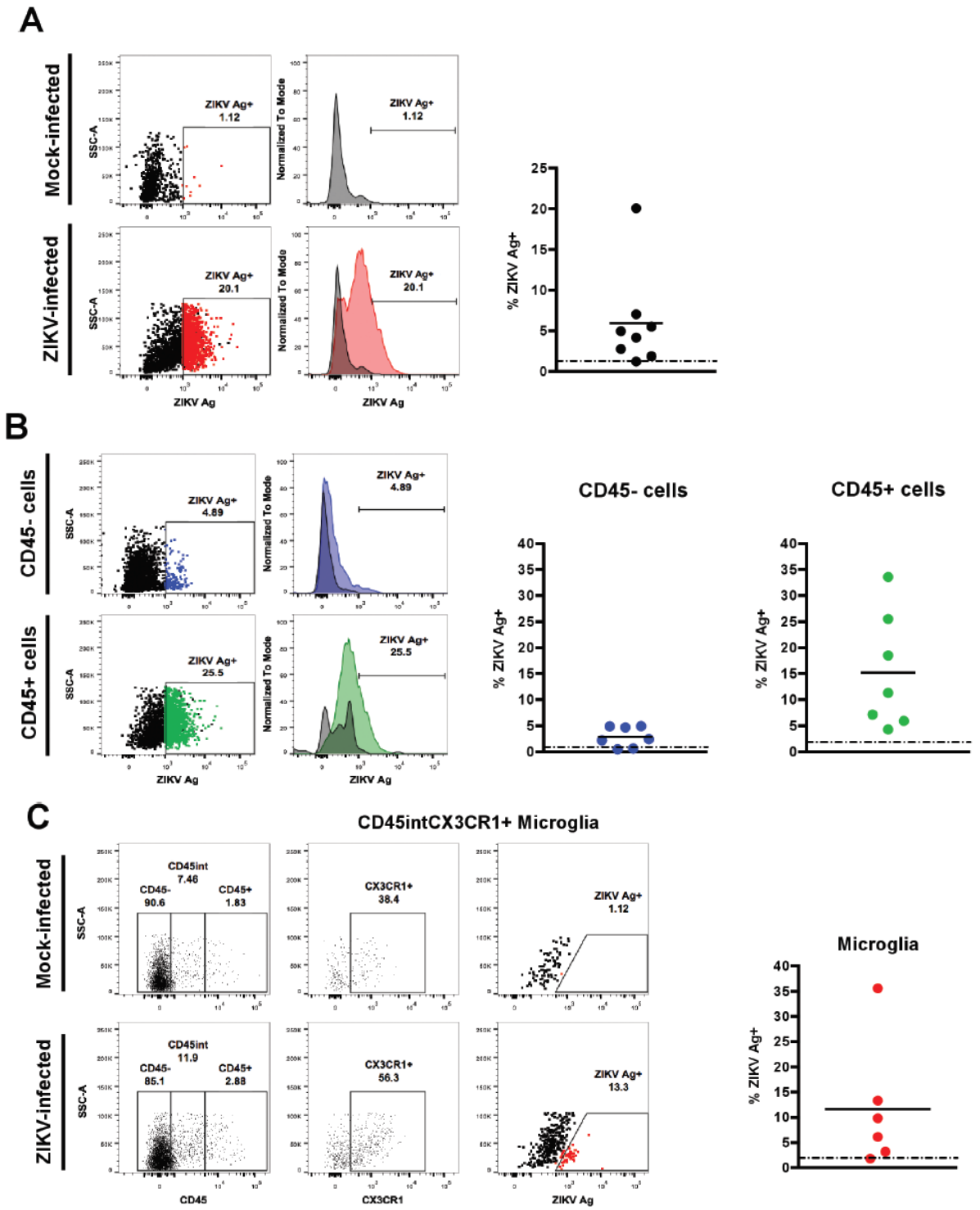


Figura 4.15 - Infecção pelo Zika vírus em células humanas cerebrais de fetos. Células foram infectadas com ZIKV (multiplicidade de infecção = 10). (A) *Plot* representativo da quantidade de antígeno E de ZIKV (Ag+) nas células vivas, e gráfico da distribuição dos doadores de acordo com a porcentagem de células infectadas. Infecção pelo Zika vírus em células humanas cerebrais de fetos. Células foram infectadas com ZIKV (multiplicidade de infecção = 10). (B) *Plots* representativos ilustrando a quantidade de antígeno E de ZIKV detectado em células vivas $CD45^-$ e $CD45^+$. Gráfico de células $CD45^-$ e $CD45^+$ ZIKV Ag^+ de 7 doadores. (C) *Dot plots* representativos ilustrando a quantidade de antígeno E de ZIKV em células microgliais vivas. As micróglias foram identificadas como CD45 intermediária e $CX3CR1^+$. Gráfico de células microgliais infectadas com ZIKV de 6 doadores.

Sabendo que as micróglias são os macrófagos residentes do cérebro, e podem ser infectadas pelo Zika vírus, o próximo passo foi investigar a susceptibilidade das células fagocitárias da periferia, e para tanto, a infecção de monócitos e macrófagos derivados de monócitos (MDMs) foi realizada. Foram observados altos níveis de infecção em monócitos e macrófagos derivados de monócitos após 72 horas de infecção. A infecção da micróglia poderia induzir altos níveis de inflamação, o que poderia ser prejudicial para o feto. A neuroinflamação local e a disseminação viral no parênquima, poderia resultar em morte dos neurônios em desenvolvimento, em particular no córtex, e levar a alterações neurológicas e microcefalia.

4.5 Vírus vacinal da febre amarela 17DD

O vírus da febre amarela pertence ao gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridade*. O seu genoma é constituído de RNA de fita simples não segmentado, polaridade positiva, com cerca de 11 kilobases de comprimento. A febre amarela é uma doença infecciosa não contagiosa, cujo o agente etiológico é o vírus da febre amarela (VFA), sendo esta endêmica em regiões tropicais da África e América do Sul (Staples *et al*., 2008). O vírus da doença pode se manter em um ciclo urbano simples ou em um ciclo silvestre mais complexo, onde primatas não humanos (PNHs) atuam como hospedeiros amplificadores. No Brasil, no primeiro caso a transmissão é feita geralmente por mosquitos do gênero *Aedes*, já no segundo, os vetores da doença são mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes* (Vasconcelos, 2003; Montath & Vasconcelos, 2015).

A última grande epidemia urbana no Brasil ocorreu em 1929, na cidade do Rio de Janeiro. Em 1930, com a introdução da vacina 17D e campanhas para erradicação do *Aedes aegypti*, epidemias urbanas diminuíram drasticamente e os focos passaram a ser confinados apenas em áreas silvestres em algumas regiões do país. Os últimos casos foram registrados em 1942, no estado do Acre (Staples *et al*., 2008; Vasconcelos, 2010). No entanto, eventualmente a febre amarela de ciclo silvestre reemerge no Brasil, ocasionando surtos que variam em magnitude e extensão. Na região sudeste do Brasil, a doença silvestre reemergiu em 2016, e se estende até o ano presente de 2018, culminando em um surto com um número de casos alarmante. Com isso, foram impactadas populações de primatas não-humanos e humanos, principalmente nos estados de Minas gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro, culminando em 723 casos humanos confirmados, com 237 óbitos no no período de 1º julho de 2017 a 28 de fevereiro deste ano de 2018 (Ministério da Saúde, 2018).

