

INTRODUÇÃO À
**CITOMETRIA
DE FLUXO**

UM MANUAL
BÁSICO PARA
INICIANTES



RODRIGO NETTO COSTA

ISBN: 9798647258465
Selo editorial: Independently published

MSc. Rodrigo Netto Costa

Introdução à Citometria de Fluxo

Um manual básico para iniciantes

Curitiba – PR – Brasil

Maio/2020

Apresentação

A citometria de fluxo é uma tecnologia que cada vez mais tem se destacado no laboratório clínico e de pesquisa sendo responsável por diversos avanços na ciência. Sua aplicação não se limita a uma única área do conhecimento, podendo ser empregada nas áreas de imunologia, hematologia, genética, biologia celular, microbiologia, parasitologia, oceanografia, em estudos de novos medicamentos e de terapias com células tronco, entre muitos outros. Baseia-se na mensuração dos parâmetros morfológicos e funcionais de células, por meio da detecção da dispersão da luz e da emissão da fluorescência de corantes ligados à superfície ou ao interior dessas células, quando são interceptadas por uma fonte luminosa, como um laser. Sua capacidade para analisar diversos parâmetros simultaneamente em uma única célula, torna a citometria de fluxo no método de escolha para análises multiparamétricas de populações celulares. Além de ser uma técnica também aplicada na separação ou purificação de uma determinada população celular a partir de uma suspensão heterogênea, processo denominado de *sorting*. Por ser uma metodologia com todas estas importantes características e abrangência de aplicações e, ao mesmo tempo, carecer de manuais mais básicos e introdutórios escritos em língua portuguesa; este pequeno livro veio para suprir esta lacuna e tentar ajudar estudantes de graduação e pós-graduação, bem como cientistas que não terão que operar diretamente um citômetro de fluxo, mas precisarão de um conhecimento básico na leitura de artigos que apresentem resultados desta técnica, além de uma orientação inicial para identificarem se precisarão utilizá-la ou não no andamento de suas pesquisas.

Sobre o Autor

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO (2001), Especialista em Análises Clínicas pela Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (2003) e Mestre em Ciências pela Escola Nacional de Saúde Pública/ Fundação Oswaldo Cruz (2006). Autor e coautor de artigos científicos e diversos resumos publicados em anais de congressos científicos. Tem cerca de 18 anos de experiência em sua área de formação atuando em controle de qualidade, pesquisa e saúde pública. Há mais de 3 anos tem trabalhado com citometria de fluxo em dedicação exclusiva.

Sumário

Capítulo 1	6
Introdução.....	7
Capítulo 2	12
Flúídica.....	13
Capítulo 3.....	16
Óptica.....	17
Capítulo 4	29
Eletrônica.....	30
Capítulo 5.....	34
Análise dos Dados	35
Capítulo 6	45
Sorting	46

Capítulo 1

Introdução

O que significa citometria de fluxo? Se dividirmos o termo em três partes, veremos que “cito” significa célula, “metria” significa medida e “fluxo” dá ideia de movimento contínuo de algo que segue um determinado curso. Desse modo, a citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia que mede e analisa simultaneamente várias características de células ou partículas em uma suspensão líquida, enquanto passam individualmente em um fluxo contínuo através de um feixe de luz.

A maioria dos citômetros de fluxo são capazes de analisar partículas ou células que podem variar entre 0,2 e 50 micrômetros de diâmetro. E além do tamanho, características como complexidade interna e intensidade de fluorescência também podem ser medidas por CF. Com isso, uma infinidade de tipos celulares, incluindo células de mamíferos, de plantas, algas, protozoários, bactérias, fungos, núcleos e até mesmo microvesículas celulares estão entre os muitos exemplos do que se pode analisar por esta metodologia.

A CF é amplamente utilizada em pesquisas biológicas e também no laboratório clínico de rotina. Com um número crescente de corantes fluorescentes disponíveis e uma gama crescente de anticorpos monoclonais, as aplicações tem crescido em ritmo acelerado. Os corantes fluorescentes podem ser usados para marcar diretamente os componentes celulares, como o DNA, e outros podem ser ligados a anticorpos contra uma grande variedade de proteínas celulares.

A principal vantagem desta metodologia reside na capacidade de fazer medições em um grande número de células únicas dentro de um curto período de tempo, podendo-se revelar a heterogeneidade de populações celulares em uma única amostra, identificando e quantificando diferentes subconjuntos de células. E, além disso, possui a capacidade de analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula, sendo por isso uma das principais técnicas de escolha para análises multiparamétricas nas áreas de imunologia, biologia celular e molecular, microbiologia, parasitologia, em estudos de avaliação funcional e diferenciação de populações celulares, imunofenotipagem, conteúdo de ácidos nucleicos, atividades

enzimáticas, avaliação da proliferação, ciclo celular e morte celular (por necrose ou apoptose), expressão e modulação de receptores, produção de citocinas, entre outros.

Uma aplicação de grande destaque na CF é a separação de uma determinada população celular a partir de uma suspensão heterogênea de células, processo denominado *sorting*. Assim, há dois tipos de citômetros de fluxo produzidos comercialmente, os citômetros analisadores e os citômetros separadores de células, denominados de *Cell Sorters*.

Em geral, os citômetros de fluxo são compostos por três principais subsistemas: fluídico, óptico e eletrônico. Os três subsistemas trabalham em conjunto para medir simultaneamente várias características físicas de partículas à medida que se movem em um fluxo contínuo e passam através de um ou mais feixes de luz que geralmente são lasers.

Os lasers são escolhidos porque produzem um feixe de alta intensidade de luz monocromática. Eles também têm um diâmetro pequeno, o que é importante, pois a luz precisa ser

focada em um pequeno volume para obter a excitação máxima de uma única célula e minimizar a probabilidade de haver mais de uma célula no feixe. O laser primário mais comum é um laser de íons de argônio resfriado a ar, produzindo luz azul a 488 nm. Contudo há vários outros tipos de lasers, tanto resfriados a ar como de estado sólido que produzem luz nos comprimentos de onda entre 325 nm e 780 nm.

O subsistema fluídico transporta partículas desde sua aquisição oriunda do tubo de amostra, através de um fluxo contínuo até chegarem no feixe de laser onde são interceptadas. A porção da corrente do fluido onde as partículas estão localizadas é chamada de núcleo de amostra. O ponto em que as partículas encontram o feixe de laser é o ponto de interrogação. A luz incidente do laser é dispersa e a fluorescência é emitida quando as partículas passam pelo chamado ponto de interrogação.

O subsistema óptico consiste em componentes de excitação e coleta. Os componentes de excitação incluem as fontes de lasers, prismas e lentes de modelagem de feixe de

laser para direcioná-los para o núcleo da amostra. Quando as partículas passam pelo ponto de interrogação do laser, elas dispersam a luz, e qualquer molécula fluorescente presente na partícula emite fluorescência. Lentes posicionadas adequadamente coletam a luz dispersada e a fluorescência emitida, enquanto outros componentes do subsistema óptico as direcionam para os detectores apropriados.

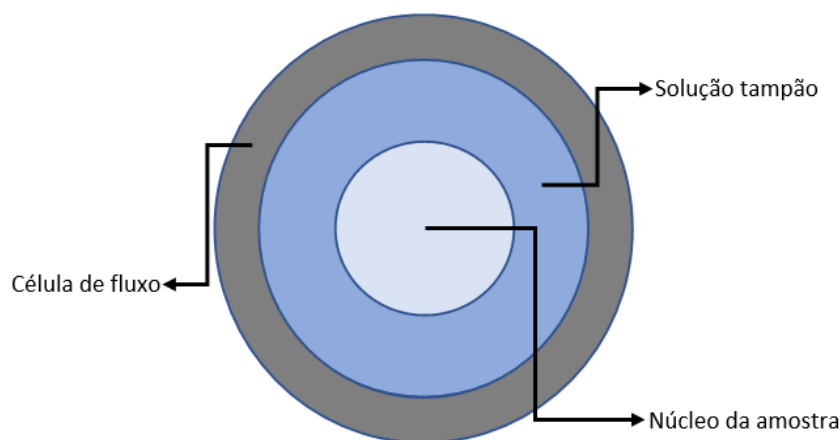
Os detectores no subsistema eletrônico convertem a luz detectada em sinais eletrônicos proporcionais. Os sinais eletrônicos são então digitalizados, processados e enviados ao computador como dados numéricos e, com isso, as informações de cada célula ou partícula são armazenadas no computador e plotadas em gráficos para serem analisadas posteriormente.

