

---

**Ciências Biológicas**

---

**Ives Bernardelli de Mattos**

**Aplicabilidades da metodologia de Citometria de Fluxo**



Rio Claro  
2009

Ives Bernardelli de Mattos

**Aplicabilidade da metodologia de Citometria de Fluxo**

Orientador: HÉRCULES MENEZES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado.

Rio Claro  
2009

574.29 Mattos, Ives Bernardelli de.  
M444a Aplicabilidades da metodologia de citometria de fluxo / Ives  
Bernardelli de Mattos. - Rio Claro : [s.n.], 2009  
31 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas) - Universidade  
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Hércules Menezes

1. Imunologia. 2. FACS. 3. Citometria de fluxo. I. Título

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP  
Campus de Rio Claro/SP

## **Agradecimentos**

Existem muitas pessoas que precisam ser lembradas. Não quero me ater apenas às pessoas que permitiram que esse trabalho fosse elaborado, realizado e concluído, mas quero também incluir pessoas que me forneceram qualquer tipo de subsídio relevante para que pudesse alcançar essa importante etapa da minha vida.

Quero agradecer primeiramente ao prof<sup>o</sup> Hércules por me abrir as portas, por ajudar na escolha do tema, pela paciência em me explicar as coisas, em me atender e principalmente por me ajudar a fazer com que o trabalho ganhasse forma. Sem a sua ajuda, nada poderia ser concluído.

Agradeço a todo o pessoal do Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro pela hospitalidade e paciência, principalmente a Vânia e ao José Antônio. A primeira por abrir as portas do o instituto e me receber de braços abertos e o segundo por toda a ajuda que me deu, por permitir acompanhar o seu trabalho mais de perto e por estar sempre aberto a explicar as metodologias utilizadas.

Gostaria de agradecer a prof<sup>a</sup> Márcia Regina, por me ajudar no meu amadurecimento como pesquisador, por confiar em mim, por me ensinar e cobrar minha busca por sempre conhecer mais, por ter tido paciência, por ser amiga, por partilhar assuntos variados, das conversas jogadas fora aos mais pessoais, pela preocupação com minha saúde e integridade física, pelos conselhos, por me permitir conhecer inúmeras pessoas como a Danielli, a Débora, a Luana, o Chaud, o Anderson e todo pessoal do departamento e por me mostrar de diversos ângulos o que a vida acadêmica me aguarda. Preciso ainda agradecer a Gi, que me ofereceu a oportunidade de trabalhar com a prof<sup>a</sup> Márcia, sem ela não poderia ter crescido como cresci.

Demorei quatro anos desde que cheguei a Rio Claro para começar a utilizar “a casa dos meus pais” como denominação do local onde morei durante 20 anos. Continuava a chamar esse local de “minha casa” até um pouco mais de um ano atrás, quando conheci minha atual morada. Passei por inúmeras residências, morei com pessoas que não me agregaram absolutamente nada, pessoas que me fizeram involuir em determinados pontos e pessoas que estarão sempre na minha memória. Dentre estas últimas posso citar alguns exemplos, como o

Sombra, por exemplo, que é meu irmãozinho e que me ajudou muito. Esse é um cara especial, companheiro, amigo e que tem um potencial incrível. É um cara a ser conhecido. Outro que posso citar é o Dunha, um dos caras que mais me conheceu na faculdade, homem com quem aprendi a admirar por seus valores e por suas deficiências, um indivíduo completo dotado de uma inteligência sem tamanho. Outro a ser lembrado é o Dinho, um cara com quem dividi inúmeros problemas. Foi uma das pessoas mais difíceis com quem tive que lidar, um cara que me ensinou muitas coisas mesmo sem querer ensiná-las. Por fim, gostaria de lembrar do Bill, um ser dotado de uma inteligência muito grande também, porém diferente da já citada, detentor de um coração que não analisa perdas e ganhos para ajudar os outros, mesmo que o balanço das suas ações sejam deficitárias para ele. Também uma pessoa que foi muito difícil de lidar, mas com o tempo fui aprendendo a respeitar e admirar.

As pessoas com quem dividi meu teto no último ano merecem uma lembrança em especial. É com eles que tenho prazer em dividir meus momentos de paz, alegria, tristeza, sonhos, etc. Pessoas que dividem o meu dia-a-dia e tudo a ele relacionado. Sempre me ajudaram e me deram o suporte para que as negativas fossem superadas e as vitórias fossem apreciadas. Quero agradecer imensamente a vocês: Gaybriel, Jacaré, Miagui, Perdido e Tropeço e os cães Antônio e Ping (que esteja onde estiver contanto que esteja bem). Cada um com seu peso. Foram vocês que me impulsionaram e me deram forças pra seguir em diante. É difícil encontrar pessoas com o valor de vocês.

Foi por causa deles que tive oportunidade de conhecer outras pessoas incríveis e de me relacionar mais intimamente com pessoas que já conhecia. Não lembrarei de todas, mas não quero me furtar de citá-las. Amarílis, Nívea, Nayla, Jaquie, Ítalo, Isa, Cis, Skin (Ives sou eu!), Ângela, Aninha, Edmara, Cynara, Close up, Pataca, Cirilo (meu queridoço), são alguns exemplos.

Outros que faço questão de lembrar foram aqueles que fizeram parte desde o começo da minha graduação até o final dela: Os quatro anjinhos Elise (com quem dancei forró pela primeira vez em solo rio clarense), Ana Laura, Talita e Aline, Rubia (a coneha mais esperta que já conheci), Atum (meu primeiro contato da faculdade e um cara que admiro), Azeitona (meu padrinho), Buda, Pinguim, Curió, CPM 22 (que entrou na MZ comigo), Fred, Matheus, Bixão, Abacaxi, Harry, Pássaro, Itu, Henrique, Rogério da cantina, Cebolinha, Galeano, Sunao, Chal, Hemorróida, Jaú, Gill (vulgo Sei lá), Xaxá, Leandrão, Beliche, entre outros. Essas pessoas que me apresentaram a universidade. Os meus bixos e bixetes: Rosca, Pajé, Iéti, Pâm (uma menina incrível, que bom que ainda tenho oportunidade de investir nessa amizade), Ma-

nu, Taísa, Pereira, Kenny, André, Fii, Confirma, Emígdio, Dom, Bis, Biga, Jay (uma das meninas mais extraordinárias que já conheci), entre vários outros.

Agora, vou abrir espaço para falar das pessoas que me acompanharam desde o começo nessa universidade e ficaram comigo até os dias atuais.

Como falar das pessoas importantes sem citar a Mangá? A menina que sempre esteve ao meu lado, desde o primeiro dia no sujinhos até o último, que não sei bem quando será. Os momentos de confusão, os momentos de paz, os momentos de guerra, os momentos em que o coaxar dos sapos, que tomava conta do ambiente, foi abreviado pela abrupta noção de que estamos em minha casa, proporcionado pela minha geladeira barulhenta, os momentos em que só um olhar bastava, os momentos que só ela resolvia, os momentos de total perda de chão, os momentos de total perda de noção, enfim, ser amigo dessa pessoa foi o maior presente que poderia ter recebido. Acho que você merece muito mais espaço do que este que estou oferecendo, mas você sabe que não conseguiria verbalizar o sentimento que sinto por você. Aprendi muito com ela, e espero poder aprender muito mais, agora com uma nova etapa em nossas vidas.

Minhoca, o cara que me ajudou em inúmeros momentos, que me proporcionou vários momentos de risada e me apresentou muitas pessoas especiais, como o Rui, o Lee, o Fernandes, o Minhoquinha, o Landi, e vários outros que conhecemos pelo caminho, como a inesquecível noite com o Bahia e os vários outros bêbados que conhecemos por aí. Um cara que tenho orgulho de poder considerar como irmão.