A vacina de vírus atenuado da febre amarela 17D é derivada de uma cepa africana selvagem denominada Asibi (paciente), e as subcepas utilizadas como vacinas são a 17D-213, 17D-204, 17DD (utilizada no Brasil). A vacina é obtida por atenuação do vírus pelo cultivo do mesmo em ovos de galinha embrionados livres de germes patogênicos, e é produzida desde 1937; primeiro pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e depois por Bio-Manguinhos/Fiocruz. A vacina contra febre amarela é considerada uma das mais eficazes vacinas desenvolvidas até hoje. O mecanismo de indução da resposta imune pela vacina tem sido intensamente estudado e evidências apontam para a importância de uma forte estimulação da resposta imune inata como responsável pela indução da robusta resposta imune adaptativa humoral e celular (Pulendran, 2009).

Regulações internacionais recomendavam uma dose *boost* da vacina após 10 anos de vacinação, mas em maio de 2012, um Grupo Consultor Estratégico de Especialistas da Organização Mundial de Saúde, propôs que a revacinação a cada 10 anos poderia não ser necessária, já que a imunidade de longa vida poderia ser induzida na maioria dos indivíduos. A caracterização da resposta imune após a primeira imunização poderia prover mais evidências de que a dose única seria suficiente, induzindo uma resposta imune celular e humoral robusta.

Wieten e cols. (2016) realizaram essa caracterização da resposta imune, com o objetivo de avaliar o efeito de *booster* na resposta T $CD8^+$ FA-específica de longo período e a resposta de anticorpos neutralizantes, comparando a frequência e propriedades funcionais das células T $CD8^+$ febre amarela-específicas após dose única *versus booster*. As CMSPs e soro de 6 indivíduos nos dias 0 (antes da vacinação), 3, 5, 12, 28 e 180 foram coletados (estudo prospectivo), e esses receberam a vacina Stamaril, da Sanofi Pasteur MSD, Bélgica. E coletaram de 99 indivíduos com mais de 10 anos pós-vacinação (estudo retrospectivo), que receberam a vacina Stamaril vaccine ou Arilvax da Novartis, Reino Unido. Características fenotípicas das células T $CD8^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ foram determinadas utilizando tetrâmeros de classe I.

Tetrâmeros são quatro moléculas de MHC (camundongos) ou HLA (humanos) biotiniladas ligadas à estreptavidina tetravalente. A tetramerização aumenta a avidez de ligação do complexo HLA/peptídeo ao receptor de células T (TCR), permitindo a detecção antígeno-específica. Foram construídos para esse estudo; tetrâmeros de moléculas HLA-B35 apresentando epítopos da proteína de febre amarela NS2b, HLA-B27 com NS3, HLA-A02 com NS4a e NS4b, e HLA-B07 com NS5.

Para a determinação do fenótipo e frequência das células T $CD8^+$ febre amarela-específicas, dos 6 indivíduos dose única por citometria de fluxo, foram utilizados os

marcadores de superfície anti-CD3, CD8, CD45RA, CD127, e os marcadores de moléculas intracelulares anti-granzima B, anti-granzima K, anti-Ki67 (marcador de proliferação), anti-T-bet e anti-Eomes. A granzima K é expressa por células em estágio precoce de diferenciação, enquanto que a granzima B; por células efetoras e de memória. O perfil funcional das células T CD8$^+$ antígeno-específicas pode ser predito combinando o fenótipo e a expressão de T-bet e Eomes.

Células T CD3$^+$CD8$^+$tetrâmero$^+$ foram detectadas pela 1ª vez nos 6 indivíduos do estudo prospectivo, no dia 12 pós-vacinação (Figura 4.16A). Em acordo com estudos anteriores que demonstraram que NS4b é um epítopo imuno-dominante, no dia 28 pós-vacinação, células T CD8$^+$ contra NS4b 214-222 estavam presentes em frequência mais alta que contra outros epítopos (Figura 4.16B).

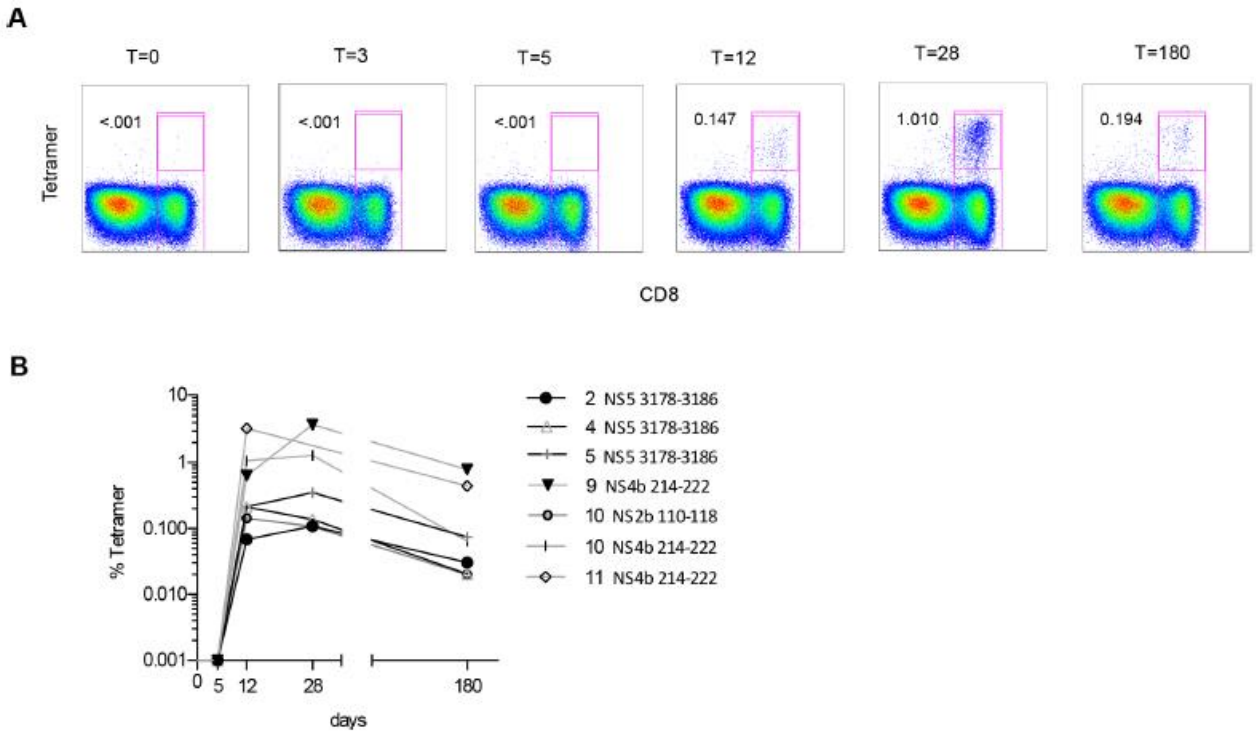


Figura 4.16 - Frequência de células T CD8$^+$ febre amarela tetrâmero+ em 6 indivíduos vacinados com dose única (*prime*). O indivíduo #10 possuía 2 tetrâmeros compatíveis com os tipos de HLA, e por isso são mostradas 7 linhas no gráfico. (A) *Dot plots* representativos de doador. (B) Frequência de células T CD8+ febre amarela tetrâmero+ expressadas em porcentagem de células T CD8+ febre amarela tetrâmero+ contra epítopos de NS2b, NS4b e NS5 em indivíduos HLA-B35, HLA-A02 e HLA-B07 nos dias 0, 3, 12, 28 e 180 dias pós-vacinação.