Capítulo 2

Fluídica

As principais funções do sistema fluídico são transportar partículas em um fluxo contínuo em direção ao feixe de luz para interrogação e posicionar o núcleo do fluxo, onde encontra-se a amostra, no centro do fluxo. Através do foco hidrodinâmico, o núcleo da amostra pode ser mantido dentro do centro do fluido numa câmara chamada de célula de fluxo, onde será o ponto de interceptação ou interrogação da amostra pelo raio laser. Há um outro fluido, que é geralmente uma solução tampão (*sheath fluid*), que envolve o núcleo onde passa a amostra e, se não houver nenhuma perturbação neste fluxo, ambos os fluídos não se misturam à medida que passam pela célula de fluxo (Figura 1).

Figura 1. Esquema de uma célula de fluxo em corte transversal.

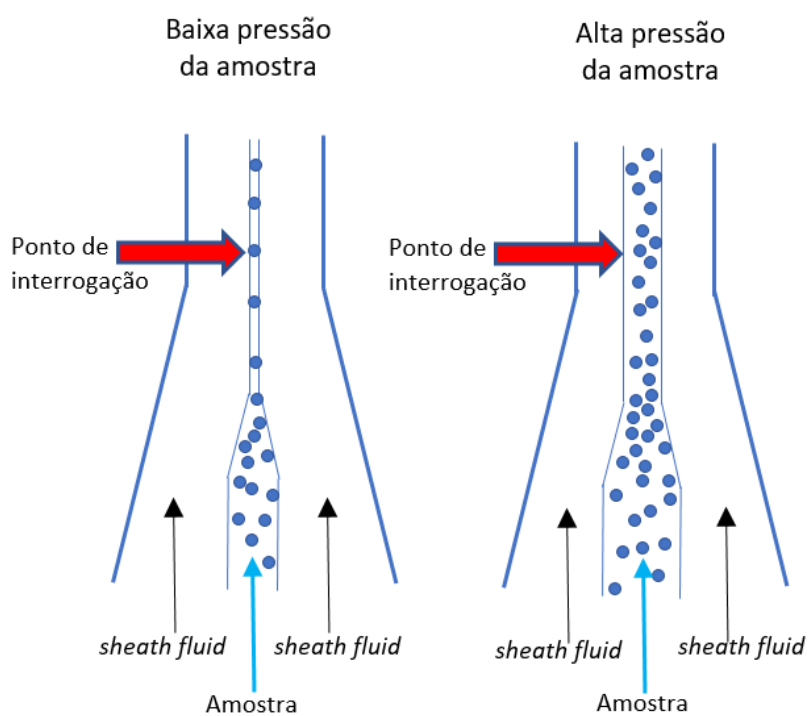


Tipicamente, o *sheath fluid* é direcionado através da câmara de fluxo pela pressão do ar fornecida por um compressor. A mesma pressão é usada para forçar a amostra para dentro do fluxo. A taxa do fluxo da amostra é controlada por um regulador de pressão que pode variar conforme a configuração estabelecida pelo operador do equipamento no momento da aquisição da amostra que, geralmente, pode ser de baixa, média ou alta intensidade. Uma válvula controla se a amostra está sendo introduzida ou não no sistema, sendo que em alguns citômetros, a amostra é introduzida por meio de uma bomba de seringa.

A diferença de pressão do fluxo da amostra influencia diretamente na taxa dos eventos interceptados pelo raio laser no ponto de interrogação. Uma maior pressão gera um núcleo de amostra mais amplo, o que pode aumentar a taxa de eventos, pois permite que mais células entrem no fluxo dentro de um determinado momento. E neste caso, algumas células podem passar pelo raio laser fora do centro e interceptá-lo em uma intensidade de excitação menor que a ideal, podendo com isso diminuir a resolução dos dados. As configurações de pressão da amostra são ajustáveis e conforme se alterna entre baixa, média e alta pressão, a largura do núcleo da amostra

aumenta ou diminui e a taxa de eventos que passam pelo ponto de interrogação por segundo também sofre tal alteração. Quando a pressão da amostra é baixa, o fluxo da amostra é estreito e a taxa de eventos é baixa. Quando a pressão da amostra é aumentada, o fluxo da amostra aumenta e a taxa de eventos também (Figura 2). Isso irá influenciar em um aumento ou diminuição de variação nos dados que serão exibidos nos gráficos de citometria.

Figura 2. Esquema didático de uma célula de fluxo e de como a diferença de pressão imposta ao fluxo da amostra influencia no diâmetro do núcleo da amostra e em sua taxa de eventos.

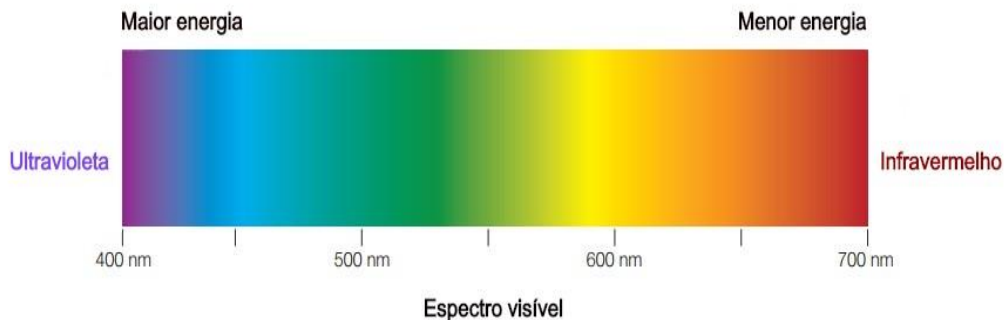


Capítulo 3

Óptica

Antes que o sistema óptico de um citômetro de fluxo seja apresentado, há a necessidade de se entender, pelo menos, de forma básica algumas propriedades da luz e dos corantes fluorescentes. A luz é uma forma de energia eletromagnética que viaja em ondas e que possui uma frequência e um determinado comprimento que irá determinar sua cor. A luz que pode ser visualizada pelo olho humano representa uma faixa estreita de comprimento de onda (380-700 nm) entre radiação ultravioleta (UV) e infravermelha (IR) (Figura 3). O espectro visível pode ser subdividido em cores como o violeta, azul, verde, amarelo, laranja e vermelho. A luz violeta possui um comprimento de onda mais curto e com maior energia, enquanto a luz vermelha possui um comprimento de onda mais longo e com menor energia. Estas características inerentes ao espectro eletromagnético da luz são o ponto central da tecnologia utilizada no sistema óptico de um citômetro de fluxo.

Figura 3. Espectro eletromagnético.



As principais propriedades de um corante fluorescente, também chamado de fluoróforo ou fluorocromo, aplicadas à CF, são seu espectro de excitação e seu espectro de emissão. Os fluoróforos fazem parte de um grupo de moléculas que ao entrarem em contato com a luz de um determinado comprimento de onda específico, absorvem energia e emitem a luz em outro determinado comprimento de onda maior (com menor energia). Esses dois processos são chamados de excitação e emissão, respectivamente. Os corantes fluorescentes são usados para detectar a expressão de moléculas celulares, como proteínas ou ácidos nucleicos. A emissão segue a excitação de forma extremamente rápida, geralmente em nanossegundos e é conhecida como fluorescência.