O Jap's, um cara inesquecível, que me acompanhou em vários lugares um incontável número de vezes, shows, futebol, videogames, festas, praia, etc. Nunca consegui ouvir um não desse safado.

Paula, que desde o começo da faculdade já me proporcionou vários momentos cômicos. Já passamos dificuldades no começo, já magoei ela inúmeras vezes, já demorei pra pedir desculpas, já deixei de pedir desculpas por vergonha de mim mesmo, já chorei com ela e a sua risada? Essa eu sei de cor. Uma menina incrível, que também possui um coração de fazer inveja. Amiga até nos seus piores momentos. Indescritível estar ao seu lado.

A Mari foi outra. Inexplicavelmente entrou no meu coração de súbito e desde então não quis mais sair. A conheci no meio para o final da faculdade. Que bom que tive essa chance. Como é bom ouvi-la falar de seus questionamentos, de suas vontades, de seus sonhos, de seus momentos hilariantes. Enfim, é uma pessoa muito boa, inteligente e amiga.

A Larinha sempre esteve ali, no cantinho da sala. Foi outra que conheci somente no decorrer do curso. É detentora de um coração gigantesco e que faz o que for preciso para acalmar seus anseios, lutando bravamente pelos animais e mostrando seus ideais não importando com quem está conversando.

O Playmobil foi um cara que conhecia desde antes da faculdade, mas foi aqui que consegui conhecê-lo de verdade. Vimos muitas coisas que até hoje ninguém sabe e não saberão, passamos por dificuldades, rimos das mais variadas coisas e aprendemos muito.

O Latino foi aquele que também nunca consegui ouvir um não, mesmo o mais próximo disso não parecia tanto assim. As comidas bizarras que tentávamos fazer, as idiotices que dávamos risadas, alguns faróis que presenciamos em virtude de climas mais frios, etc. Sem sombra de dúvidas um dos caras mais bonzinhos que já conheci.

O Bill é um cara que merece novamente ser citado. Tive inúmeras discussões com ele. Muitas delas movidas por falhas em ambos os lados. Foi da pior pessoa a um dos meus maiores companheiros. Quando nossa comunicação se reabriu nunca deixou de largar o que fazia para me ouvir. Companheiro, sempre. Aprendi muito sobre convivência com ele.

Charles também foi um dos primeiros que percebi o elevado tamanho de seu coração. Sempre amigo também, divertido e sonhador. A Ina, sua companheira, merece aqui destaque. Foi também no começo uma das pessoas que mais me relacionei. Uma mulher que possui um gênio muito forte e que aprendi muito com ela. Momo foi outro que também me ensinou muito, assim como a Lanterna, a Déa, a Maíra, a Arodí, a Emília, a Lara, e todos os outros que entraram comigo no ano de 2005. Fazendo um balanço, posso afirmar que o que mais fiz nessa faculdade foi aprender.

Cabe ainda citar algumas pessoas que me foram muito importantes e que também merecem ser lembradas: a Rafaella, que conheci nesse último ano e que demonstrou ser uma das amigas que mais posso contar. Possuidora de um carisma inenarrável e que me ajudou em todos os momentos, me ouvindo, dividindo alguns fardos comigo, enfim. Uma pessoa muito especial. O Perdido que teve comigo uma amizade muito oscilante. Um cara que me surpreende pelos seus posicionamentos e por suas características. O Tropeço, com quem desenvolvi uma amizade muito grande a ponto de as vezes não precisar usar palavras para nos comunicarmos. Um cara que me ajudou muito em tudo e que também possui uma índole intocável. O Miagui que nunca deixou de estar ao meu lado qualquer momento que fosse. O Gaybriel que sempre está aí para tudo o que der e vier e a Jó por ter um extremo cuidado com os outros e por me ajudar desde o começo até hoje dando lições de como um ser humano deve ser.

Faltam agora as pessoas que me forneceram a base, que ajudaram a construir meu alicerce: minha família. Aqui não incluo somente meus parentes cosanguíneos, mas também as pessoas que assim considero.

Começo talvez pelas pessoas que me criaram e que me deram os subsídios para ser o que sou. Meus avós. Seu Luiz e dona Maria foram os responsáveis pela criação deste que aqui escreve. Ensinarão-me tudo o que eu precisava saber para encarar uma vida de descobertas. Devo minha vida a eles e serei eternamente grato. Espero poder um dia retribuir tudo o que fizeram por mim.

Meus pais vêm logo em seguida. João e Nereide, as pessoas que permitiram que tudo isso acontecesse que me deram os suportes intelectuais, monetários e físico. Ampararam-me nos meus momentos de fraqueza e nunca desistiram de um plano meu. Pessoas incríveis que merecem meu maior respeito. Sem eles minha vida seria uma eterna busca solitária. Com eles ao meu lado eu posso tudo. Espero poder um dia olhar pra você e ver em seus olhos um misto de orgulho e admiração, estou longe disso, mas no caminho. Devo muito a vocês, meus queridos pais.

Meu irmão Ivan, que sempre foi meu espelho. Sempre foi um indivíduo a servir de base para minhas ações, um humano que parece ter as respostas para minhas perguntas na ponta da língua. Um cara que sabe exatamente como sou e que muito me orgulho de poder ter ao meu lado.

Minha irmãzinha Iris, eternamente minha irmãzinha. Orgulho-me muito de você. Tenho cá pra mim que seu futuro será esplêndido, mas terá muito que caminhar. Fico tranquilo sabendo que poderei sempre estar ao seu lado para ajudá-la nas difíceis rotas a se escolher.

Meus queridos irmãos Caio, Goiaba, Vintão e Amir. Vocês são parte disso sim! Vocês sempre estiveram ao meu lado e nessa minha fase, tornaram-se mais uma vez meu porto-seguro. A vida de vocês permeia a minha assim como sei que a minha permeia a de vocês. Orgulho-me de poder olhar pra trás e ter vocês na minha formação. Poder ver que até hoje vocês fazem parte da minha vida e que futuramente continuaremos a fazer parte uns das vidas dos outros, só que em etapas mais desafiadoras.

Minha querida Yukari, até hoje não sei qual denominação dar-te. Imagino que nunca saberei. Que assim seja então. Ela teve um papel importante em várias etapas na minha vida universitária, tanto antes quanto durante. Deu-me o chão quando este faltou. Trouxe-me a sanidade quando esta já havia há tempos me deixado. Palavras são poucas para mostrar minha admiração por sua pessoa. Nunca consegui de fato agradecer tudo o que você me proporcionou.



nou e tem me proporcionado. Divide o posto de mulher mais especial da minha vida com minha mãe, minha avó e minha irmã. Devo muito a você, minha querida.

Minha querida amiga Danny, que sempre esteve e sempre estará ao meu lado, me fazendo rir, me acompanhando nos nossos programas de índio, me ouvindo, atacando minha rinite com os seus gatos mil, sendo a companheira que nunca me deixou na mão. Aproveito também para agradecer a Ângela e ao Mikio por tudo o que fizeram por mim. No meu primeiro ano de cursinho me dando suporte, ajudando na busca do aprimoramento do meu lado espiritual, do meu lado intelectual, conversando comigo, me convidando para jantar e por me dar suporte em inúmeros momentos.

Meu caro Fabão, que sempre me ouve como nenhum outro jamais conseguiu. Mostrando-me inúmeros pontos de vista e analisando friamente os que já possuía. Uma pessoa que respeito pela sua inteligência, paciência e força.