O fenótipo predominante observado no dia 12 pós-vacinação foi de CD45RA$^-$ CD27$^+$, células T CD8$^+$ efetoras, enquanto que no dia 28 foi o fenótipo de memória efetora CD45RA$^+$CD27$^-$, e no dia 180 o de memória efetora CD45RA$^+$CD27$^-$ e CD45RA$^+$CD27$^+$ *naïve-like* (Figura 4.17A). Essa população *naïve-like* foi avaliada

através da análise do perfil transcricional e expressão de moléculas citotóxicas; granzima K e B. O perfil do mRNA de células *naïve-like* T $CD8^+$ FA-específicas mostrou que essa população era diferente da *naïve* genuína e que era semelhante a células tronco. De fato, células T $CD8^+$ FA tetrâmero-específicas $CD27^+CD45RA^+$ mostraram baixa expressão de granzimas B e K, semelhantes a células *naïve*, mas eram $CD28^{high}$ e somente 50% expressavam CCR7, confirmando que essa população já havia entrado em contato com antígenos, e pode ter re-expressado CD45RA.

Algum tempo pós-vacinação, as células T $CD8^+$ febre amarela $tetrâmero^+$ são vírus-específicas potencialmente citotóxicas em estágios diferentes de diferenciação, variando a expressão de granzima B e K. Células T $CD8^+$ duplo-positivas para essas granzimas representam formas transicionais de GrB-/GrK+ para GrB+/GrK- (diferenciação inicial para a tardia). Para avaliar se as células T $CD8^+$ febre amarela tetrâmero+ no dia 180 pós-vacinação são potencialmente citotóxicas, as expressões de granzima B e K foram determinadas. A expressão dessas caiu com o tempo após dose única da vacina. Após um declínio inicial em porcentagem das células que expressam granzima K do dia 12 ao 28, a porcentagem das células expressando granzima K aumentou no dia 180. Em contraste, a expressão de granzima B por essas células, permaneceu estável com o tempo. E células duplo positivas para essas granzimas tenderam a ser maior em porcentagem no dia 12 e diminuíram no dia 180 (Figura 4.17B).

Para avaliar a persistência das células T $CD8^+$ FA tetrâmero-específicas, pela capacidade de se auto-renovar (proliferação), foi utilizado o marcador Ki67 (Figura 4.17C). No dia 12 pós-vacinação foi observada alta proliferação celular (96%); no dia 28 houve declínio em 3 doadores e no dia 180 houve aumento na frequência em 3 doadores e 3 permaneceram constantes. Concluiu-se, portanto, que as células T $CD8^+$ FA-$tetrâmero^+$ mantêm o potencial citotóxico, são polifuncionais e passam por proliferação homeostática até pelo menos 180 dias pós-vacinação (Figura 4.17C).

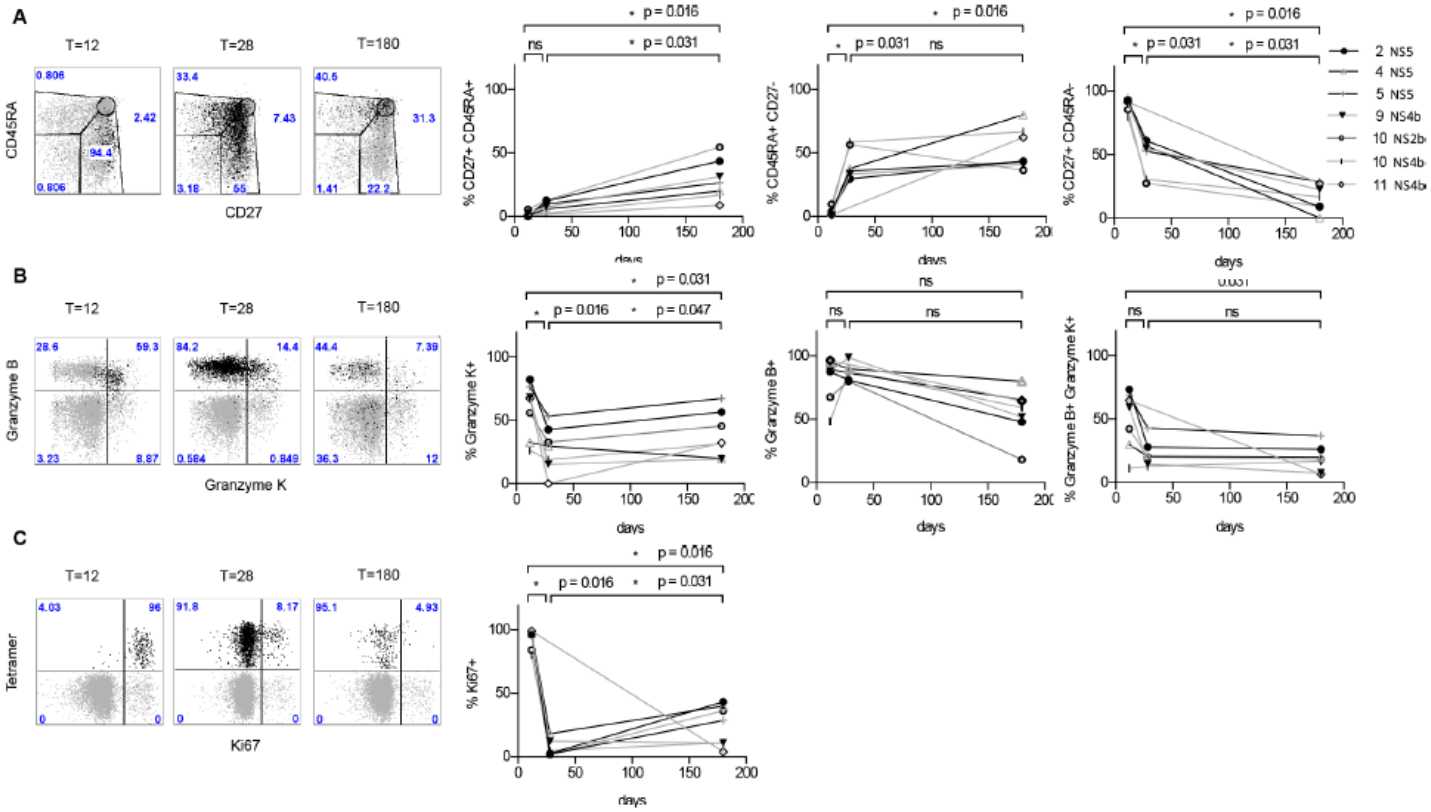


Figura 4.17 - Análise longitudinal do fenótipo das células T CD8$^+$ febre amarela tetrâmero$^+$ nos dias 12, 28 e 180 em indivíduos vacinados com dose única. (A) *Dot plot* representativo de doador. Em cinza, células T CD8$^+$ total e em preto, células febre amarela-tetrâmero$^+$. (B) e (C) Porcentagens de células tetrâmero+ expressando CD45RA, CD27, granzima K, granzima B e Ki67 (um doador possuía 2 tipos de HLA compatíveis). Comparações foram realizadas com o teste pareado de Wilcoxon Rank. Ns = não-significativo.