O objetivo de um marcador fluorescente, como um anticorpo conjugado a um fluoróforo, é de se ligar diretamente a uma região específica (epítopo) de uma molécula presente em uma determinada população celular e permitir que suas propriedades biológicas e bioquímicas sejam medidas. Os fluoróforos conjugados a anticorpos podem ser simples ou compostos (*Tandem Dyes*), sendo este último constituído por dois fluoróforos acoplados. Quando o primeiro fluoróforo é excitado, sua energia é transferida para o segundo fluoróforo, ativando-o e produzindo a emissão de fluorescência numa escala de comprimento de onda ainda maior do que a emitida somente pelo primeiro. Esses fluoróforos *Tandem* foram desenvolvidos no intuito de aumentar as opções disponíveis para analisar mais moléculas simultaneamente. Na tabela abaixo, seguem alguns dos principais fluoróforos utilizados em CF.

Alguns dos fluoróforos mais usados em citometria de fluxo.

Fluoróforo	LASER (excitação)	Pico de emissão
Pacific Blue	405	455
Brilliant Violet 510	405	510
Krome Orange	405	528
Alexa Fluor 488	488	519
FITC	488	519
PE	488/532/561	578
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	661
Alexa Fluor 647	633/638	668
Alexa Fluor 700	633/638	719
APC/Cy7	633/638	785

Uma consideração ao se realizar ensaios de fluorescência multicolorida é a possibilidade de sobreposição espectral (*overlap*) entre fluoróforos. Como os fluoróforos usados na CF emitem fótons de múltiplas energias e comprimentos de onda, um método matemático chamado de compensação foi desenvolvido para que se possa identificar a medição dos fótons de um fluoróforo nos vários detectores, separando cada faixa de fluorescência específica detectada de cada fluoróforo nos diferentes detectores. Devido à natureza das medições de CF, a emissão de uma partícula é medida não em um único detector, mas em todos os detectores usados no experimento. Por exemplo, o FITC emite fótons verdes, amarelos e laranja, todos os quais podem ser detectados num equipamento com múltiplos detectores. Em alguns experimentos, o FITC (isotiocianato de fluoresceína) pode ser combinado com outros fluoróforos, como por exemplo PE (ficoeritrina), que emite fótons amarelos e laranja. Nesses casos, a contribuição relativa de cada fluoróforo para o sinal em um determinado detector deve ser especificamente determinada e descontados os sinais sobrepostos.

Para que a compensação seja realizada com êxito, recomenda-se a utilização de amostras de células marcadas

individualmente com cada fluoróforo que será utilizado na análise. Estas amostras, denominadas de controles de compensação, devem ser adquiridas antes das amostras experimentais marcadas com múltiplos fluoróforos. Através destas 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 devam estar alinhados. Este processo pode ser realizado manualmente pelo operador ou de forma automática pelos softwares encontrados nos citômetros mais modernos. Após a compensação de cada fluoróforo, as amostras podem ser então adquiridas e analisadas sem que haja sobreposições de sinais de fluorescência.

Quanto ao sistema óptico propriamente dito de um citômetro de fluxo, o mesmo executa duas funções: a excitação e a coleta da luz emitida após a excitação da amostra. Feixes de laser são direcionados através de prismas e lentes para excitação dos componentes que passam pelo núcleo da amostra na célula de fluxo. A luz frontal dispersada (do inglês, *forward scatter* ou FSC, que remete ao tamanho da célula) é coletada por um detector de estado sólido e a luz

dispersada lateralmente (do inglês, *side scatter* ou SSC, que remete a granulosidade ou complexidade interna da célula) (Figura 4) e os demais comprimentos de onda da fluorescência emitida pela excitação da amostra são encaminhados através de cabos de fibra óptica e passam por filtros e espelhos que permitem a transmissão específica de determinadas faixas de comprimentos de onda a serem coletados por uma série de detectores apropriados, geralmente do tipo PMT (fotomultiplicador).

Com isso, podemos separar os componentes de excitação que trabalham para guiar os feixes de laser para o fluxo de amostra e os componentes de coleta que encaminham, filtram e coletam a luz dispersada e cada faixa de comprimento de onda específica emitida pela amostra interrogada na célula de fluxo (Figuras 5 e 6).

Figura 4. Esquema didático de como a luz é dispersada remetendo as informações morfológicas de uma célula através de suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

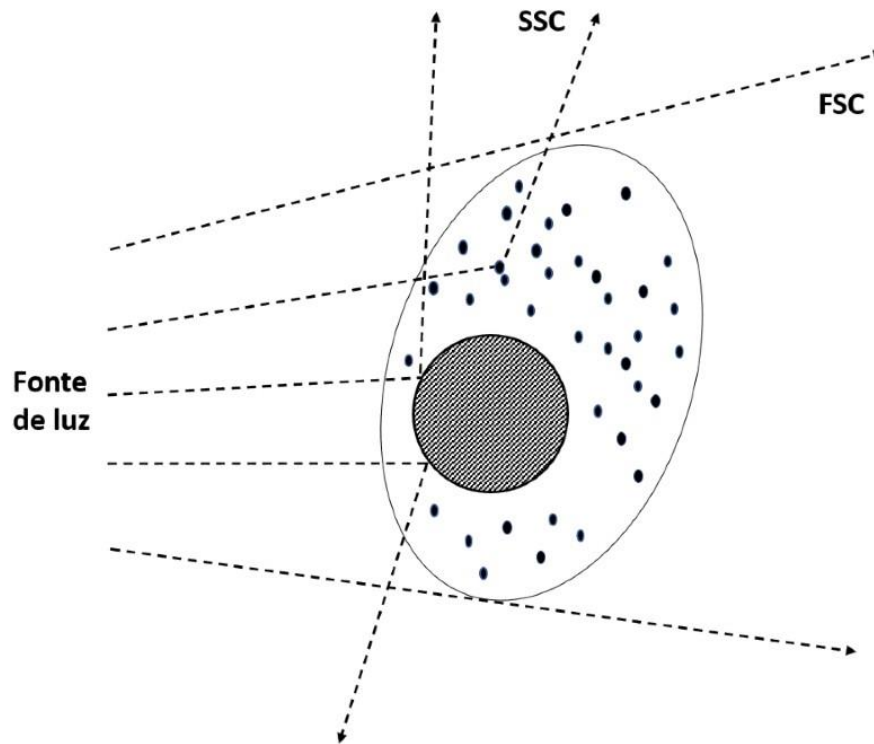


Figura 5. Imagem real do interior de um citômetro de fluxo onde são apresentados os componentes de excitação, a célula de fluxo e o detector de FSC.

