



Introdução à Citometria de Fluxo

Um manual para iniciantes

Rodrigo Netto Costa

Curitiba – PR – Brasil - 2022
2ª Edição



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Introdução à Citometria de Fluxo

Um manual para iniciantes

Este manual básico de citometria de fluxo tem o intuito de auxiliar na compreensão desta técnica que vem sendo cada vez mais utilizada no laboratório clínico e na pesquisa biomédica em todo o mundo. Esperamos contribuir na correta interpretação dos resultados gerados, bem como na tomada de decisões quanto ao uso desta metodologia.

Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná

Diretor: Stenio Perdigão Fragoso

Vice-diretora de Ensino, Informação e Comunicação

Maria das Graças Rojas Soto

Autor:

Rodrigo Netto Costa

Revisão de Conteúdo:

Alessandra Melo Aguiar

Priscila Mazzocchi Hiraiwa

Revisão de texto:

Maria das Graças Rojas Soto

Arte e Design:

Rodrigo Netto Costa

Wagner Nagib

Produção:

Vice-direção de Ensino, Informação e Comunicação

Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Rodrigo Netto Costa é bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO, especialista em Análises Clínicas pela Fundação Técnico-Educacional Souza Marques e mestre em Ciências (Saúde Pública - subárea Toxicologia Ocupacional/ Ambiental) pela Escola Nacional de Saúde Pública/ Fundação Oswaldo Cruz. Em 2002, ingressou no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde / Fundação Oswaldo Cruz (INCQS / FIOCRUZ) por meio de concurso público para a carreira de Tecnologista em Saúde Pública, onde atuou no controle de qualidade de kits diagnósticos e hemoderivados; no cultivo de linhagens celulares de origem animal utilizadas no controle de qualidade de vacinas virais e na padronização de métodos alternativos ao uso de animais para avaliação da segurança de produtos cosméticos; na avaliação da potência biológica da eritropoetina humana recombinante para fins regulatórios e em estudos sobre o monitoramento do uso de agrotóxicos. Desde 2017, vem atuando na área de citometria de fluxo em diversas abordagens analíticas e *cell sorting* no Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ - Paraná). A partir de 2020, passou a atuar como responsável técnico pela Plataforma de Citometria de Fluxo, vinculada à Rede de Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ, no mesmo instituto.

Agradecimentos

À Alessandra Aguiar e à Priscila Hiraiwa, por me apresentarem esta tecnologia fascinante e me ajudarem na revisão deste manuscrito. À Maria das Graças Rojas Soto, pelo incentivo e por ser a principal viabilizadora desta edição. Ao Wagner Nagib, pelo talentoso trabalho de designer gráfico. À Coordenação de Comunicação, Extensão e Divulgação Científica do Instituto Carlos Chagas (Fiocruz – Paraná), por tornar possível esta publicação. 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 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 das tecnologias mais versáteis em biociências, haja vista o que promete: analisar múltiplos parâmetros em milhares de eventos em curtíssimo espaço de tempo.

Muito utilizada entre os biocientistas, ainda é um mistério para muitos jovens cientistas, que não compreendem como os citômetros de fluxo funcionam e como são capazes de realizar tantos prodígios. É comum o desconhecimento dos princípios básicos de funcionamento, o que pode acarretar confusão na interpretação dos dados apresentados em trabalhos científicos e impactar no planejamento de seus experimentos.

Neste contexto, este livro traduz para uma linguagem fácil e direta o funcionamento dos citômetros de fluxo. São destacados aqui os pontos mais importantes sobre a análise e interpretação de dados e a utilização e o preparo dos controles necessários para execução de experimentos válidos de citometria de fluxo, fundamentais para a correta execução e interpretação de resultados. Este manual é uma ferramenta útil, tanto para o iniciante em citometria de fluxo, quanto para o mais experiente, que busca relembrar os conceitos básicos e aplicá-los na prática.

Alessandra Melo de Aguiar

Curitiba, 2021

Introdução à Citometria de Fluxo

Um manual para iniciantes

Sumário

Pág.