Células vírus-específicas que possuem o mesmo fenótipo, podem apresentar expressões diferentes de fatores de transcrição. T-bet e Eomes, (fatores de transcrição T-box) controlam a expressão de proteínas envolvidas na função efetora e homeostase. Nesse contexto, células com alta expressão de T-bet são terminais em relação a diferenciação e Eomes está relacionado a longevidade das células de memória.

Com o objetivo de investigar o potencial de memória ou efetor das células T CD8$^+$ FA-tetrâmero$^+$ no último ponto pós-vacinação (dia 180), a expressão da razão de Eomes e T-bet foi determinada (Figura 4.18A). No dia 28 após uma única dose, foi observada uma tendência ao aumento da razão T-bet:Eomes, comparado aos dias 12 e 180 (Figura 4.18B). Quando as células T CD8$^+$ FA tetrâmero$^+$ foram separadas de acordo com o fenótipo, divididas pela expressão de CD45RA e CD27, uma tendência semelhante na razão T-bet: Eomes foi observada com o tempo (Figura 4.18C).

No dia 180, na população de células total assim como em diferentes *subsets*, a expressão de Eomes tendeu a prevalecer acima da de T-bet, sugerindo a capacidade potencial para a manutenção de longa vida das células memória. Finalmente foi investigada a associação entre T-bet e Eomes e granzima B e K, respectivamente. A diferenciação em direção ao fenótipo CD27 negativo é acompanhado com ganho em toxicidade/granzima B e estágio inicial de diferenciação de células T é associado com a *upregulation* de granzima K. A expressão de T-bet se correlaciona positivamente com a expressão de granzima B e a expressão de Eomes com a expressão de granzima k (Figura 4.18D).

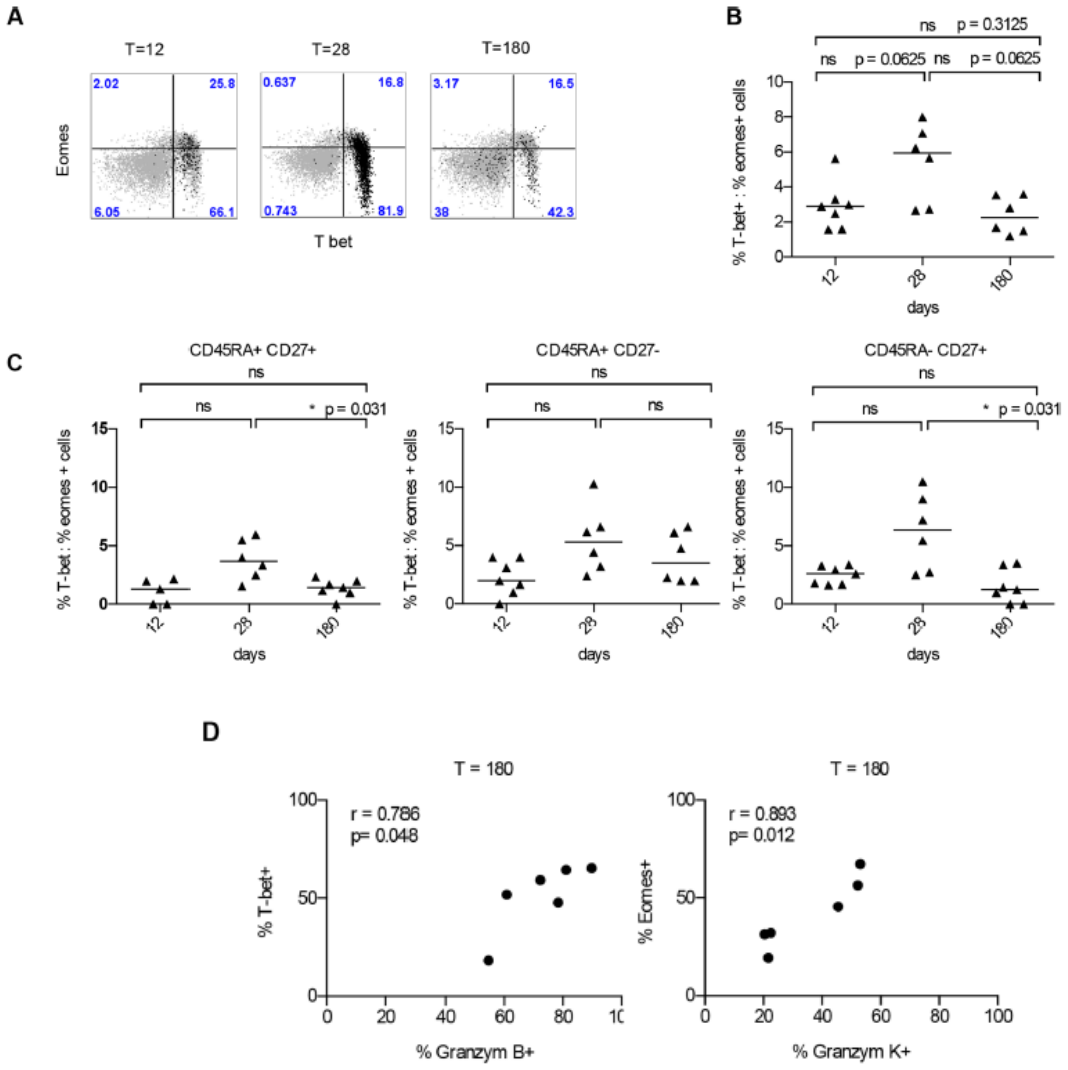


Figura 4.18 - Análise longitudinal da expressão de T-bet e Eomes em indivíduos vacinados com dose única. *Dot plots* representativos de doador. Células T CD8$^+$ total em cinza e T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ em preto. (B) e (C) Razão de T-bet:Eomes nos dias 12, 28 e 180 nas células e T CD8$^+$ tetrâmero$^+$. (D) Correlação da expressão de granzima K e Eomes, e da expressão de granzima B e T-bet nos dias 12, 28 e 180 depois da vacinação.

Para avaliar se a vacinação *booster* leva ao aumento da frequência ou diferenciação do padrão das células T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$, a porcentagem dessas células em 13 indivíduos que receberam vacinação de dose única no passado (tempo médio desde a vacinação,10 anos) foi comparada a de 7 indivíduos que receberam 1 ou 2 *boosters* durante toda a vida (tempo médio desde o último booster, 6 anos). A porcentagem das células T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ no grupo que recebeu *booster* foi comparável a frequência dessas células nos indivíduos que receberam apenas uma dose. As características fenotípicas das células T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ (CD45RA$^+$CD27$^-$, CD45RA$^-$CD27$^+$, CD45RA$^+$CD27$^+$) nos indivíduos que receberam dose única e *booster* foram comparáveis. Por isso, a frequência ou o fenótipo dessas células não são influenciados por múltiplas vacinações (Figura 4.19). Em relação a análise de anticorpos neutralizantes, a concentração diminui com o tempo de vacinação e com a idade do indivíduo vacinado. Entretanto, 90% dos indivíduos apresentaram NAbs acima do limiar de proteção, mesmo depois de 35 anos de vacinação, e uma dose de reforço não resultou em maiores títulos de anticorpos em relação a dose única.