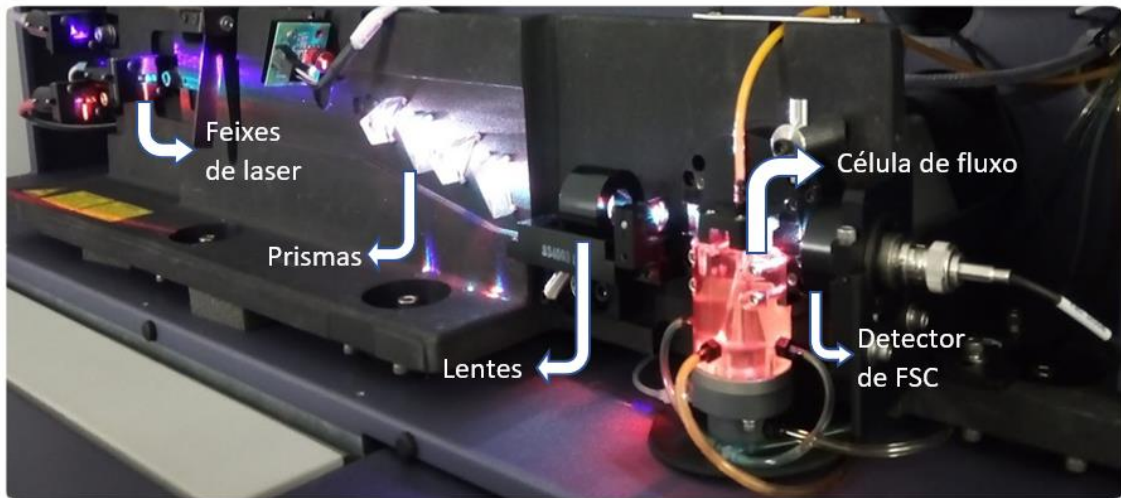
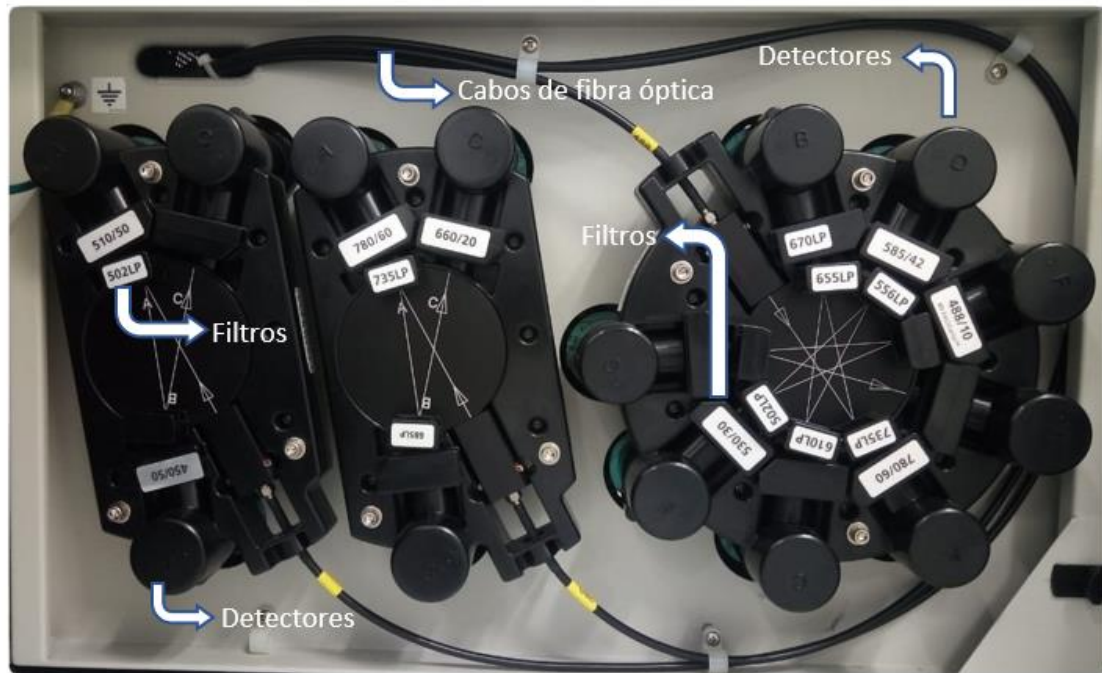


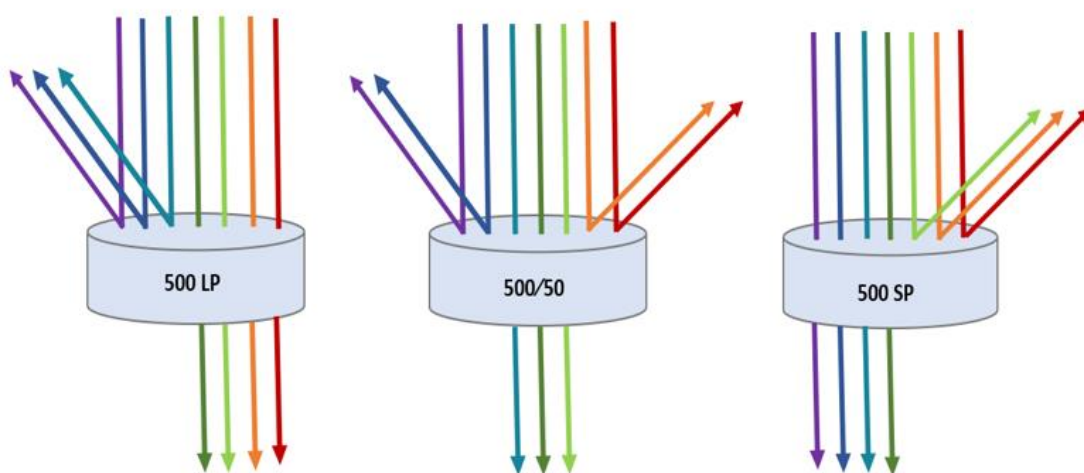
Figura 6. Imagem real da parte interna de um citômetro de fluxo onde se encontram os componentes de coleta da luz dispersada lateralmente (SSC) e dos demais comprimentos de onda da fluorescência emitida pela excitação da amostra.



Desta forma, a luz fluorescente emitida é coletada por lentes em posições apropriadas e, em seguida, direcionada através de cabos de fibra óptica para um conjunto de filtros e detectores ópticos específicos. No exemplo dos componentes de coleta do citômetro da Figura 6, os sinais resultantes do interrogatório do laser azul são transmitidos para detectores em uma matriz em formato octogonal de maneira que na frente de cada detector existam filtros posicionados que refletem e transmitem comprimentos de onda específicos, garantindo que os comprimentos de onda mais altos e com menor energia sejam transmitidos para o primeiro tubo PMT, enquanto comprimentos de onda inferiores e com maior energia sejam refletidos e enviados para o detector subsequente e assim por diante. No mesmo exemplo da Figura 6, além dos detectores do laser azul, há outras duas matrizes de detecção em forma triangular que funcionam da mesma maneira que a matriz octogonal e que coletam a luz oriunda da excitação dos lasers vermelho e violeta. Contudo, há no mercado diversas marcas de citômetros de fluxo com outras configurações de lasers e filtros, bem como outros tipos e tecnologias de detecção.

Com relação aos tipos de filtros posicionados antes dos detectores PMT, os mesmos podem ser classificados de três formas. Podem ser do tipo *longpass* (LP), *bandpass* e *shortpass* (SP). Os filtros *longpass* permitem a passagem da luz de comprimento de onda igual ou superior ao valor especificado. Os filtros *bandpass* transmitem luz ao redor do primeiro valor e dentro da faixa especificada pelo segundo valor (por exemplo, o filtro *bandpass* 500/50 permite a passagem da luz de comprimento de onda entre 475 e 525 nm). Já os filtros *shortpass* transmitem a luz igual ou menor que o comprimento de onda especificado (Figura 7).

Figura 7. Esquema didático dos filtros *longpass* (LP), *bandpass* e *shortpass* (SP), em ordem da esquerda para direita, e de como exercem a filtração do espectro de luz em um citômetro de fluxo.

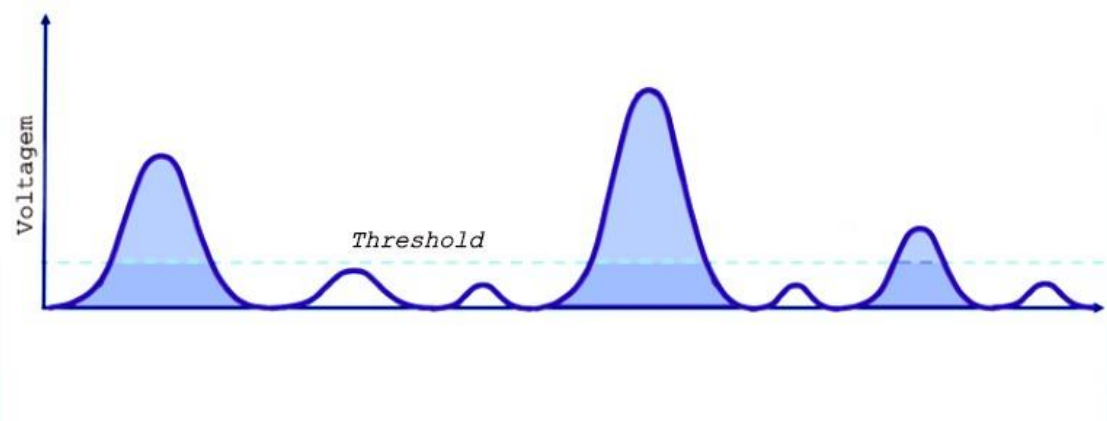


Capítulo 4

Eletrônica

As principais funções do sistema eletrônico são converter sinais de luz em dados numéricos e eliminar pequenos eventos de sinal como ruídos eletrônicos e *debris* através do uso de um *threshold*, que é uma espécie de limiar ou região de corte de dados não relevantes para aumentar a expressão e a chance de encontrar as células ou partículas que realmente interessam para a análise. Um *threshold* é definido em um, ou possivelmente em dois parâmetros, de modo que uma célula seja detectada apenas quando o sinal subir acima desse nível especificado (Figura 8).