7

Introdução

Pág.

10

Fluídica

Pág.

12

Óptica

Pág.

22

Eletrônica

Pág.

26

Princípios de preparo de amostras: controles necessários para uma análise de dados adequada

Pág.

28

Análise de dados

Pág.

34

Sorting

Pág.

37

Referências

Pág.

37

Créditos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

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. Deste 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 elas passam individualmente em um fluxo contínuo através de um feixe de luz. Portanto, diferentemente da microscopia óptica, que produz uma imagem real aumentada do campo em que se está focando a fonte luminosa, a citometria de fluxo quantifica um conjunto de parâmetros em cada célula ou partícula em suspensão, que passam uma a uma pelo feixe de luz.

A principal característica desta metodologia é a capacidade de fazer medições de um grande número de células, uma a uma, em um curto período de tempo. Somada à velocidade de análise, a CF possui a capacidade de analisar diversos parâmetros simultaneamente em uma única célula, podendo revelar a heterogeneidade de populações celulares em uma amostra, identificando e quantificando diferentes subconjuntos de células.

A maioria dos citômetros de fluxo são capazes de analisar partículas ou células que podem variar entre 0,2 e 50 micrômetros de diâmetro. Com isso, uma infinidade de tipos celulares, incluindo células animais, algas, protozoários, bactérias, fungos, e até mesmo organelas e vesículas extracelulares, são os muitos exemplos do que se pode analisar por esta tecnologia (Figura 1). Contudo, a CF requer que a amostra esteja em suspensão, com o mínimo de aglomerados e resíduos possíveis. Isso significa que a arquitetura, a organização do tecido e qualquer informação sobre a relação espacial entre as diferentes células não são obtidas neste tipo de análise.



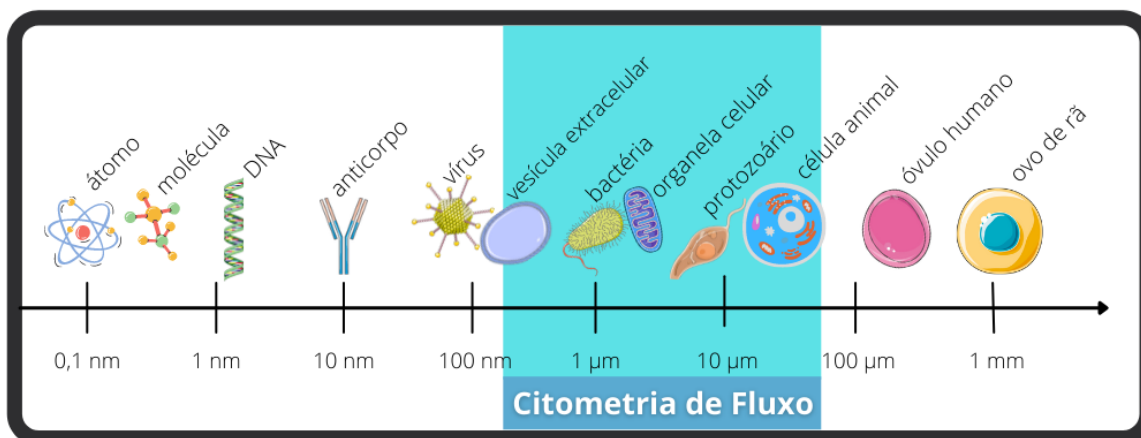


Figura 1. Esquema didático representativo do tamanho relativo de partículas e células. O espaço marcado em azul representa a faixa de tamanho detectável pela maioria dos citômetros de fluxo.

Além do tamanho, informações relativas à complexidade interna e às características específicas da amostra também podem ser quantificadas por CF. Normalmente, são utilizados marcadores fluorescentes para evidenciar a expressão de proteínas ou identificação de constituintes celulares. Por exemplo, utilizando métodos de engenharia genética, é possível construir células que expressam proteínas fluorescentes (Proteína Fluorescente Verde - GFP), efetuar a coloração de constituintes celulares com reagentes fluorescentes (DNA com Iodeto de Propídio - PI), ou identificar antígenos pelo uso de anticorpos específicos conjugados a fluoróforos (CD3-PerCP). Com uma evolução crescente no número de moléculas fluorescentes disponíveis e uma grande quantidade de anticorpos monoclonais, a citometria de fluxo se torna cada vez mais versátil e sua utilização tem aumentado em ritmo acelerado.