Meu querido primo Daniel, que me ajudou sempre em todos os meus momentos. Tenho orgulho de poder olhar pra você, dar um beijo em seu rosto, te abraçar e chamá-lo de primo. Você é muito especial.

Não poderia deixar de lembrar das pessoas que mais me ajudaram a alcançar um lugar nessa universidade, depois de meus pais. São pessoas que terão sempre um lugar em meu coração por terem sido tão essenciais na minha formação. Participaram ativamente do processo de seleção, sofreram, e como, comigo, me estendiam a mão quando caía e comigo comemoraram quando consegui enfim chegar aqui. Mariana, Érica, Jaime e Márcia, se estou onde estou, muito se deve a vocês. Vocês que conseguiram isso comigo. Faço questão de dividir esse mérito com vocês também. Não sei se em um momento passado consegui agradecer da maneira como deveria. Não sei se consegui demonstrar minha admiração por vocês, mas é através deste trabalho que eu pretendo imortalizá-la. Todos os que pegarem esse estudo saberão que os citados possuem uma certa “culpa” por tudo o que aconteceu até aqui, mas quero enfatizar a importância que vocês tiveram nisso. Sem vocês, teria desistido. Sem vocês, seria muito mais difícil. Sem vocês, eu não conseguiria. Gostaria de agradecer também aos demais familiares, todos, sem exceção, que me ajudaram e me fizeram acreditar mais em mim mesmo. Muito obrigado.

Aqui, neste trabalho, uma etapa da minha vida se encerra. Sei que muitas outras virão e é com a força de crer num eterno crescimento que pretendo continuar. Mas fico tranquilo, pois sei que sou amparado por essas e por outras pessoas que fazem e farão com que minha vida torne-se cada vez mais prazerosa.

# SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.2. Histórico.....	10
1.3. Funcionamento Básico de um CMF.....	11
1.4. Problemas com as Aplicações.....	13
2. EXEMPLOS DE APLICAÇÕES.....	15
2.1. Proteínas.....	15
2.2. Fagocitose.....	18
2.3. Apoptose Celular.....	18
2.4. Microbiologia.....	20
2.5. Microbiologia Aplicada a Indústria.....	22
2.5.1. Produção Alcoólica.....	22
2.5.2. Indústria de Alimentos.....	23
3. PERSPECTIVAS DAS FUTURAS APLICAÇÕES.....	25
4. CONCLUSÃO.....	26
5. BIBLIOGRAFIA.....	27

## Introdução

Os avanços nas pesquisas realizadas a partir de análises de células individuais, microrganismos pluricelulares e outras partículas biológicas sofreram uma franca evolução. Esse aumento se deve a um importante fator, a popularização de uma consistente técnica, a citometria de fluxo. O citômetro de fluxo (ambos, tanto o termo anterior como o termo citometria de fluxo serão tratados no presente trabalho como CMF), aparelho que permite esse tipo de análise, possui não somente as aplicações já citadas, devem-se incluir no rol de possibilidades qualquer tipo de caracterização que possa ser feita a uma molécula, desde que a mesma possa ser marcada com algum tipo de corante fluorescente, associadas a anticorpos conjugados à fluorocromos ou ainda que contenham genes repórteres fluorescentes como, por exemplo, as *green fluorescent protein* (GFPs) (Arun et al., 2005).

Além da elevada precisão e do seu poder analítico, há uma grande vantagem na sua utilização da ferramenta. O seu processo não é destrutivo as células analisadas, exibindo pouco ou nenhum efeito na sua viabilidade ou função (Ibrahim & van der Engh, 2007), uma das suas desvantagens residem no fato de que há perda da informação histológica quando células esfoliadas são analisadas. Mesmo assim as vantagens ainda são muitas, além disso, existe a praticidade de em alguns casos não haver necessidade de um tratamento anterior, como por exemplo, a CMF de linfócitos em misturas complexas, como nas células do lavado broncoalveolar, são possíveis sem uma prévia separação ou culturas *in vitro* (Pala et al., 2000).

Por razão da sua alta aplicabilidade e excelência nos dados obtidos, houve a popularização desta ferramenta. Isso acabou por influenciar as companhias que o produzem a buscar por aparelhos mais rápidos e que possibilitassem a construção de análises mais ricas, com adição de diversas medidas de parâmetros paralelamente, devido a inclusão de múltiplos lasers com alta sensibilidade e precisão, além de criar sistemas que pudessem facilitar a operação por parte do técnico. A alta demanda pela máquina foi naturalmente acompanhada pela redução do seu preço, talvez devido ao desenvolvimento de novas aplicações dos diodos emissores de luz (LED – *light-emitting diodes*). Com lasers mais econômicos, outros componentes do equipamento podem acompanhar essa tendência. A redução do preço da máquina também pode estar inerentemente associada ao aumento da sua procura por parte de diversas

instituições de pesquisa e laboratórios de diagnósticos. Esses fatos permitiram que a metodologia pudesse ser amplamente divulgada na comunidade científica e sua utilização foi sendo refinada e diversificada, seja pela incorporação de novos e mais eficientes marcadores fluorescentes, ou pela utilização em outras áreas que não as abrangidas até então (Ibrahim & van der Engh, 2007).

Um dos maiores benefícios que a popularização do equipamento em laboratórios de diagnósticos trouxe para a medicina foi a detecção e monitoramento da infecção por parte do vírus da imunodeficiência humana (HIV – *human immunodeficiency virus*) e sua possível evolução para quadros de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS – *acquired immunodeficiency syndrome*). A doença é monitorada pela contagem de células T-helper CD4 (Ibrahim & van der Engh, 2007). Um relatório de 2004 com relação ao diagnóstico do HIV mostra que somente no Brasil existem 85 CMFs e que o preço estimado para a contagem de CD4 por amostra era menor que 5 dólares (Mandy, 2004).

Desde sua criação até os dias atuais houve uma sensível evolução no equipamento, abrindo possibilidades para que as suas aplicações alcancem novas áreas. Em vista disso, o presente trabalho pretende realizar um apanhado e mostrar as possibilidades que a técnica pode oferecer, tanto na área médica quanto em outras pesquisas, como as aplicações em áreas como microbiologia e microbiologia industrial.

Como já dito, essa tecnologia está em constante transformação e, portanto, dificilmente poderemos listar todos os campos os quais a técnica tem permeado. Porém, baseando-se nos trabalhos aqui pesquisados, poderemos ter uma breve idéia das possíveis adaptações que a técnica permite.

## **Histórico**

Em 1947 Gucker e seus colegas desenvolveram um instrumento para análise de partículas coloidais (Gucker, et al. 1947, apud Winson & Davey, 2000; Shapiro, 2000). Esse instrumento é frequentemente considerado o primeiro citômetro de fluxo. Um dos primeiros aparelhos que receberam essa alcunha de fato foi desenvolvido no final da década de 60 por Bonner, Sweet, Hulett, Herzenberg e já no início dos anos 70 a Sistema de Imunocitômetros Becton Dickinson introduziu comercialmente essas máquinas no mercado. A época de sua criação, os cientistas preferiam métodos de absorção em detrimento aos métodos fluorescentes,

característica na qual a técnica se baseia. O nome original da tecnologia era pulso citofotométrico e somente em 1978, em uma conferência para engenheiros, veio a receber seu nome atual. Nome esse que foi rapidamente popularizado (Herzenberg et al., 2002).

Existem inúmeros livros que abordam o tema de CMF, dentre eles destaca-se o de Howard Shapiro que trata de maneira clara e informativa o assunto (Shapiro,1995).

### **Funcionamento Básico de um CMF**

O sistema BD FACSCalibur™ da empresa Becton Dickinson foi escolhido como modelo para explicar o funcionamento do equipamento, entretanto os demais aparelhos equivalentes disponíveis não diferem de maneira muito significativa.