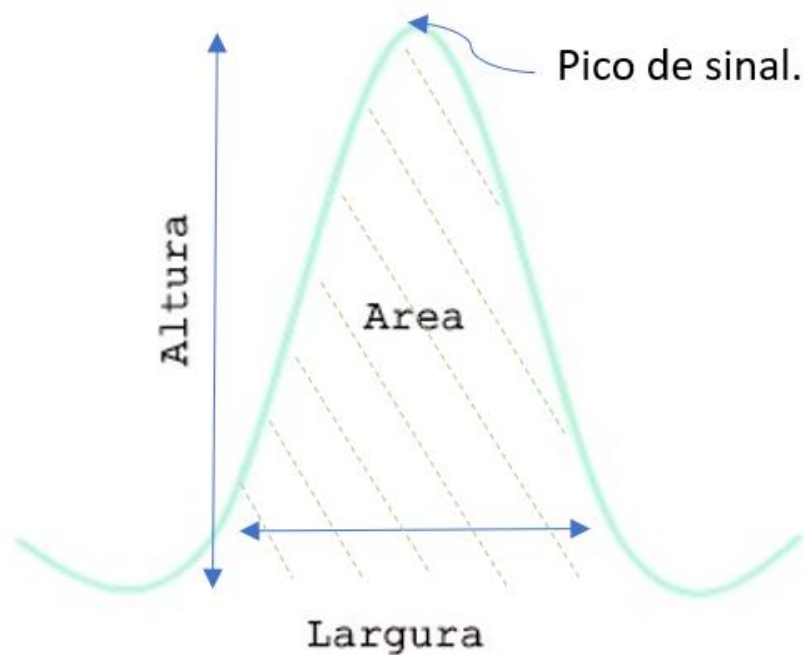
Figura 8. Gráfico representativo de como funciona um *threshold*. Somente os valores acima da linha tracejada são gravados pelo computador e considerados para a análise.



Para que a luz detectada seja convertida em dados, são necessários três componentes: fotodetectores (PMTs), amplificadores e processadores de sinais. Os componentes eletrônicos trabalham em sequência para converter luz em corrente, corrente em voltagem e voltagem em dados que possam ser analisados posteriormente.

Fotodetectores são sensores de luz que podem detectar fótons de luz. Os fótons recebidos fazem com que os fotodetectores produzam corrente elétrica. Os amplificadores convertem a corrente elétrica dos fotodetectores em voltagens maiores em magnitude do que a corrente elétrica de entrada. Já os processadores de sinais quantificam os pulsos de tensão, fornecendo valores numéricos para o sinal. À medida que a célula ou partícula passa pelo feixe de laser, ela gera um pulso de sinal, que possui altura (pico), largura e uma área integral que é proporcional à fluorescência total da célula ou partícula (Figura 9). A largura é proporcional ao tempo que as células gastam no laser e pode ser usada para distinguir entre partículas únicas ou partículas em duplas (*doublets*) ou mesmo pequenos grumos celulares.

Figura 9. Esquema didático representativo de um pulso de sinal de um único evento.



A magnitude da corrente gerada é proporcional ao número de fótons que atingem o fotodetector e, portanto, também é proporcional à intensidade do sinal de dispersão ou fluorescência gerado pela partícula. À medida que a partícula entra no ponto do feixe de laser, o sinal gerado no PMT começará a subir, atingindo o pico de saída quando a partícula está localizada no centro do feixe de laser. Nesse ponto, a partícula está totalmente iluminada (os fótons estão na densidade mais alta no centro do foco do raio laser) e produzirá uma quantidade máxima de sinal óptico. À medida

que a partícula flui para fora do raio laser, o sinal retornará à linha de base. Esta geração de pulso é denominada de "evento" (Figura 9). O somatório de todos os eventos adquiridos de uma amostra irá compor os gráficos de citometria.

Uma vez finalizada a aquisição das amostras de um determinado experimento, os dados recebidos e armazenados pelo computador permitirão a análise estatística e a exibição gráfica dos resultados. Todos os dados armazenados de diversos experimentos subsequentes podem ser convertidos em arquivos específicos (como arquivos FCS, por exemplo) para que seja realizada uma análise posterior mais completa em softwares específicos de análise de dados.

Capítulo 5

Análise dos Dados

Antes de discorrermos de forma básica sobre como são analisados os dados gerados por um citômetro de fluxo, apresentaremos os principais controles internos que devem ser utilizados em uma análise por CF. Pois, além dos controles experimentais específicos para cada tipo de pergunta científica, os chamados controles internos de citometria são de vital importância para que haja uma confiabilidade nos resultados obtidos, já que em CF trabalhamos sempre com comparações.

E é exatamente por isso que precisamos de um controle não marcado (*unstaining control*) feito com células não marcadas com corantes fluorescentes para se avaliar a autofluorescência das células e para definir exatamente onde termina a população negativa e onde começa a população positiva num gráfico de citometria. Também são necessários os controles de compensação, como já mencionado anteriormente; e nas análises de imunofenotipagem, além dos demais controles, os controles isotípicos (*isotype controls*) também devem ser utilizados para que se possa observar

possíveis deslocamentos do espectro negativo quando são adquiridas amostras com marcações positivas.

Sendo assim, o controle isotípico é essencial para verificar possíveis ligações inespecíficas. Pois, os anticorpos utilizados para a imunofenotipagem, além de se ligarem com alta afinidade ao seu alvo específico, também podem se ligar de maneira inespecífica a outros tipos de receptores presentes na superfície de determinadas populações celulares e também a componentes intracelulares ou restos celulares comuns em processo de morte celular. Desta forma, o controle isotípico consiste em um anticorpo não relacionado (anti – “qualquer outra coisa”), porém do mesmo isotipo do anticorpo de referência (IgG1a ou IgG2b, por exemplo) e conjugado ao mesmo fluoróforo que tal anticorpo.

Dito isso, fótons são gerados quando células ou partículas passam pelo ponto de interrogação na célula de fluxo e são interceptadas pelo laser. Os sinais de luz são convertidos em sinais eletrônicos equivalentes e depois processados e convertidos em valores numéricos. Quanto maior o sinal, maior o número dos dados armazenados pelo sistema computadorizado do citômetro de fluxo.

Quando o computador salva os dados, eles são salvos como uma lista. Os valores numéricos para cada célula são medidos e os dados salvos podem ser exibidos em diferentes tipos de gráficos. Por exemplo, dois parâmetros de intensidade de fluorescência são plotados um contra o outro num gráfico de dispersão (*dot plot*), sendo o valor para o fluoróforo PE no evento 1 de 300 e o valor para o fluoróforo FITC de 550. Isso representa que será mapeado no gráfico nas coordenadas 300 do eixo y e 550 no eixo x. Para o evento 2, o valor para PE é de 9500 e para FITC de 12500. A Figura 10 demonstra como estes dois eventos ficariam representados no gráfico. Após, muitos eventos serem processados, todos são representados juntos e cada população começa a surgir no gráfico (Figura 11).

Figura 10. Gráfico demonstrativo de apenas dois pontos numéricos convertidos pelo sistema eletrônico que representam dois pulsos únicos de sinal, ou seja, dois únicos eventos (duas células que passaram pelo ponto de interrogação no feixe do laser).