A compatibilidade e a versatilidade da CF aplicada a diversos modelos celulares e metodologias (avaliação funcional, diferenciação de populações celulares por imunofenotipagem, análise de ácidos nucleicos, avaliação de viabilidade e proliferação celular, apoptose, ciclo celular, quantificação de citocinas, sexagem de espermatozoides, entre outros) a tornam uma das principais tecnologias para as áreas das ciências naturais e médicas.

Uma aplicação de grande destaque na CF é a separação de determinada população celular a partir da suspensão heterogênea de células, processo denominado *sorting* (tema



abordado adiante). Assim, há dois tipos principais de citômetros de fluxo produzidos comercialmente: os citômetros analisadores e os citômetros separadores de células, denominados *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 (Figura 2).

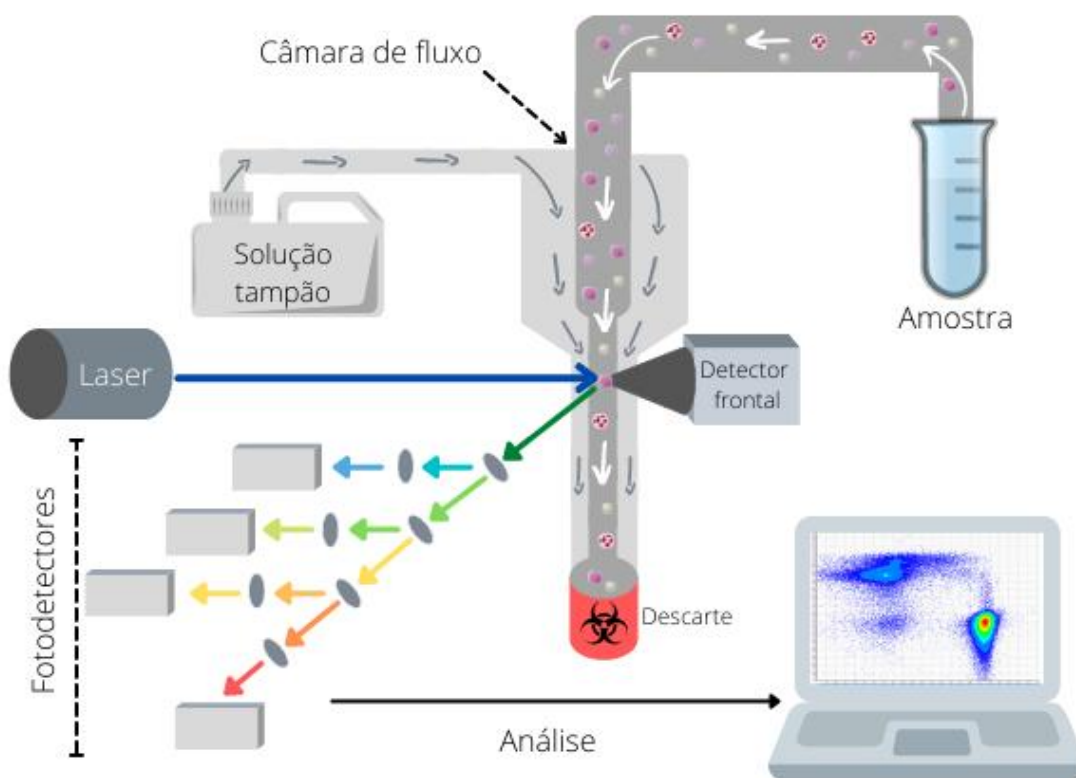


Figura 2. Esquema didático do funcionamento de um citômetro de fluxo convencional. A amostra é adquirida pelo subsistema fluídico e é conduzida ao ponto onde é interceptada pelo feixe de luz (subsistema óptico) através de um fluxo contínuo (subsistema fluídico). Cada célula ou partícula é interrogada individualmente e, a partir desse momento, toda a luz dispersada e as fluorescências emitidas são filtradas em diferentes faixas de cores, que são direcionadas aos fotodetectores específicos (subsistema óptico). Estes, por sua vez, transformam os sinais luminosos (fótons) em sinais eletrônicos proporcionais, que são lidos em um *software* e traduzidos em gráficos (subsistema eletrônico).

A fonte de luz geralmente é composta por *lasers*, pois são estáveis, produzem um feixe de alta intensidade de luz monocromática, além de possuírem alta pureza espectral.