O aparelho exige, para seu funcionamento adequado, que as partículas estejam em suspensão líquida e possuam um tamanho entre 0,2 e 50 $\mu$ m. O líquido promove o fluxo das partículas através de um capilar, evitando uma possível sobreposição dos objetos de estudo, dispondo-os de modo que um conjunto óptico possa realizar, juntamente com um conjunto eletrônico, a leitura de cada partícula de maneira isolada. Uma vez que essa leitura tenha sido realizada, o líquido é encaminhado para um recipiente de coleta de resíduos e, posteriormente, descartado em local próprio para o seu tratamento se necessário. O sangue fornece um exemplo de amostra ideal a ser analisada devido as suas características, pois encontra-se naturalmente como o sistema trabalha, sem citar as inúmeras possibilidades de análise que o próprio permite.

O conjunto óptico do aparelho consiste de lasers (laser de argônio a 488nm e laser diodo a 635nm) para incidência de luz, de uma coleção de lentes que captam a dispersão e as luzes emitidas pela interação do laser com as partículas, as moldam e as alinham e de um sistema de espelhos e filtros, que direcionam os comprimentos de onda da luz para os fotodetectores eletrônicos específicos.

O FSC (do inglês, *forward scatter*) e o SSC (idem, *side scatter*) são os fotodetectores que realizam as leituras do tamanho e da complexidade celular, respectivamente. Eles funcionam como um anteparo para o laser. Uma vez que a célula é incidida por ele, a sombra criada por ela é a base de leitura para FSC estimar o seu tamanho, enquanto que o SSC mede o quanto a célula absorveu/refletiu a luz, estimando assim a granulosidade da partícula. Existem ain-

da outros fotodetectores que captam a luz fluorescente que a partícula emite, no caso da utilização de fluorocromos, que será explicada há seu tempo.

Os fotodetectores fazem parte do sistema eletrônico, eles convertem os sinais ópticos em sinais eletrônicos, que são amplificados, lidos na forma de pulso de voltagem e um programa analisa cada um desses pulsos e fornece um valor, que por sua vez é plotado em um gráfico de dispersão. Para aumentar os parâmetros das análises pode ainda haver o emprego da imunofenotipagem.

Essa técnica consiste na utilização de anticorpos para identificar populações celulares por seus marcadores de superfície. Para tal, esses anticorpos são associados à fluorocromos, que uma vez incididos pelos lasers do aparelho são excitados e produzem uma fluorescência que é detectada pelos fotodetectores específicos do aparelho. Existem muitos tipos de fluorocromos e sua quantidade aumenta constantemente devido aos numerosos trabalhos que utilizam essa técnica. Como exemplos dessas moléculas existem a ficoeritrina (PE), a fioeritrina-Cy5 (Cy5PE) a fluorceína, o isocianato de fluorceína (FITC), a alofococianina (APC), entre inúmeras outras. Cada qual gerando um tipo de fluorescência com coloração diferente. Acompanhada dessa técnica está a aplicação de corantes a antígenos internos, que permite uma observação detalhada do funcionamento e dinâmica de algumas moléculas dentro das células.

Existem dois tipos básicos de CMFs: os que meramente realizam as análises das partículas e os que, além disso, conseguem separá-las de acordo com algumas propriedades particulares, usualmente definidas pelo operador. Dentre os que realizam a separação das partículas existem os que formam gotículas e os que as mantêm na forma fluída. Os que formam gotículas operam oscilando em uma determinada frequência, isso faz com que o líquido se desfaça em uma série de gotículas regulares. Quando o aparelho detecta uma partícula qualquer em suspensão ela é comparada com as demais de acordo com um critério pré-determinado pelo operador. Caso as características assemelhem-se às procuradas pelo pesquisador, o sistema aplica uma carga elétrica à gota, que por sua vez passa por entre um sistema de placas de alta voltagem que realizam a separação. Essas gotas uma vez separadas são captadas por um recipiente. O grau de pureza dessa separação é bastante elevado (Chapman, 2000).

Os CMF separadores de sistemas fluídicos utilizam-se de um mecanismo que desvia a direção do escoamento da mistura, uma vez detectada a partícula que compreende os critérios propostos pelo operador, para então serem captados por recipientes específicos. A qualidade da separação dos objetos de estudo não é tão alta quanto dos CMF que utilizam a separação por gotículas, além disso, separador fluídico somente consegue separar populações simples

dentro das amostras, diferentemente do outro separador, que pode aplicar à gotícula uma carga positiva ou negativa e separar ao mesmo tempo duas populações de partículas (Chapman, 2000; Ibrahim & van der Engh, 2007).

Entretanto há um determinado tipo de amostra que somente pode ser utilizada nesse tipo de CMF separador. As amostras contendo materiais com potencial patogênico não podem ser separadas na forma de gotículas, uma vez que a utilização dessa ferramenta leva a produção de aerossóis que podem contaminar o pesquisador (Chapman, 2000).

### **Problemas com as Aplicações**

O tamanho reduzido das células microbianas e a baixa concentração dos seus constituintes internos tem historicamente complicado as aplicações da CMF nesse campo. O DNA contido em *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* é por volta de 200 a 1000 vezes menor do que o contido em uma célula diplóide humana. Somado a isso, existe também uma maior quantidade de RNA, em relação à quantidade de DNA, nessas células. Assim, um corante de ácidos nucleicos não poderá ser utilizado para um ensaio com essas partículas, uma vez que ele atuará ligando-se tanto ao DNA quanto ao RNA, a não ser que outros reagentes, como RNAses, sejam incluídos (Winson & Davey, 2000).

Quando o ensaio a ser estudado é uma amostra proveniente do ambiente é necessário que haja um cuidado especial com possíveis partículas de tamanho elevado que possam causar o bloqueio do fluxo, causando um problema para a análise. Essa limitação também impede que fungos e bactérias filamentosas sejam analisados em seu estado natural. Além disso, outros microrganismos que crescem como biofilmes devem primeiramente ser desagregados para que a técnica seja aplicada (Winson & Davey, 2000).

Outro problema que afeta essas partículas é a autofluorescência que alguns microrganismos apresentam quando excitados com a iluminação do aparelho (Winson & Davey, 2000). Isso pode alterar os resultados esperados para um determinado ensaio. Entretanto, uma vez conhecido as características da autofluorescência em questão, ela pode se tornar uma ótima ferramenta para obtenção dos resultados.

Além disso, a utilização de marcadores fluorescentes em células de mamíferos é, relativamente, bem conhecida, mas sua interação com bactérias, vírus ou algas é muito pouco conhecida (Vives-Rego et al., 2000).

Bactérias são, normalmente, menos permeáveis a fluorocromos, quando comparadas a células de mamíferos, e o fato de algumas delas possuírem um sistema muito eficiente de bombas que eliminam substâncias que não participam do seu metabolismo normal contribui para isso (Jearnes & Steen, 1994).

Quando a análise é realizada em células de mamíferos, existe ainda uma enorme complicação. Quando a amostra a ser analisada é um grupo de células que não estão naturalmente em suspensão, como as células sanguíneas, por exemplo, não existe qualquer garantia de que após a dissociação da estrutura tecidual as mesmas manterão o mesmo padrão de produção de substâncias, a mesma interação entre células ou seu funcionamento natural como se ainda estivessem no organismo. Mesmo células cultivadas *in vitro*, quando analisadas por CMF, podem apresentar algumas características que não foram descritas ou que não são esperadas. A Tabela 1 lista alguns ensaios que devem ser escolhidas, para utilização da técnica de CMF, sob várias condições experimentais.