Evento	FSC	SSC	FITC	PE
1	50	130	550	300
2	150	71	12500	9500
3	579	128	1100	390
4	345	200	998	667

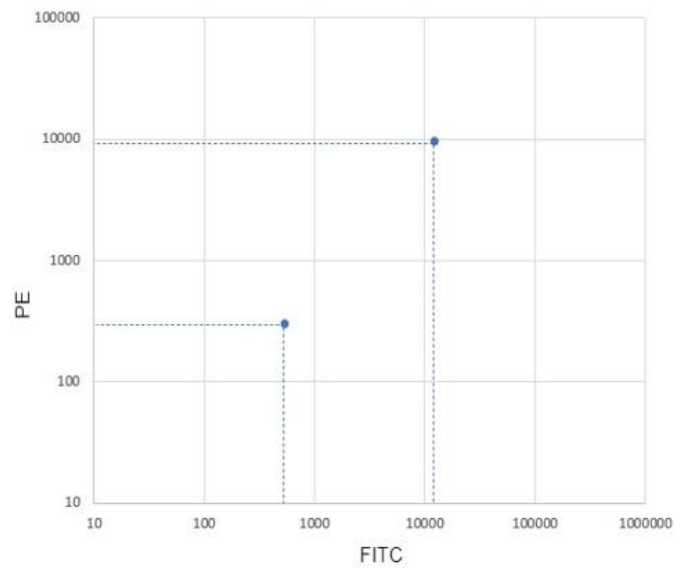
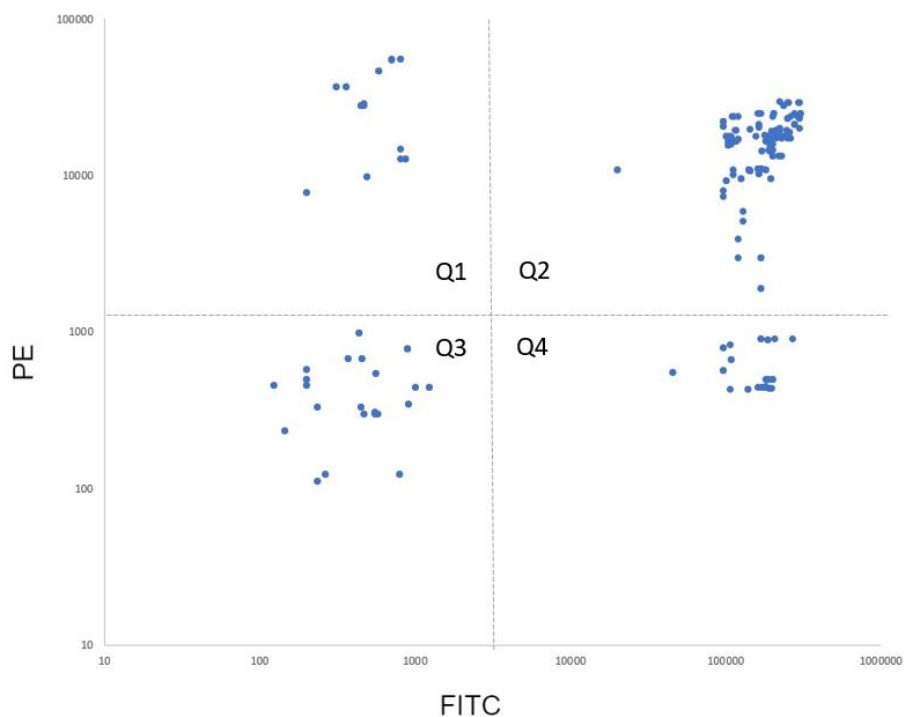
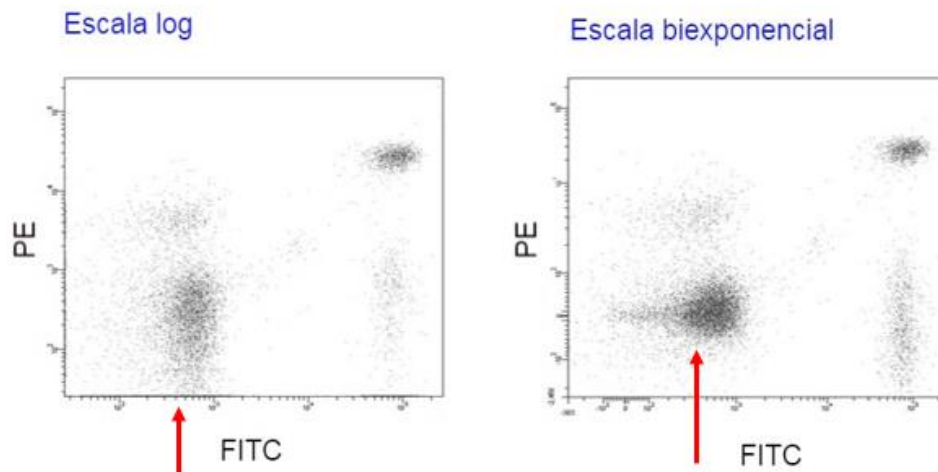


Figura 11. Exemplo de um gráfico de citometria (*dot plot*) onde cada ponto no gráfico representa o valor numérico da intensidade de fluorescência de dois parâmetros ao mesmo tempo (de PE e de FITC). O gráfico foi dividido em quatro quadrantes que representam a positividade ou não de ambos os fluoróforos. Onde Q1 = PE+/FITC-; Q2 = PE+/FITC+; Q3 = PE-/FITC- e Q4 = PE-/FITC+. Lembrando que em citometria de fluxo, todos os resultados são comparativos e dependentes do aumento ou diminuição da voltagem e/ou ganho do sinal eletrônico através de comandos dados ao computador pelo operador no momento da análise, o que influenciará diretamente na visualização dos resultados nos gráficos. Portanto é imprescindível que se use controles internos de citometria para se estabelecer onde o sinal realmente é negativo e positivo e também se possa compensar os dados antes da aquisição das amostras.



Os dados podem ser exibidos com diferentes opções de escala. Tradicionalmente, os dados da citometria de fluxo são exibidos em escala logarítmica (log) ou em escala linear, dependendo do tipo de amostra que se irá analisar. Por exemplo, se numa amostra heterogênea há tipos celulares com morfologias muito distintas entre si, provavelmente a escala log se enquadraria melhor para visualização de todas as populações no gráfico. No entanto, mesmo assim os dados gerados em um instrumento digital e exibidos em escala log podem não ser capazes de mostrar todos os dados de maneira ideal, porque alguns deles podem cair exatamente sobre o eixo ou abaixo do mesmo. Neste caso, pode-se mudar a escala de log para biexponencial, fazendo com que eventos que estavam “escondidos” apareçam no gráfico e possam ser analisados sem que haja alguma perda de informações (Figura 12).