O seu diâmetro pequeno possibilita que o feixe de luz seja focado em uma única célula por vez. 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 em comprimentos de onda entre 325 nm e 780 nm.

De modo geral, os citômetros de fluxo apresentam variações, principalmente em relação ao número de *lasers* e tipos de detectores. Equipamentos mais sofisticados contêm quatro ou mais *lasers* e grande número de detectores que, em conjunto, possibilitam a análise de mais de 20 parâmetros de forma simultânea. Recentemente, foram desenvolvidos citômetros de fluxo acoplados a outras ferramentas, como microscopia ou espectrometria de massas. Há, também, citômetros baseados em outras tecnologias, como a citometria espectral e citometria baseada em microfluídica. Este manual aborda somente a citometria de fluxo convencional.

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 da amostra no centro do fluxo - processo chamado de foco hidrodinâmico. Para adquirir uma amostra, as partículas que a compõem são distribuídas aleatoriamente no espaço tridimensional da linha de amostra, cujo diâmetro é significativamente maior do que o diâmetro da maioria das células. Então, através do foco hidrodinâmico, estas partículas são ordenadas centralmente em um fluxo contínuo para serem interrogadas individualmente pelo sistema óptico do instrumento - região chamada de núcleo da amostra. Esta organização ocorre devido à diferença de pressão entre a amostra e a solução tampão (*sheath fluid*) que envolve o núcleo por onde passa. Se não houver nenhuma perturbação neste fluxo, ambos os fluídos não se misturam à medida que fluem pela câmara de fluxo (Figura 3).

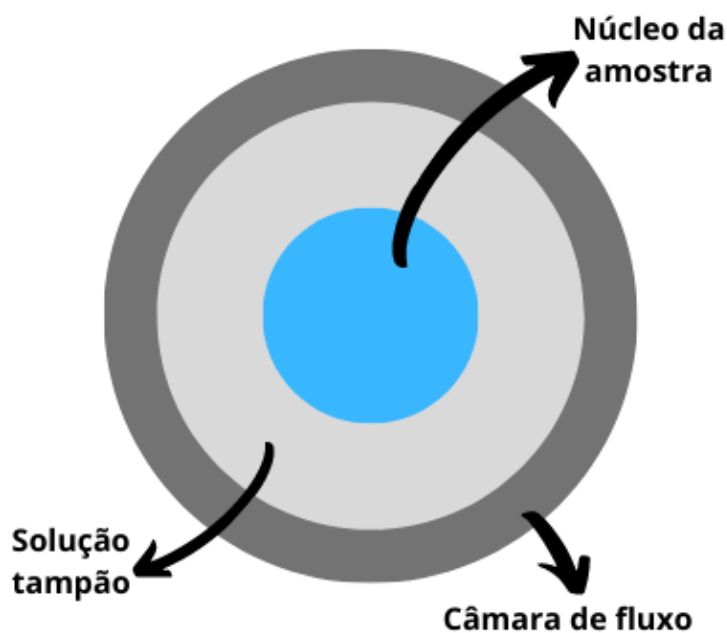


Figura 3. Esquema de uma câmara de fluxo em corte transversal (como se o observador a estivesse vendo de cima para baixo).