Table 1  
FCM apoptosis assays, which are appropriate for use in various experimental settings

	Liquid cell culture hemopoietic cells	Adherent cells	Tissue cells solid tumor cells
Cell scatter	+	-	-
Dye uptake	+	-	-
PS-exposure	+	+	-
Caspase activity	+	+	+
TMP	+	-	-
$\Delta\text{Ca}^{2+}$ /pH	+	-	-
Lysos. $\text{H}^+$ pump	+	-	-
TUNEL	+	+	+
DNA content	+	+	+
Prot./RNA	+	-	-
Apoptotic bodies	+	+	-

Tabela 1. Lista de ensaios de CMF que devem ser escolhidos sob várias condições experimentais (Vermees, et al., 2000)



## Exemplos de Aplicações

### Proteínas

A identificação de subgrupos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> com produção de citocina polarizada foi originalmente baseada na caracterização de clones de células usando ELISA para citocinas de culturas sobrenadantes (Mosmann et al., 1986). Entretanto, diante do número elevado de células heterogêneas obtidas ex vivo, este método torna-se impraticável, visto que somente uma minoria dos efetores possui potencial de clonagem e haveria então a necessidade de fazer um número suficiente de clones para compensar essa deficiência (Lavani et al., 1997). Existem outros métodos que podem ser utilizados na quantificação da expressão dessa proteína.

Dentre eles podemos citar as técnicas de ELISPOT, RT-PCR, LDA, ISH, imunohistoquímica e a de coloração de citocina intracelular (ICCS – intracellular cytokine staining), além da já mencionada técnica de ELISA, cada qual com suas vantagens e obstáculos (Pala, et al., 2000). A Tabela 2 traz uma lista de algumas características das tecnologias citadas quando empregadas para a detecção de citocinas.

	Intracellular cytokine stain	ELISPOT	ELISA	RT-PCR	Limiting dilution	In situ hybridisation	Immuno-histochemistry	Immuno-cytochemistry	RNA protection assay
Analyte	Protein	Protein	Protein	mRNA	Protein	mRNA	Protein	Protein	mRNA
Readout	Frequency	Frequency	Integrated amount	Integrated amount	Frequency	Localisation	Localisation	Localisation	Integrated amount
Equipment	Flow cytometer	Microscope or plate reader	Spectrophotometer	Thermal cycler	Spectrophotometer	Light/electron microscopy	Light/electron microscopy	Confocal microscope or EM	Gel set-up, phosphorimager
Cytokine co-expression	Yes	Yes (difficult)	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Cell surface phenotype	Possible	Pre-selection	Pre-selection	Pre-selection	Possible	Possible	Possible	Possible	Pre-selection

Tabela 2. Relação entre as tecnologias de detecção de citocina e uma série de características inerentes a elas (extraído de Pala et al., 2000).

A CMF de células coradas com ICCS permite a caracterização individual de um grande número de células e pode fornecer uma estimativa da heterogeneidade das populações celulares. Para que o corante utilizado na técnica adentre as células sob estudo, é necessário um tratamento inicial, onde elas entram em contato com um fixador, que pode ser formaldeído devido à melhor preservação da antigenicidade da citocina e de suas características dispersivas, além de não causar aumento na autofluorescência, e com um agente que as tornam permeáveis. Para que a análise seja realizada sem que dúvidas sejam colecionadas é de extrema importância fazer um acompanhamento com controles tanto positivos quanto negativos. Isso se deve pelo aumento da disponibilidade das proteínas presentes no interior das células, devido à elevação da sua permeabilidade, que podem causar interações não esperadas. Além da possível ligação não específica dos anticorpos e da já citada elevação da autofluorescência, dois casos causados pela fixação. Todas essas mudanças podem atrapalhar a leitura do CMF (Pala, et al., 2000). Outro importante fator que pode aumentar a precisão da análise é eliminar da contagem as células que morreram antes do início das etapas de coloração (Herzenberg, et al., 2002). Para tal, o protocolo utilizado por Hussel et al, para o estudo da indução de citocinas em células T pulmonares, pode ser uma das possibilidades de controle desse problema (Hussel, et al., 1996). O protocolo utiliza EMA (do inglês *ethidium monoazide*) incubado com as células. Esse corante entra nas células mortas, as quais não estão com a membrana intacta, e intercala com o DNA. O conjunto, ao ser exposto a uma lâmpada fluorescente, se une covalentemente e essa associação permanece nas células mortas mesmo após lavagem ou permeabilização. Após a análise os dados obtidos pelo CMF que remetem a essas células são então eliminados.

A importância da técnica de coloração de citocinas intracelulares é notadamente elevada e tem sido utilizada para caracterizar as repostas imunes tanto do organismo sã como do doente. A maior parte dos estudos em humanos está pautado na análise das células mononucleares sanguíneas periféricas (em inglês *peripheral blood mononuclear cells* – PMBC), porém, apesar de serem fácil obtenção, deve-se considerar que há uma possível acumulação das células relevantes para o estudo em tecidos inflamados e que na circulação podem se apresentar na sua forma mais empobrecida (Pala, et al., 2000). A Tabela 3 mostra uma sequência de doenças humanas e as células que são usadas para seu estudo, bem como as suas referências.

Condition	Cell type	Reference
Autoimmune diseases	Multiple sclerosis	Becher et al., 1999; Crucian et al., 1996
	Inflammatory bowel disease, SCID mouse	Bregenholt and Caesson, 1998; Meenan et al., 1998;
	LP infiltrating T cells	Simpson et al., 1997; Thoma et al., 1998
	Rheumatoid arthritis	Kusubo et al., 1998; Morita et al., 1998
	Hashimoto or Graves thyroiditis	Roura et al., 1997
	Systemic lupus erythematosus	Garcia et al., 1997
	Behcet's disease	Sugi et al., 1998
	Melanoma, gastric carcinoma	Labarrière et al., 1998; Sato et al., 1998a,b;
		Sommer et al., 1998a; Tabata et al., 1999; Hoyle et al., 1998
		Paglieroni et al., 1999; Panichi et al., 1998; Sinn et al., 1998
Transplantation	Tumour infiltrating lymphocytes PBMC T cells, LN	North et al., 1996; North et al., 1998
	T cells from solid tissue, PBMC	Kon et al., 1998; Ferry et al., 1997; Jung et al., 1995;
Immunodeficiency	Whole blood, PBMC T cells, basophils	Nakagawa et al., 1998; Nakazawa et al., 1997; Sato et al., 1998a,b
	Common variable immunodeficiency	Krouwels et al., 1997; Krug et al., 1998; Krug et al., 1997; Randolph et al., 1999
Atopy/allergy	Atopic dermatitis	Collins et al., 1998; Estcourt et al., 1997; Honda et al., 1998; Jason et al., 1999;
	Ashtma	Lecoeur et al., 1998; Meynard et al., 1996; Sato et al., 1998a,b; Smit et al., 1998; Westby et al., 1998
Viral infections	HIV, SIV	Kubota et al., 1998
	HTLV-I	Ito et al., 1998
	Herpes simplex virus	Nazaruk et al., 1998
	Epstein-Barr virus	Falchetti et al., 1998
	Influenza virus	Hussell et al., 1998; Hussell and Openshaw, 1998; Openshaw et al., 1998; Murphy et al., 1996
	Respiratory syncytial virus	Hussell et al., 1995; Hussell and Openshaw, 1998; Hussell et al., 1996, 1997a,b
	Measles	Ito et al., 1997
	Lymphocytic choriomeningitis virus	Murali et al., 1998; Oerinius et al., 1999; Su et al., 1998
	Lyme arthritis	Gross et al., 1998
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Kadena et al., 1997
Bacterial infections	Bacillus Calmette Guerin (BCG)	Sander et al., 1995
	Schistosomiasis	Lohning et al., 1999; Fallon et al., 1998; Rumbley et al., 1999
Parasitic infections	Leishmaniasis	Sommer et al., 1998b
	Bancroftian filariasis	de Almeida et al., 1998
	Alveolar echinococcosis	Jenne et al., 1998
	Burns	James et al., 1996
Trauma	Dendritic cells, purified T cells, LN cells	Kelleher and Knight, 1998; Miner and Croft, 1998; Ulrich and Vohr, 1996
	T cell clones	Knudsen et al., 1997
Normal	Whole blood, cord blood, PBMC	Chalmers et al., 1998; O'Mahony et al., 1998; Amunizato et al., 1997;
	T cells monocytes, spleen slice culture,	Chipeta et al., 1998; Sewell et al., 1997; Hannaam et al., 1996;
	T cell clones, milk mononuclear cells	James et al., 1996; Skibinski et al., 1997; Jung et al., 1996; Skansen et al., 1993