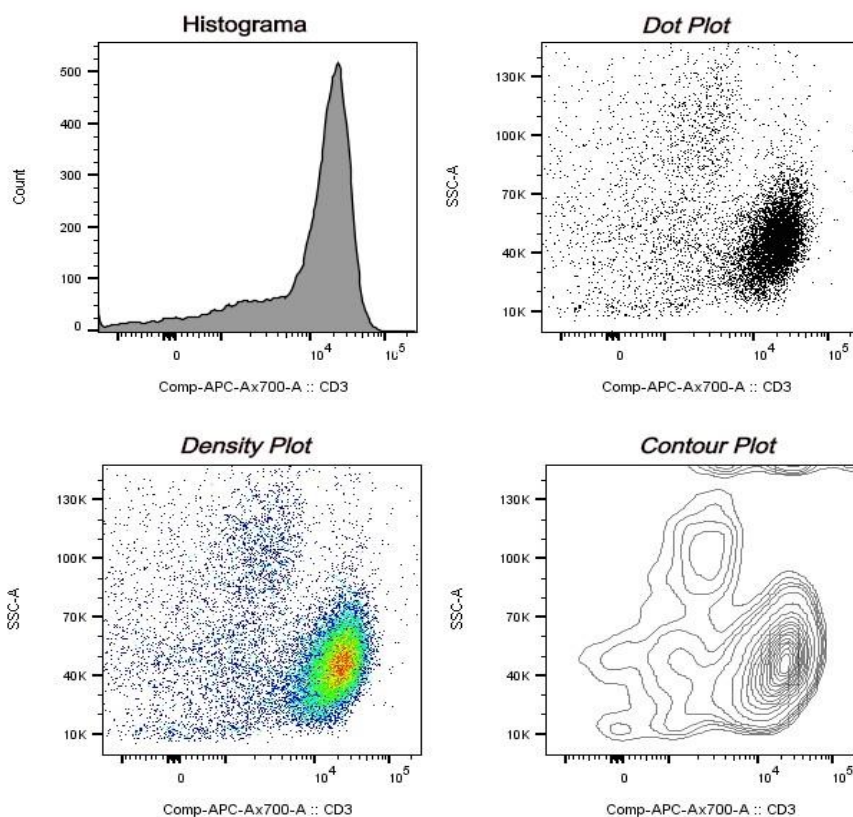
Figura 12. Demonstração dos mesmos dados em um gráfico na escala log e em um gráfico na escala biexponencial.



Há quatro principais tipos de gráficos que representam dados de citometria, são eles: histograma, *dot plot*, *density plot* e *contour plot* (Figura 13). O histograma representa um único parâmetro comparado ao número de seus eventos (quantidade). Os eventos com maior intensidade de sinal ou fluorescência aparecem mais a direita do eixo x. O *dot plot* representa dois parâmetros simultaneamente e cada ponto que aparece no gráfico indica um único evento (célula ou partícula). Quanto mais acima no eixo y e mais a direita no eixo x, indica uma maior intensidade de sinal ou fluorescência dos parâmetros representados em cada eixo. O *density plot*, além de apresentar as mesmas características do *dot plot*, dá uma idéia de 3ª dimensão usando diferentes intensidades de cores.

Os eventos que se repetem ou estão muito próximos no gráfico apresentam a mesma cor demonstrando uma maior concentração de eventos que apresentam as mesmas características, ou seja, que fazem parte de uma mesma população. Por fim, o *contour plot*, da mesma forma que o *density plot*, dá idéia de 3º dimensão, só que desta vez, ao contar os eventos, utiliza um formato similar aos mapas topográficos.

Figura 13. Os quatro principais tipos de gráficos que representam dados de citometria (*histograma*, *dot plot*, *density plot* e *contour plot*).

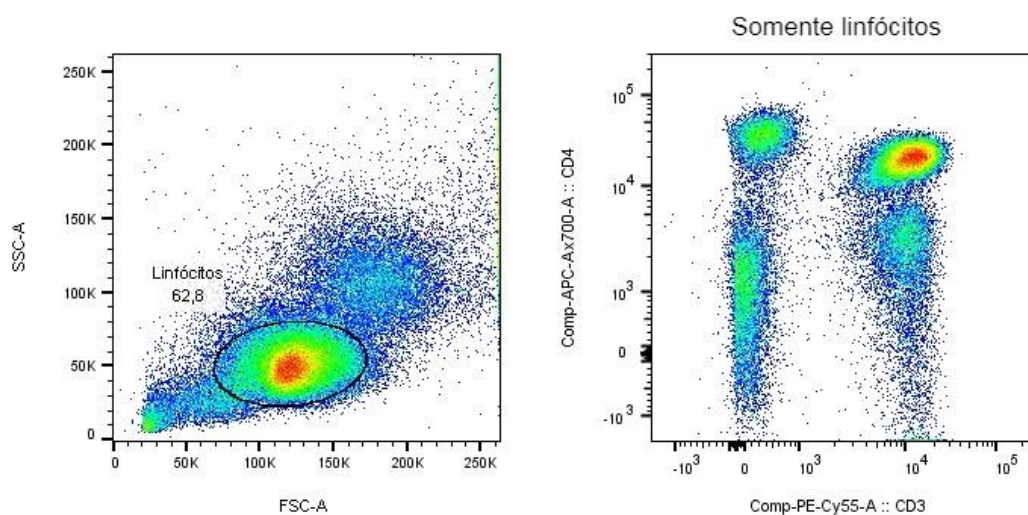


Uma *gate* é um limite numérico ou um conjunto fechado de eventos num gráfico que pode ser usado para definir características a serem incluídas em análises adicionais. As *gates* são usadas para identificar subconjuntos de dados, ou seja, ao adicionarmos uma *gate* em uma determinada população, podemos exibí-la em um outro gráfico com outros parâmetros e realizar outra *gate* dentro da mesma para separar uma outra subpopulação e assim sucessivamente. Podemos ainda gerar estatísticas ou mesmo limitar o número de eventos coletados ou salvos também por meio de *gates*. O exemplo da Figura 14 ilustra uma amostra contendo uma população mista de células sanguíneas, e para restringir a análise apenas aos linfócitos, foi feita uma *gate* na população referente aos linfócitos no gráfico contendo os parâmetros de tamanho versus granulosidade (FSC vs. SSC). Então, num segundo gráfico onde se comparou a fluorescência de dois diferentes fluoróforos ligados a anticorpos contra moléculas de superfície de duas subpopulações linfocitárias, pôde-se separá-las através das diferentes características de intensidade de fluorescência.

Este foi apenas um exemplo dentro de um universo amplo de aplicações. Há inúmeros tipos de análises e também muitos

outros tipos de desfechos a serem analisados dependendo dos objetivos de cada pesquisa. E uma vez realizados todos os ensaios e obtidos os resultados, procede-se à elaboração de gráficos comparativos, tabelas e análises estatísticas mais elaboradas em softwares próprios de análise. Contudo, não iremos entrar em mais detalhes por este não ser o objetivo específico deste livro.

Figura 14. Exemplo de um gráfico de CF de uma amostra mista de células onde se quis restringir a análise somente aos linfócitos ao fazer uma *gate* nesta população. No segundo gráfico optou-se por demonstrar somente a *gate* escolhida e analisá-la através de dois parâmetros de fluorescência distintos referentes a marcadores de superfície específicos para poder separar subpopulações linfocitárias.



Capítulo 6

Sorting

Sorting é uma tecnologia poderosa que separa e distribui populações específicas identificadas por citometria de fluxo em recipientes de coleta designados como tubos, microplacas e lâminas. Células podem ser separadas por *sorting* para enriquecimento de uma determinada população de interesse ou para clonagem celular por meio da separação de uma única célula por cavidade de uma microplaca. As células separadas por este processo também podem ser analisadas por microscopia, podem ser utilizadas para extração de DNA e analisadas por biologia molecular, podem também ser cultivadas e posteriormente analisadas em testes *in vitro* para diversos tipos de pesquisas como em estudos de novas drogas e estudos com células tronco, entre muitas outras aplicações.