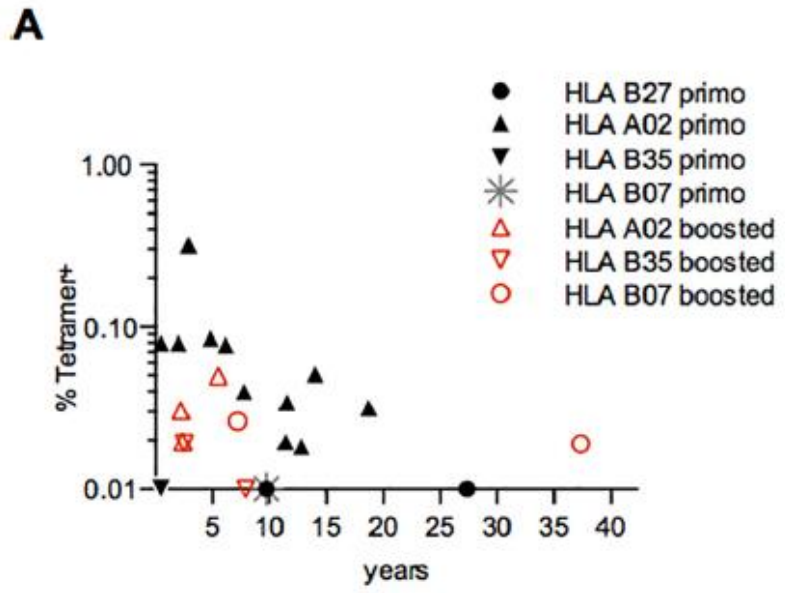


Figura 4.19 - Porcentagens das células T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ ao longo do tempo em 13 indivíduos que receberam vacinação dose única e que 11 eram HLA-A02, 2 HLA-B27, 1 HLA-B35 e 1 HLA-B07 (2 doadores possuíam 2 tipos de HLA compatíveis com reatividade de tetrâmero). Sete doadores, 3 HLA-A02, 2 HLA-B07 e 2 HLA-B35 receberam vacinação *booster*. No eixo X, número de anos desde a última vacinação até a coleta de CMSPs. No eixo Y, a porcentagem das células T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$. Em preto, indivíduos com dose única; vermelho com *boosters*. Em 4 doadores as células T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ só foram detectadas após expansão *in vitro* por cultura durante 9 dias na presença de IL-2 e pool de peptídeos de febre amarela. Análise de correlação entre T CD8$^+$ febre amarela-tetrâmero$^+$ de indivíduos HLA-A02 de dose única e tempo desde a última vacinação mostrou correlação negativa significante (r = -0.76, p = 0.0086, *Spearman's Rank Correlation Coefficient*).

REFERÊNCIAS

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

Chometon TQ. Geração in vitro de células dendríticas humanas e sua relação com a vacina BCG Moreau. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/Fiocruz). Rio de Janeiro, 2016.

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

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

Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B, Chan JK, Rénia L, Ginhoux F, Ng LF. Clin Infect Dis. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. 2017 Apr 1;64(7):914-920.

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

Ministério da Saúde [acesso em 20 de maio 2018]. Disponível em: http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42655-febre-amarela-ministerio-da-saude-atualiza-casos-no-pais.

Mishra A, Akhtar S, Jagannath C, Khan A. Pattern recognition receptors and coordinated cellular pathways involved in tuberculosis immunopathogenesis: Emerging concepts and perspectives Mol Immunol. 2017 Jul; 87:240-248.

Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. J Clin Virol. 2015 Mar;64:160-73.

MS. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde (MS), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Nieuwenhuizen NE, Kaufmann SHE. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette–Guérin.Frontiers in Immunology. 2018;9:121. doi:10.3389/fimmu.2018.00121.

Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. Nat Rev Immunol. 2009;9(10):741-7.

Smith SG, Smits K, Joosten SA, van Meijgaarden KE, Satti I, Fletcher HA, Caccamo N, Dieli F, Mascart F, McShane H, Dockrell HM, Ottenhoff TH Intracellular cytokine staining and flow cytometry: considerations for application in clinical trials of novel tuberculosis vaccines PLoS One 2015 Sep 14;10(9)

Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. JAMA. 2008 Aug 27;300(8):960-2.

Vasconcelos PF. Yellow fever. Rev Soc Bras Med Trop. 2003 Mar-Apr;36(2):275-93.

Vasconcelos PF. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. Rev Saude Publica. 2010 Dec;44(6):1144-9.

WHO. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization (WHO); 2017. Licence: CC BY-NCSA3.0 IGO.

Wieten RW, Jonker EF, van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Ten Berge IJ, de Visser AW, van Genderen PJ, Goorhuis A, Visser LG, Grobusch MP, de Bree GJ. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. PLoS One. 2016 Mar 15;11(3):e0149871.

Yang Q, Xu Q, Chen Q, *et al.* Discriminating Active Tuberculosis from Latent Tuberculosis Infection by flow cytometric measurement of CD161-expressing T cells. Scientific Reports. 2015;5:17918.

CAPÍTULO 5. *CELL SORTING* POR CITOMETRIA DE FLUXO – PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES

Thaize Quiroga e Raquel Ferraz

A citometria de fluxo tem como principal aplicação a aquisição e a análise de células, além de prover informações acerca das características físicas, químicas e biológicas destas células, como já visto nos capítulos anteriores. Os citômetros de fluxo que possuem esta capacidade são chamados de citômetros analisadores. Além deste recurso, alguns citômetros possuem uma configuração particular e um sistema específico que permitem a separação de populações celulares puras e homogêneas, a partir de uma amostra heterogênea, de acordo com critérios biológicos predefinidos. Estas populações purificadas se tornam, então, disponíveis para diversas aplicações como avalições genéticas e ensaios funcionais. Sendo assim a purificação celular ou *cell sorting* se tornou uma ferramenta poderosa para isolar de forma precisa populações celulares, baseando-se na análise de suas características biológicas, a partir de uma amostra heterogênea. Este processo citofluorimétrico é conhecido como *Flow Sorting* ou *Cell Sorting* e os citômetros de fluxo capazes de realizar este processo são chamados de *Cell Sorters*.

5.1 Princípios

Existem diversas maneiras de isolar uma determinada população celular, a metodologia pode variar de acordo com o tipo celular e frequência da população desejada. Atualmente, as metodologias mais eficazes e utilizadas para purificação de células são: a separação por citometria de fluxo (FCCS – *flow cytometry cell sorting*) e por microesferas magnéticas (MACS – *magnetic activated cell sorting*).

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

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

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

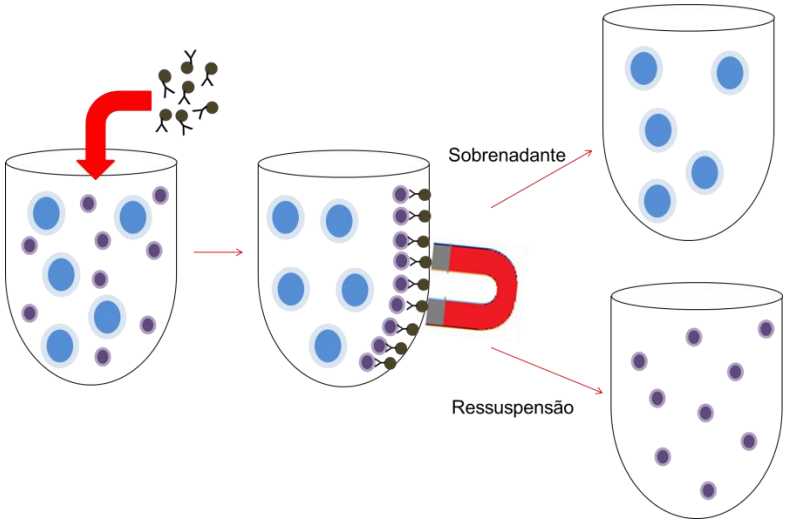


Figura 5.1 - Esquema representativo de separação de células por *beads* magnéticas