Tabela 3. Efemeridades humanas e os tipos celulares que podem servir como base para seu estudo utilizando a coloração de citocina intracelular e as referências dos mesmos (extraído de Pala, et al., 2000).

## **Fagocitose**

O CMF tem sido usado por mais de três décadas na avaliação dos defeitos da fagocitose celular (Bassøe & Bjerknes, 1984, apud Lehmann, et al., 2000). Isso pode demonstrar o reflexo da necessidade do estudo e a dificuldade que ele representa.

As anormalidades intracelulares específicas associadas com infecções recorrentes e crônicas de bactérias e fungos têm demonstrado a importância do funcionamento adequado das células fagocitárias (Densen, et al. 1995, apud Lehmann, et al., 2000). Porém, a deposição de opsoninas na superfície do microrganismo para o funcionamento ótimo dessas células é parte importante do processo. Isso é mais um fator que está associado ao desenvolvimento de doenças infecciosas graves (Halstensen, et al., 1989). A desordem na defesa fagocitária pode ser devida a interações entre os três fatores: células fagocitárias, opsoninas e os microrganismos.

A introdução da CMF permitiu a medida simultânea da estrutura, bioquímica e propriedades funcionais de uma célula individualmente (Sarsella, et al., 1997). Através da técnica houve a possibilidade da análise antígeno-específica da resposta opsonofagocítica durante a doença diagnosticada, que pode ser de importância para a seleção de constituintes para vacinas bacterianas (Lehmann, et al., 1999).

## **Apoptose Celular**

Apesar da proximidade, há entre a necrose e a apoptose diferenças moleculares, morfológicas e bioquímicas. Além disso, há todo um processo fisiológico por trás da morte celular programada e ela é regida por sinais enviados pelo organismo. Entretanto alguns problemas no envio ou recebimento desses sinais podem desencadear algumas doenças.

Quando há uma disfunção que minimiza o número de apoptose pode resultar em neoplasias (Tomlinson & Bodmer, 1995), leucemia (Sachs, 1996; Estrov & Talpaz, 1996), persistência de infecções virais (Chiou, et al., 1994), ocorrência de doenças auto-imunes (Nagata & Suda, 1995) entre outras complicações. Quando o número de apoptose é elevado o organismo pode sofrer deficiência imune (Groux, et al., 1991, apud Vermes, et al., 2000), além de outras

doenças. Então, o melhor conhecimento do processo pode nos levar a possíveis aplicações terapêuticas.

Como a ferramenta de CMF pode medir as mudanças que a célula sofre durante o processo, ela torna-se uma grande aliada para o entendimento dessa característica fisiológica. O ponto de partida para pode ser a diferenciação de células em necrose e células em processo de apoptose.

A simples medição dos parâmetros do tamanho e complexidade da célula já pode distinguir um caso do outro (Ormerod, et al., 1995). Em algumas células, nos estágios iniciais da apoptose a célula encolhe, porém mantém a membrana plasmática intacta, diferente do que ocorre na necrose, onde a falha na integridade da membrana ocasiona um inchaço. A leitura do CMF para as células apoptóticas comparadas com as células saudáveis será um decréscimo no valor de FSC e uma manutenção no valor de SSC (Vermes, et al., 2000). Durante a necrose, o valor de FSC aumenta imediatamente, enquanto o valor de SSC diminui ambos devido ao inchaço (Dive, et al., 1992, apud Vermes, et al., 2000).

O CMF ainda pode ser utilizado a partir da análise quantitativa da retenção de alguns corantes. Como as células em apoptose mantêm a membrana intacta durante grande parte do processo, pode-se esperar que haja uma diferença na ligação de corantes para ácidos nucléicos, como iodeto de propídio (PI) ou o brometo de etídio (EthBr), em células vivas, mortas ou em apoptose (Vermes, et al., 2000). A morte celular também pode ser detectada pela perda da habilidade de excluir esses corantes. Para a análise de seu trabalho, King (2000) assume que células que perderam tal habilidade, devido a uma grande perturbação na estrutura da sua membrana plasmática, são consideradas mortas. Porém o mesmo faz a ressalva de que existem casos em que essa afirmação não pode ser considerada (Jones, et al. 1990, apud King, 2000).

Proteases da família das cisteínas possuem um papel importante no processo morfológico da apoptose (Green, 1998). Denominadas CASPASEs (do inglês *cysteine dependent aspartate cleaving protease*) (Thornberry & Lazbnik, 1998), essas enzimas realizam a clivagem controlada de macromoléculas vitais a célula, dando início a apoptose (Green, 1998). Elas existem normalmente como pró-enzimas e são convertidas pela proteólise causada pela própria caspase (Kumar & Lavin, 1996). Foram identificadas 15 tipos dessa enzima (Thornberry & Lazbnik, 1998), sendo que uma parte é ativada em resposta aos sinais pró-apoptóticos e as outras por essas já ativadas. É promovida então uma reação em cascata (Green, 1998). O

mapeamento através de anticorpos dessas caspases já ativadas pode oferecer uma importante ferramenta para acompanhar o processo de apoptose.

Outro evento característico da apoptose é a formação de poros permeáveis no folheto externo da membrana mitocondrial, que permite o fluxo de proteínas celulares para o citoplasma da mesma (Susin, et al., 1998). Isso resulta na mudança do potencial transmembrana mitocondrial (Martinou, 1999) e é nessa membrana que os marcadores serão utilizados. Em células viáveis, há o acúmulo de fluorocromos específicos na membrana, uma vez que o potencial transmembrana é afetado, esses marcadores vão se desprendendo (Castedo, et al. 1996).

Existem vários outros ensaios que podem mostrar, através da tecnologia de CMF, uma célula que está em apoptose ou não, como a análise do fluxo de cálcio e pH, da bomba de prótons do lisossomo, dos ácidos nucleicos, dos corpos apoptóticos (último estágio que a célula apresenta antes de ser fagocitada), entre outros (Vermees, et al., 2000).

## **Microbiologia**

Gucker (1947), no início do seu artigo afirmou que o princípio do aparelho por ele criado deve realizar “uma ampla aplicação em (...) bacteriologia” (adaptado do inglês Gucker, 1947, apud Winson & Davey, 2000), isso pode ser um indício de que a análise microbiológica foi desde o começo um dos focos da CMF, junto com a análise de células de mamíferos.