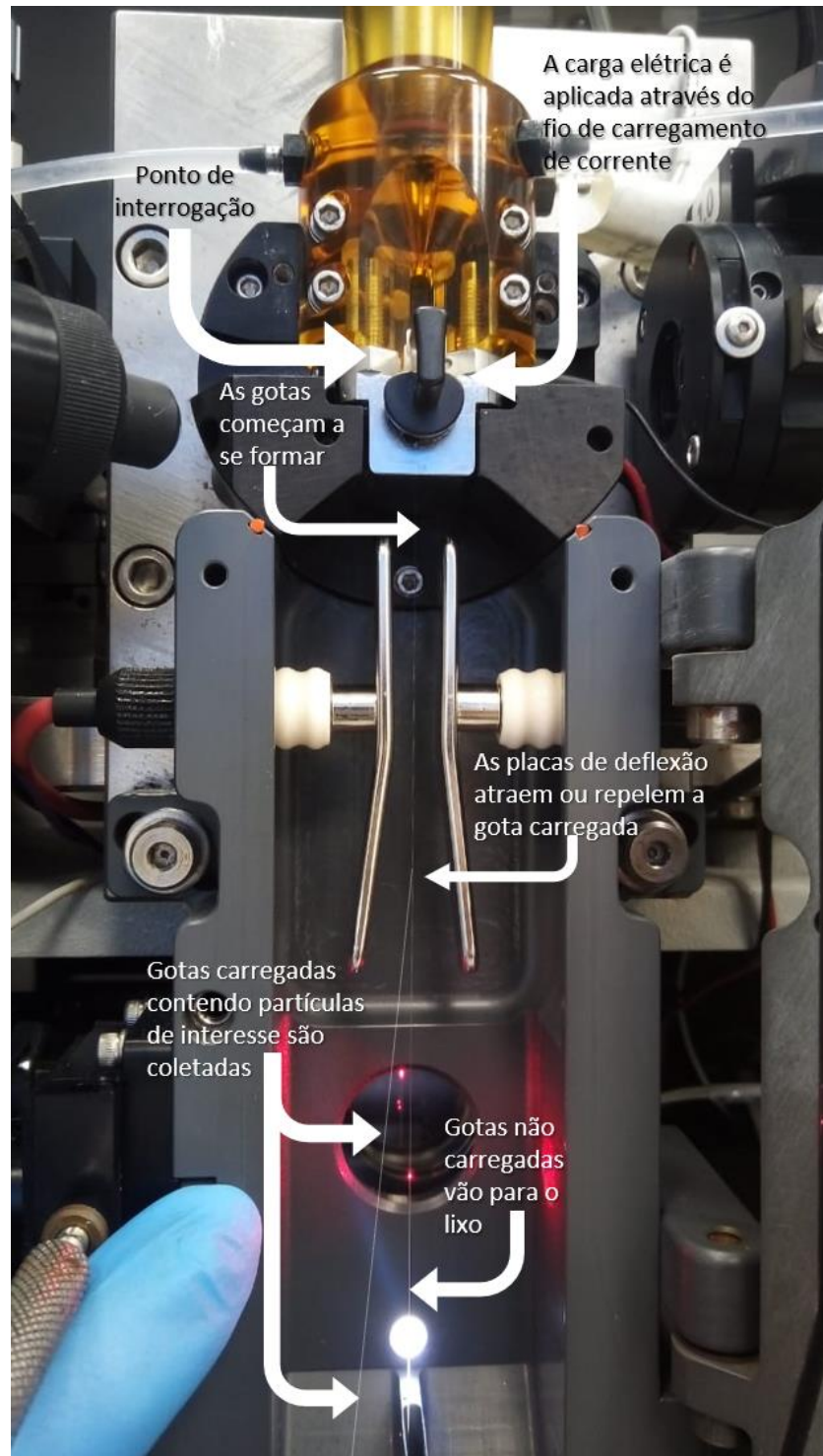
As populações de Interesse a serem separadas por *sorting* devem ser identificadas usando análises citométricas tradicionais de forma idêntica à realizada em citômetros analíticos. Portanto, deve-se adquirir a amostra, elaborar os gráficos, realizar compensação (caso necessária) e proceder à elaboração das devidas *gates* para identificação das populações de interesse. Desta forma, as células ou partículas

passam uma por uma pelo feixe de laser para interrogação. Então, através de procedimentos prévios específicos de configuração do citômetro para estabilização da pressão indicada para a faixa de tamanho das células, geração de carga elétrica aplicada ao fluxo e formação e estabilização de gotas após a passagem pela célula de fluxo; o equipamento irá proceder de tal maneira que apenas a gota que contém a partícula de interesse irá reter a carga recebida e à medida que as gotículas passam entre duas placas de deflexão, apenas as gotículas carregadas são desviadas e separadas em recipientes de coleta. Já as gotículas não carregadas passam para o aspirador de resíduos e são descartadas (Figura 15).

A decisão sobre se uma célula deve ou não ser separada por *sorting* é tomada quando passa pelo feixe de laser. E para garantir que a célula de fluxo seja carregada no momento correto, o atraso de tempo entre uma partícula que passa no feixe de laser e o ponto de interrupção da gota deve ser determinado e alimentado no computador que, então, irá tomar a decisão do que será separado ou não de forma automática. Ocasionalmente, haverá mais de uma célula nas gotículas desviadas. O circuito eletrônico pode detectar essas

coincidências e, dependendo da escolha de qual tipo de *sorting* se deseja realizar através de comandos previamente executados no computador, seja para uma alta pureza ou um alto rendimento, a decisão de exclusão ou separação das gotas será diferente e aplicada pelo software para cada realidade. Se a intenção for um maior rendimento, todas as gotas contendo as células de interesse serão separadas, mesmo que eventualmente haja uma certa “contaminação” com outros tipos celulares. Caso a intenção seja uma maior pureza, serão separadas unicamente as gotas que tenham células da população de interesse, e caso na mesma gota ou em gotas muito próximas haja outros tipos celulares, ambas as gotas serão excluídas. Portanto, deve-se definir previamente o objetivo do *sorting*, pois disso dependerá o sucesso de seus resultados.

Figura 15. Imagem real da célula de fluxo e dos componentes de separação celular de um citômetro *Cell Sorter*.



Agradecimentos

À Dra Alessandra Aguiar e à Dra Priscila Hiraiwa por me apresentarem à esta tecnologia fascinante, além de me treinarem na operação dos equipamentos. Aos meus pais Jorge e Lêda por terem construído as bases para eu chegar até aqui. À minha esposa Tatiana e minha filha Sophia por serem meu mundo. Aos meus sogros Tancredo e Lenise pela amizade e paciência enquanto hóspedes em minha residência no período de elaboração deste manuscrito. Aos demais familiares e amigos por de um jeito ou de outro fazerem parte da minha vida e, conseqüentemente, acrescentarem experiências, emoções e aprendizados. Por fim, e o mais importante, a Deus pelo dom da vida.

A citometria de fluxo é uma tecnologia que cada vez mais tem se destacado no laboratório clínico e de pesquisa sendo responsável por diversos avanços na ciência. Sua aplicação não se limita a uma única área do conhecimento, podendo ser empregada nas áreas de imunologia, hematologia, genética, biologia celular, microbiologia, parasitologia, oceanografia, em estudos de novos medicamentos e de terapias com células tronco, entre muitos outros. Baseia-se na mensuração dos parâmetros morfológicos e funcionais de células, por meio da detecção da dispersão da luz e da emissão da fluorescência de corantes ligados à superfície ou ao interior dessas células, quando são interceptadas por uma fonte luminosa, como um laser. Sua capacidade para analisar diversos parâmetros simultaneamente em uma única célula, torna a citometria de fluxo no método de escolha para análises multiparamétricas de populações celulares. Além de ser uma técnica também aplicada na separação ou purificação de uma determinada população celular a partir de uma suspensão heterogênea, processo denominado de sorting. Por ser uma metodologia com todas estas importantes características e abrangência de aplicações e, ao mesmo tempo, carecer de manuais mais básicos e introdutórios escritos em língua portuguesa; este pequeno livro veio para suprir esta lacuna e tentar ajudar estudantes de graduação e pós-graduação, bem como cientistas que não terão que operar diretamente um citômetro de fluxo, mas precisarão de um conhecimento básico na leitura de artigos que apresentem resultados desta técnica, além de uma orientação inicial se precisarão utilizá-la ou não no andamento de suas pesquisas.



Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO (2001), Especialista em Análises Clínicas pela Fundação Técnico-Educacional Souza Marques (2003) e Mestre em Ciências pela Escola Nacional de Saúde Pública/ Fundação Oswaldo Cruz (2006). Autor e coautor de artigos científicos e diversos resumos publicados em anais de congressos científicos. Tem cerca de 18 anos de experiência em sua área de formação atuando em controle de qualidade, pesquisa e saúde pública. Há mais de 3 anos tem trabalhado com citometria de fluxo em dedicação exclusiva.