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

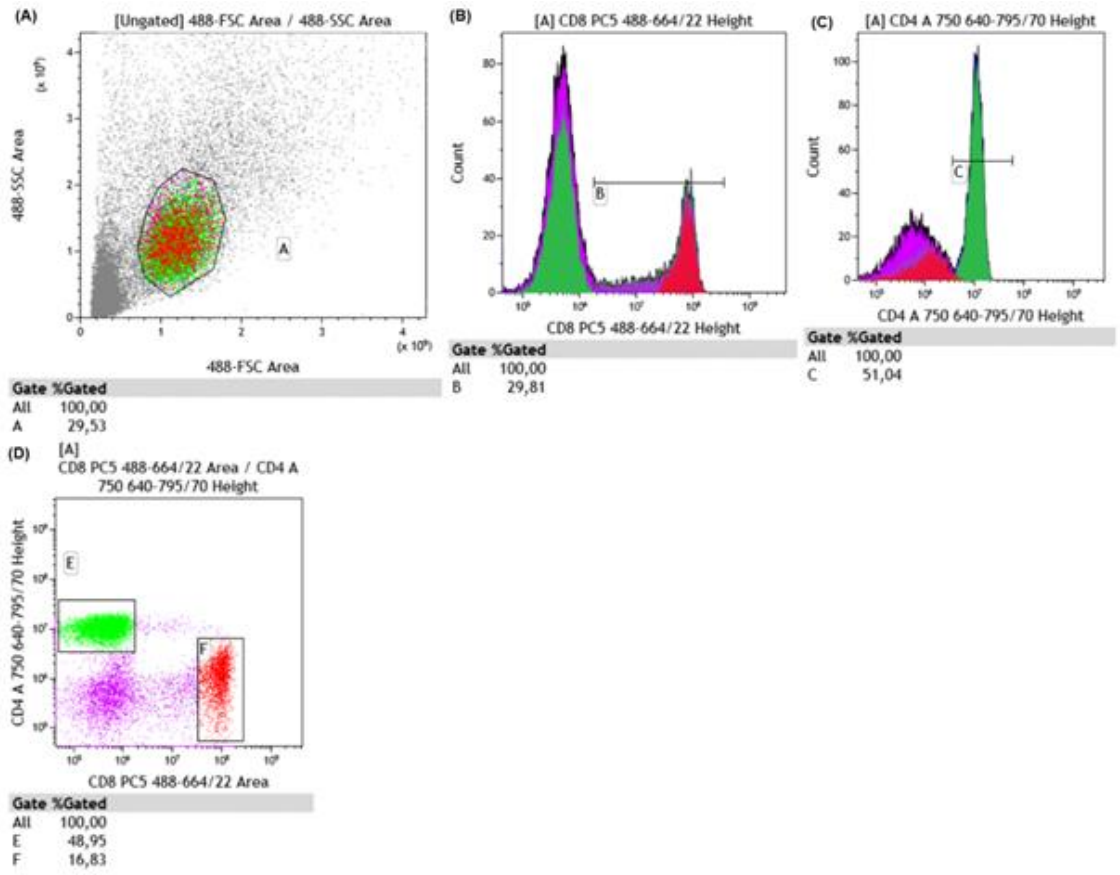


Figura 5.2 - Linfócitos humanos marcados com anticorpos anti-CD8-PC5 e anti-CD4-Alexa 750. (A) *Dot plot* de morfologia (tamanho – FSC *vs* granulosidade – SSC), ao qual a população de linfócitos foi selecionada (*gate* A); (B) e (C) Histogramas de CD8-PC5 e CD4-Alexa 750 onde as regiões B e C representam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

Após a escolha da população a ser purificada, o processo de *Cell Sorting* se inicia e as células escolhidas serão direcionadas para tubos ou placas de cultivo de vários tipos contendo meio apropriado. Resumidamente, um dos princípios iniciais para a realização do *cell sorting* é o emprego de uma vibração na câmara de fluxo (*Flow Cell*), levando o fluxo contínuo de salina a se "quebrar" em gotas (*droplets*), onde cada gota deve conter uma única célula. A frequência e a amplitude desta vibração são definidas pelo operador do equipamento, seguindo critérios de calibração pré-estabelecidos, visando uma pureza absoluta após o processo de purificação. Assim, a célula no interior de cada gota é interceptada pelo *LASER*, suas características morfológicas e as fluorescências são emitidas para os foto-sensores, que por sua vez enviam pontos eletrônicos para o computador. Critérios de *sorting* são definidos no software de

aquisição, baseado nos *gates* criados nos *dot plots* e histogramas, de modo a selecionar a(s) população(ções) a ser(em) purificadas. Essas informações são reenviadas para a *flow cell*, aonde a mesma recebe uma carga elétrica, transferindo-a para a gota que contem a célula que preenche o critério definido para a separação. É importante salientar que, de fato, é a gota contendo a célula que é separada. Assim, por carreamento de elétrons, a gota selecionada recebe uma carga positiva ou negativa, dependendo do critério de seleção pré-estabelecido no software. No nosso exemplo, aonde as duas subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ são purificadas, cada gota contendo uma destas células (ex. LT $CD4^+$) recebe uma carga positiva e outra gota contendo a outra célula (ex. LT $CD8^+$) recebe uma carga negativa. Continuando, o fluxo contínuo de gotas, passa por duas placas defletoras energizadas (4000 volts) e as gotas então serão atraídas pela placa defletora com carga elétrica contrária à da gota, de forma que as gotas carregadas, ao invés de seguir o fluxo de líquido contínuo do equipamento, são defletidas, levando-as a caírem em tubos contendo meio próprio para o recebimento destas células (Figura 5.3).

Devido ao tempo necessário entre a interceptação da célula pelo *LASER*, a ida destas informações ao computador e a volta para o correto carreamento elétrico de cada gota, tem-se como objetivo principal para a calibração do citômetro de fluxo, a definição do *drop delay*. Para isso, deve-se ajustar o equipamento quanto à distância precisa entre a primeira gota a ser formada e a *flow cell*; a distância entre as gotas de forma que cada uma contenha uma única célula ao ser interceptada pelo *LASER*; e o tempo correto que cada gota deve levar entre a *flow cell* e a placa de carreamento, visando sempre atingir 100% de pureza de eficiência na separação homogênea das populações celulares. A eficácia do processo pode ser conferida pela própria citometria de fluxo, através de nova aquisição das células isoladas, as quais devem ser positivas somente para o parâmetro que foi selecionado. Então, no nosso exemplo após todo o processo de separação teremos um tubo contendo somente células $CD8^+$ e outro contendo células $CD4^+$ (Figura 5.4).