Apesar da predisposição da técnica na análise de microrganismos, vários obstáculos tiveram que ser transpostos. Steen e Lindmo, em 1979 desenvolveram um emissor de luz sensível que era capaz de realizar a leitura de alguns dos parâmetros do CMF da época em microrganismos (Steen & Lindmo, 1979). Esse fato permitiu uma nova abordagem a essas partículas. Entretanto adaptações são necessárias, uma vez que as populações de microrganismos possuem características bem distintas das células humanas. A resposta de algumas bactérias a corantes, drogas e outros reagentes, por exemplo, são afetadas pela estrutura de sua parede celular, presença ou não de poros ou bombas de fluxo (Shapiro, 2000).

As populações microbianas ainda apresentam heterogeneidade e elas são resultado de várias fontes. A genética desses seres apresenta distinções mesmo dentro de uma mesma es-

pécie e elas podem ser causadas por mutações ou perda de plasmídeo (Shapiro, 2000). O ciclo celular no qual a mesma se encontra também é uma fonte de distinção entre os indivíduos. O tamanho da célula é outra característica que pode variar dentro da mesma espécie. Isso pode ser amenizado com a utilização de artifícios matemáticos como cálculo de log dos valores obtidos. Outra possibilidade de diferença é com relação a sua fisiologia. Uma célula que se encontra crescendo no centro de uma colônia, em uma placa de petri, recebe diferentes estímulos do meio no qual ela está inserida do que uma célula que se encontra em um dos extremos da colônia, na periferia da mesma. Isso pode refletir em diferenças no conteúdo de proteínas, por exemplo, no interior das células (Shapiro, 2000; Winson & Davey, 2000).

Para definir as subpopulações dentro da população de microrganismos um caminho pode ser a utilização de um coquetel de marcadores fluorescentes, que podem ser escolhidos para guiar as análises em direção ao subgrupo de interesse.

A barreira que algumas bactérias promovem para a entrada de fluorocromos pode dificultar em muito a coloração das mesmas para ensaios mais elaborados. O uso de fluorescência gerada por reação enzimática dentro da célula é uma possível saída para contornar esse problema. A técnica se apóia na entrada de um precursor fluorogênico que sofre imediata ativação através de enzimas da própria célula. É interessante que essa substância, após a ativação, se torne insolúvel ou forme um complexo com algum componente celular que a torne efetivamente insolúvel. Deve ainda, de preferência, ser não tóxico, estável e persista no interior da célula tempo suficiente para permitir o monitoramento (Winson & Davey, 2000).

Essa técnica pode ser utilizada para o monitoramento da viabilidade celular (Winson & Davey, 2000), para a discriminação entre bactérias e leveduras (Nir, et al., 1990), entre outros exemplos. Em células de mamíferos, essa técnica possui uma aplicação mais ampla, enquanto em microrganismos ela fica relativamente restrita.

Há ainda a possibilidade de aproveitar as características autofluorescentes de algumas espécies em benefício da técnica. Por exemplo, em estudos de fitoplâncton ou bactérias fotossintetizantes, o perfil autofluorescente pode ser utilizado para diferenciar as espécies (Winson & Davey, 2000).

O GFP também pode ser uma ótima ferramenta para conhecer a dinâmica da expressão dos genes e localizar proteínas nas células analisadas. Talvez, um dos principais pontos posi-

tivos da técnica deva-se ao fato de que para que seu funcionamento ocorra somente é exigido a presença de oxigênio (Winson & Davey, 2000).

Outra técnica que pode ser aplicada é o método de sanduíche, que consiste na utilização de anticorpos marcados com fluorescência. Um anticorpo contra a amostra a ser analisada é ligado a ela. Em seguida, um novo anticorpo, conjugados a um fluorocromo, é adicionado. Este último se ligará ao primeiro anticorpo, formando um complexo de dois anticorpos e a amostra. Este complexo é então analisado pelo CMF e pode fornecer resultados de alta sensibilidade (Shapiro, 2000).

Também existem kits fabricados por empresas que podem ser utilizados para obter resultados mais facilmente.

## **Microbiologia Aplicada à Indústria**

### **Produção Alcoólica**

O CMF é amplamente utilizado na área de biotecnologia para monitoramento de microrganismos para hiperprodução industrial, por exemplo, uma vez que a ferramenta permite uma rápida análise de um grande número de células, além do possível isolamento daquelas que possuem as características procuradas. Entretanto em alguns casos, análises mais específicas que utilizam marcadores fluorescentes podem ocasionar a morte das células, como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, importante para a indústria de bebidas alcoólicas (Katsuragi, et al. 2000).

A levedura produz uma grande quantidade de uma substância chamada tiamina, que não é fluorescente, mas uma vez oxidada com ferricianido de potássio ou brometo de cianogênio ela torna-se tiocromo, composto que apresenta forte fluorescência (Kimura, et al., 1980; Wyatt & Hillman, 1997). Com essa fluorescência é possível realizar a análise utilizando o CMF, entretanto o processo para de conversão de tiamina em tiocromo ocasiona na morte das células (Katsuragi, et al. 2000).

Para que seja possível recuperar as células, ou ao menos algumas delas, uma vez que uma única célula é suficiente para retomar o crescimento, Katsuragi, et al. (2000) propôs a



utilização de GMDs (do inglês *gel microdroplets*) que possibilitaria o crescimento de microcolônias de células. As células crescidas em GMDs, que forneceriam fontes de tiamina para coloração, seriam em grande parte mortas pelo processo utilizado no CMF, entretanto algumas células poderiam sobreviver, permitindo assim que análise, classificação e isolamento fossem possíveis em um único processo.

## **Indústria de Alimentos**

Análises microbianas em alimentos são normalmente realizadas através de contagens de colônias cultivadas em meios e condições de crescimento adequadas. Porém, esse tipo de análise consome um grande tempo além de criar dificuldades para o estudo de grande parte das espécies que afetam essas empresas (Comas-Riu & Rius, 2009)

Isso pode ser explicado por dois fatores: a impossibilidade de cultivar novos microrganismos que podem não apresentar crescimento nos meios de cultura conhecidos e a impossibilidade de recuperar conhecidos microrganismos que entraram em estado não-cultivável devido ao tanto stress contínuo como ao contínuo crescimento (Giraffa, 2004).

A necessidade da análise desses microrganismos deve-se ao fato de que bactérias, leveduras, fungos ou outros seres que podem ser patógenos podem causar, além da perda de qualidade dos produtos, doenças a seus consumidores. Devido a essa importância, uma técnica que alie baixo custo de análise e alta qualidade de dados é de imensa valia para essas empresas.

O CMF é o instrumento que alguns laboratórios que prestam serviços a essas empresas podem escolher. A utilização da simples análise com o FSC e o SSC pode apresentar resultados satisfatórios, mas a adição de fluorocromos e anticorpos para imunofenotipagem dão um grande poder a análise (Comas-Riu & Rius, 2009).

No caso de probióticos, alimentos que possuem em sua composição microrganismos benéficos ao organismo, há a necessidade de avaliar a quantificação dos seres que o compõe, além da viabilidade deles. Existem aqueles probióticos que possuem microrganismos viáveis, porém não serão cultivados no organismo, existem também aqueles que possuem células não viáveis, que servirão como estimuladores do sistema imune (Ouwehand, et al. 2002, apud Comas-Riu & Rius, 2009). A avaliação da qualidade que um probiótico possui em decorrên-

cia a sua armazenagem também é de suma importância e pode ser analisada através da CMF (Comas-Riu & Rius, 2009).

Outra importante área de preocupação da indústria alimentícia que pode fazer uso da tecnologia é a de preservação dos alimentos. O CMF pode fornecer dados de viabilidade de microrganismos patogênicos, saprófagos ou fitopatogênicos, permitindo uma análise detalhada da qualidade do alimento em função do tempo.