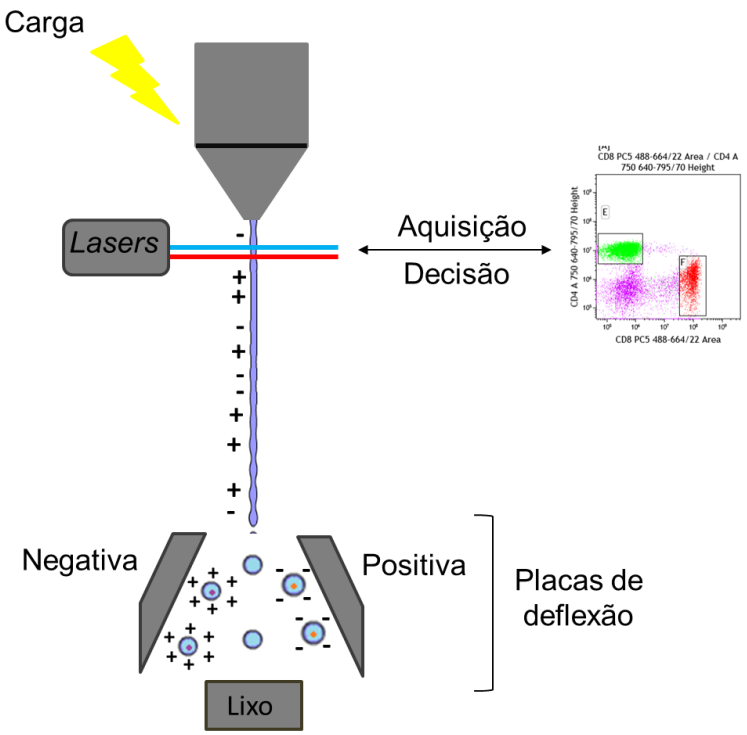


Figura 5.3 - Esquema representativo de um *cell sorting.* Imagem cedida por Chometon, 2018.

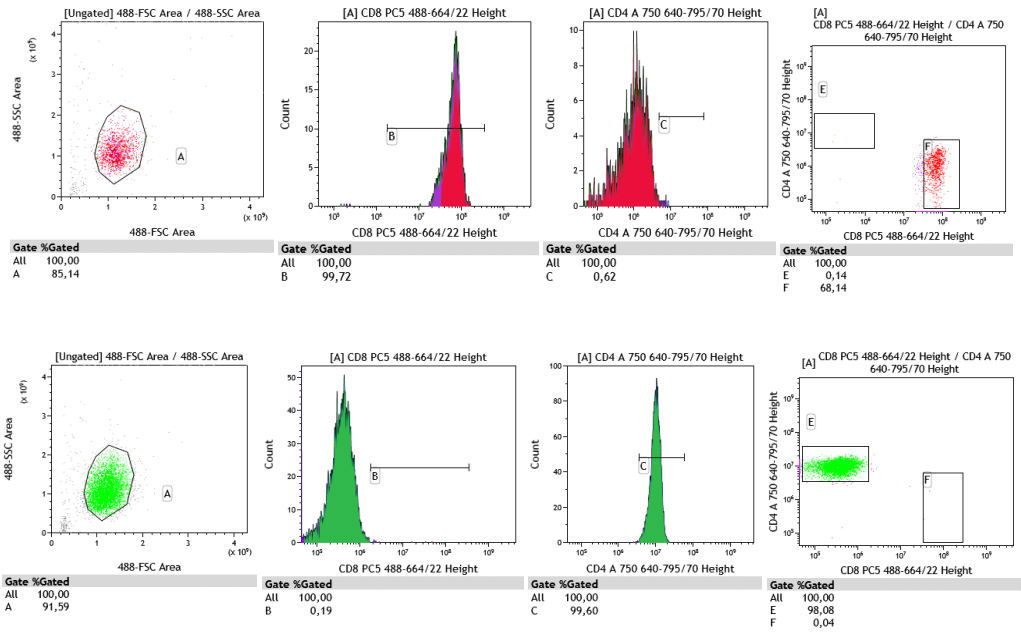


Figura 5.4 - Células pós *sorting*, onde a primeira linha representa as células $CD8^+$ e a segunda linha representam as células $CD4^+$. A primeira coluna mostrando *Dot plot* de morfologia (Tamanho - FSC *vs* Granulosidade - SSC) da população de linfócitos (*gate* A). A segunda e terceira colunas mostrando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

5.2 Aplicações do *cell sorting* por citometria de fluxo

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

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

5.2.1 Sexagem de sêmem

A sexagem de sêmem por citometria de fluxo é feita pela separação de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y em duas subpopulações purificadas, baseado no conteúdo de DNA celular. Esse método mensura a quantidade de DNA de cada célula espermática pela fluorescência emitida pelo corante Hoechst 33342, que é um corante que se liga ao DNA (Figura 5.5). Para aferir a viabilidade dos espermatozoides é utilizado o FD&C Red N° 40 que funciona com um *quencher* da marcação do Hoechst 33342, o qual as células não viáveis, aparecem como negativas para a marcação com Hoechst 33342.

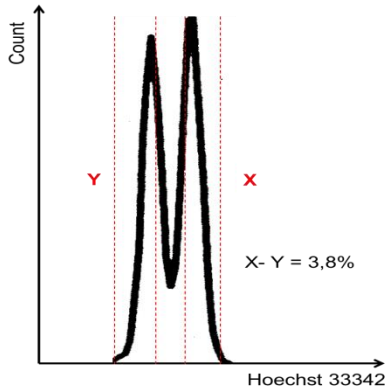


Figura 5.5 - Ilustração de um histograma típico de citometria de fluxo de esperma.

O sêmen sexado se tornou comercialmente disponível em 2006, utilizando-se o método de citometria de fluxo para a separação de células. Até os dias de hoje, nenhum outro método provou ser eficaz para este fim. A separação dos espermatozoides para a produção de machos (cromossomo Y) ou fêmeas (cromossomo X) é possível devido à diferença no conteúdo de DNA dessas células (o espermatozoide que gera fêmea possui 4% mais material genético que o espermatozoide que gera macho).

Com o uso da citometria de fluxo para separação de células é possível separar os dois tipos de espermatozoides com alta confiabilidade. Mamíferos produzem sêmen de forma que 50% dos espermatozoides carregam o cromossomo X e 50% carregam o cromossomo Y. Muitas diferenças teóricas entre o espermatozoide X e Y têm sido sugeridas (por exemplo, diferenças de tamanho, peso e densidade, dentre outras). Entretanto, essas diferenças são tão pequenas que atualmente é impossível medir a maioria deles de forma precisa. Assim sendo, os espermatozoides são, na prática, idênticos quanto ao tamanho, peso, velocidade, etc. Essa técnica tem sem mostrado eficaz para a sexagem de sêmem bovino, com pureza acima de 90% para o sexo desejado. Entretanto, a sexagem de sêmem por citometria de fluxo ainda é um desafio para outras espécies devido a menor diferença entre a quantidade de DNA presente nos cromossomos X e Y em cada uma dessas espécies (Figura 5.6).

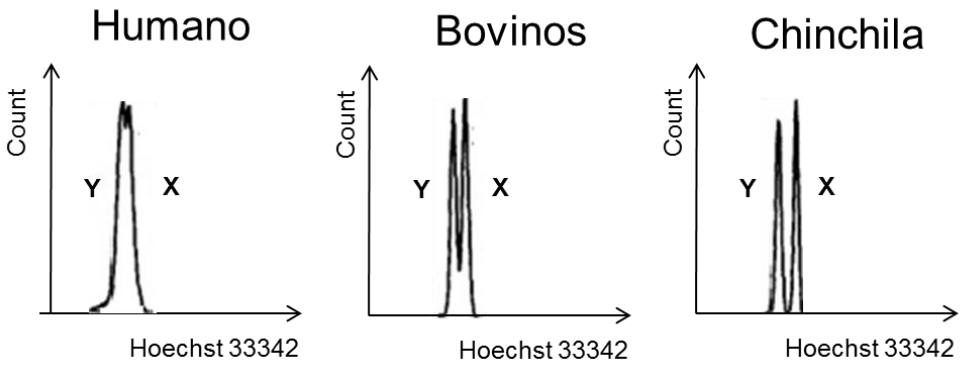


Figura 5.6 - Histogramas típicos de sexagem de sêmem por citometria de fluxo em diferentes espécies.