## **Perspectivas das Futuras Aplicações**

Os futuros avanços que a tecnologia pode alcançar provavelmente residem no aumento na capacidade de detecção, no desenvolvimento de equipamentos cada vez mais rápidos, com vários parâmetros sendo analisados simultaneamente, com maior poder de gerenciamento e mais fáceis de operar, com softwares mais robustos e funcionais e automatização dos aparelhos (Herzenberg, et al., 2002; Ibrahim & van der Engh, 2007). Além disso, novos fluorocromos para detecção podem ser desenvolvidos além do possível aumento da gama de ensaios que o equipamento pode realizar. Num futuro próximo a evolução da ferramenta ainda pode levar ao desenvolvimento de citômetros portáteis, que podem ser empregados, uma vez concebidos como aparelhos de mão, em locais de conflito bélico, e em campo, para monitoramento da qualidade de água e em diagnósticos em outras áreas como agricultura e veterinária (Ibrahim & van der Engh, 2007).

## **Conclusão**

A grande maioria dos trabalhos enfatiza o poder que a técnica de CMF possui, mostrando que ela é uma ferramenta que gera uma base sólida de dados, além disso, neste trabalho procurou-se salientar as suas variadas aplicações. Uma prova da capacidade do aparelho é a heterogeneidade de estudos que ele permite. Entretanto, é leviano assumir que as aplicações da técnica se esgotaram ou que os caminhos para novas utilizações se restringiram. Novas áreas podem aplicar a tecnologia, tudo dependerá da inquietude dos pesquisadores e dos novos rumos que os mesmos darão para esta técnica e maquinário de largo potencial de aplicabilidade.

## **Bibliografia**

ARUN, K. H., KAUL, C. L. & RAMARAO, P. Green fluorescent protein in receptor research: an emerging tool for drug discovery. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, n. 51 p. 1-23, 2005.

CASTEDO, M., HIRSCH, T., SUSIN, S. A., ZAMZAMI, N., MARCHETTI, P., MACHO, A. & KROEMER, G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. **Journal of Immunology**, n. 157 p. 512-521, 1996.

CHAPMAN, G. V. Instrumentation for flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, n. 243 p. 3-12, 2000.

CHIOU, S. -K., TSENG, C. -C., RAO, L. & WHITE, E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. **Journal of Virology**, n. 68 p. 6553-6566, 1994.

COMAS-RIU, J. & RIUS, N. Flow cytometry applications in the food industry. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n. 36 p. 999-1011, 2009.

ESTROV, Z. & TALPAZ, M. Role of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) in leukemia. **Cytokines and Molecular Therapy**, n. 2 p. 1-11, 1996.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, n. 28 p. 251-260, 2004.

GREEN, D. R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. **Cell**, n. 94 p. 695-698, 1998.

HALSTENSEN, A., SJURSEN, H., VOLLSET, S. E., FRØHOLM, L. O., NÆSS, A., MATRE, R. & SOLBERG, C.O. Serum opsonins to serogroup B meningococci in meningococcal disease. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, n. 21 p. 267-276, 1989.

HERZENBERG, L. A., PARKS, D., SAHAF, B., PEREZ, O., ROEDERER, M. & HERZENBERG, L. A. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. **Clinical Chemistry**, n. 48 p. 1819-1827, 2002.

HUSSELL, T., SPENCER, L. C., GEORGIU A., O'GARRA, A. & OPENSHAW, P. J. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. **Journal of General Virology**, n. 77 p. 2447-2455, 1996.

IBRAHIM, S. F. & VAN DER ENGH, G. Flow cytometry and cell sorting. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, n. 106 p. 19-39, 2007.

JEARNES, M. W. & STEEN, H. B. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. **Cytometry**, n. 17 p. 302-309, 1994.

KATSURAGI, T., TANAKA, S., NAGAIRO, S. & TANI, Y. Gel microdroplet technique leaving microorganisms alive for sorting by flow cytometry. **Journal of Microbiological Methods**, n. 42 p. 81-86, 2000.

KIMURA, M., FUJITA, T., NISHIDA, S. & ITOKAWA, Y. Differential fluorimetric determination of picogram levels of thiamine, thiamine monophosphate, diphosphate and triphosphate using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, n. 188 p. 417-419, 1980.

KING, M. A. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, n. 243 p. 155-166, 2000.

KUMAR, S. & LAVIN, M. F. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. **Cell Death and Differentiation**, n. 3 p. 255-267, 1996.

LAVANI, A., BROOKES, R., HAMBLETON, S., BRITTON, W. J., HILL, A. V., MCMI-CHAE, A. J. Rapid effector function in CD8<sup>+</sup> memory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, n. 186 p. 859-865, 1997.

LEHMANN, A. K., HALSTENSEN, A., AABERGE, I. S., HOLST, J., MICHAELSEN, T. E., SØRNES, S., WETZLER, L. M. & GUTTORMSEN, H. -K. Human opsonins induced during meningococcal disease recognize outer membrane proteins PorA and PorB. **Infection and Immunity**, n. 67 p. 2552-2560, 1999.

LEHMANN, A. K., SØRNES, S. & HALSTENSEN, A. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, n. 243 p. 229-242, 2000.

MANDY, F. F. Twenty-five years of clinical flow cytometry: AIDS accelerated global instrument distribution. **Cytometry**, n. 58 p. 55-56, 2004.

MARTINOU, J. –C. Key to the mitochondrial gate. **Nature**, n. 399 p. 411-412, 1999.

MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H. M., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, n. 136 p. 2348-2357, 1986.

NAGATA, S. & SUDA, T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutation. **Immunology Today**, n. 16 p. 39-43, 1995.

NIR, R., YISRAELI, Y., LAMED, R. & SAHAR, E. Flow cytometry sorting of viable bacteria and yeasts according to beta-galactosidase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 56 p. 3861-3866, 1990.

ORMEROD, M. G., PAUL, F., CHEETHAM, M. & SUN, X. –M. Discrimination of apoptotic thymocytes by forward light scatter. **Cytometry**, n. 21 p. 300-304, 1995.

PALA, P., HUSSEL, T. & OPENSHAW, P. J. M. Flow cytometry measurements of intracellular cytokines. **Journal of Immunological Methods**, n. 243 p. 107-124, 2000.

SACHS, L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 93 p. 4742-4749, 1996.

SARSELLA, M., RODA, K., SPECIALE, L., TARAMELLI, D., MENDOZZI, E., GUERINI, F. & FERRANTE, P. A flow cytometric method for the analysis of phagocytosis and killing by polymorphonuclear leukocytes. **Annals of the New York Academy of Science**, n. 15 p. 53-61, 1997.

SHAPIRO, H. M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. **Journal of Microbiological Methods**, n. 42 p. 3-16, 2000.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**, 3rd edition. New York: Wiley-Liss. 1995. 542 p.

STEEN, H. B. & LINDMO, T. Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone. **Science**, n. 204 p. 403-404, 1979.

SUSIN, S. A., ZAMZAMI, N. & KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1366 p. 151-165, 1998.

VERMES, I., HAANEN, C. & REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, n. 243 p. 167-190, 2000.

VIVES-REGO, J., LEBARON, P. & NEBE-VON CARON, G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, n. 24 p. 429-448, 2000.

TOMLINSON, I. P. M. & BODMER, W. F. Failure of programmed cell death and differentiation as causes of tumors: some simple mathematical models. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 92 p. 11130-11134, 1995.

THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, n. 281 p. 1312-1316, 1998.

WYATT, D. T. & HILLMAN, R. E. Cyanogen bromide-based assay of thiamin. **Methods in Enzymology**, n. 279 p. 91-97, 1997.