Para uma melhor eficiência na sexagem de sêmem, o citômetro de fluxo convencional sofreu algumas modificações. A principal delas ocorreu na conformação estrutural da *flow cell tip* (ponteira), permitindo uma maior acurácia na avaliação do DNA dos espermatozoides, devido ao fato desta *tip* forçar os espermatozoides a passarem somente na orientação vertical quando interceptados pelo *LASER*. Além disso, para otimizar a captura da fluorescência os fotodetectores (PMTs) são situados a 0° e 90° do *LASER*. Essa mudança da posição dos PMTs auxilia a determinar se os espermatozoides estão na orientação correta (vertical) e uma mensuração mais precisa do Hoechst 33342. (Figura 5.7)

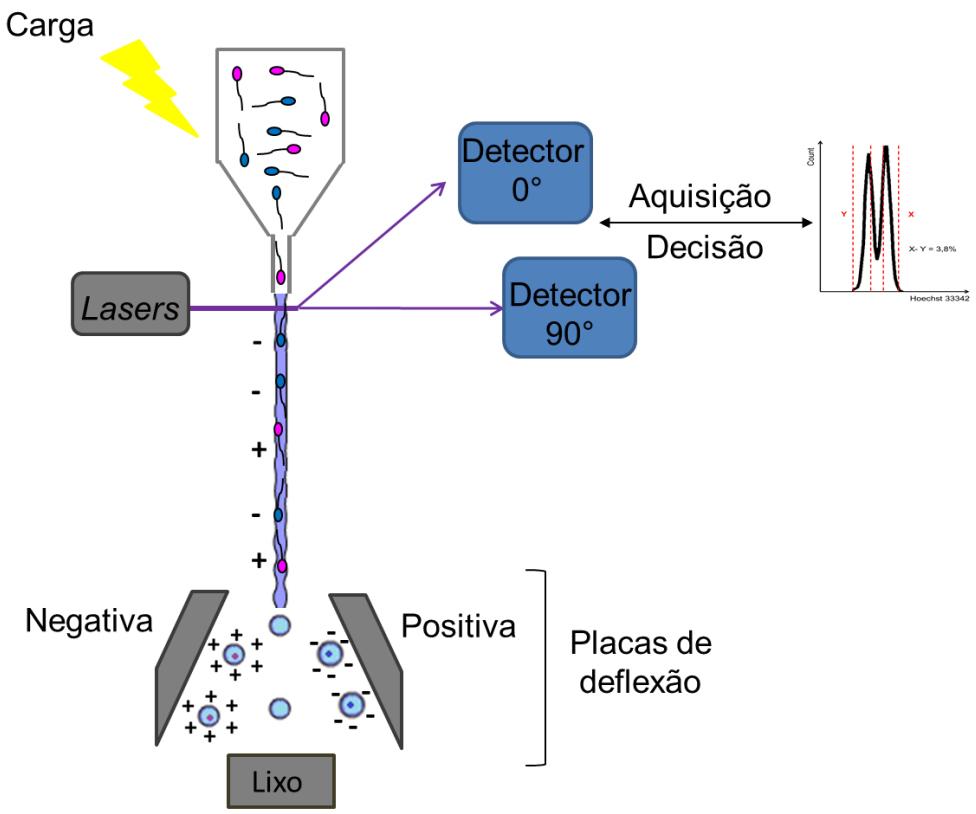


Figura 5.7 - Esquema de um citometro-*cell sorter* modificado para sexagem de sêmem, mostrando que com a modificação da ponteira os espermatozóides passam sempre na orientação vertical. Imagem cedida por Chometon, 2018.

5.2.2 *Single Cell Sorting* - Clonagem

Em alguns citômetros de fluxo *cell sorters* é possível, ainda, separar apenas uma célula, em um processo chamado de *Single Cell Sorting* (ou clonagem), muito utilizado para clonar parasitos para serem cultivados para enriquecimento de acervos das coleções parasitárias ou serem utilizados, após o *single cell sorting*, em ensaios funcionais *in vitro* ou de biologia molecular. Além disso, a clonagem pode ser feita a partir de células para, por exemplo, produção de anticorpos monoclonais ou para ensaios *in vitro* que vise estudar populações celulares oriundas de um clone celular. Geralmente neste processo, cada célula é direcionada para um poço de uma placa de cultivo (96 poços) e para isso o citômetro de fluxo deve ter além do suporte específico para a placa, permitindo a sua movimentação para que cada poço receba a única célula (Figura 5.8), um software específico para calcular o direcionamento da mesma. A partir da única célula depositada no poço (*single cell sorting)*, clones serão expandidos e podem ser submetidos a ensaios funcionais e de biologia molecular.

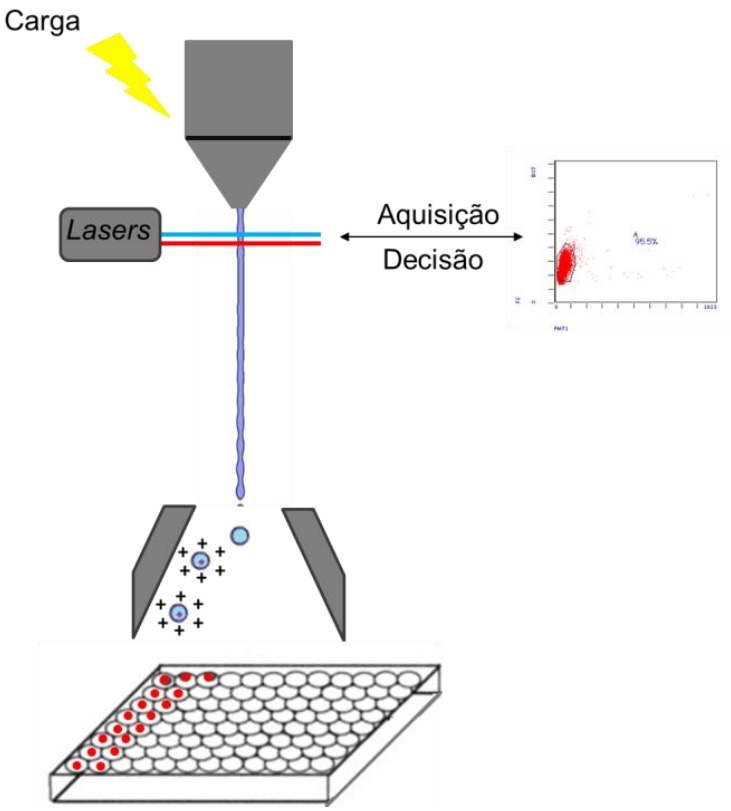


Figura 5.8 - Esquema de clonagem por citometria de fluxo. Placa de cultivo em movimento para que cada poço receba uma única célula. Imagem cedida por Chometon, 2018.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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