De forma geral, a solução tampão é direcionada para a câmara de fluxo pela pressão do ar fornecida por um compressor. Uma válvula controla se a amostra está sendo introduzida ou não no sistema; esta pode ser injetada para dentro do fluxo por pressão ou por bomba peristáltica. A taxa desse fluxo é controlada por um regulador de pressão e pode ser alterada de acordo com as necessidades do experimento, no momento da aquisição dos dados. Desse modo, o fluxo da amostra pode variar de poucos a centenas de microlitros por minuto; estes valores variam de acordo com as configurações do equipamento.

A pressão do fluxo da amostra influencia diretamente a taxa de 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 em um determinado momento. Neste caso, algumas células podem passar pelo raio *laser* fora do centro e não receberem toda a energia do feixe do *laser*, podendo, com isso, diminuir a resolução dos dados. Quando a pressão da amostra é baixa o seu fluxo é estreito, a taxa de eventos é baixa e se obtêm resultados com maior resolução. Quando a pressão da amostra é aumentada, o seu fluxo aumenta e a taxa de eventos





também (Figura 4). Portanto, o fluxo da amostra deve ser selecionado de acordo com a resolução pretendida.

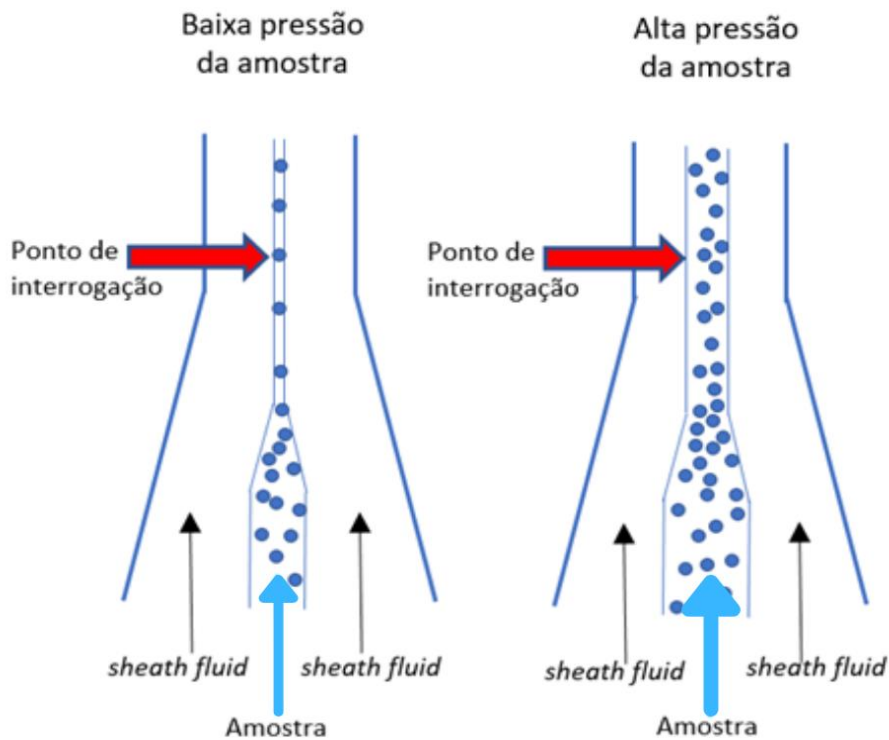


Figura 4. Esquema didático de uma câmara de fluxo ilustrando como a diferença de pressão imposta ao fluxo da amostra influencia no diâmetro do seu núcleo e em sua taxa de eventos.

Óptica

Antes que o sistema óptico de um citômetro de fluxo seja apresentado, há a necessidade de se entender algumas propriedades da luz e das moléculas fluorescentes, chamadas de fluoróforos ou fluorocromos. A luz é uma forma de energia eletromagnética que viaja em ondas e que possui uma frequência e um determinado comprimento que irão 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 5). O espectro visível pode ser subdividido em cores, como o violeta, azul, verde, amarelo, alaranjado 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.

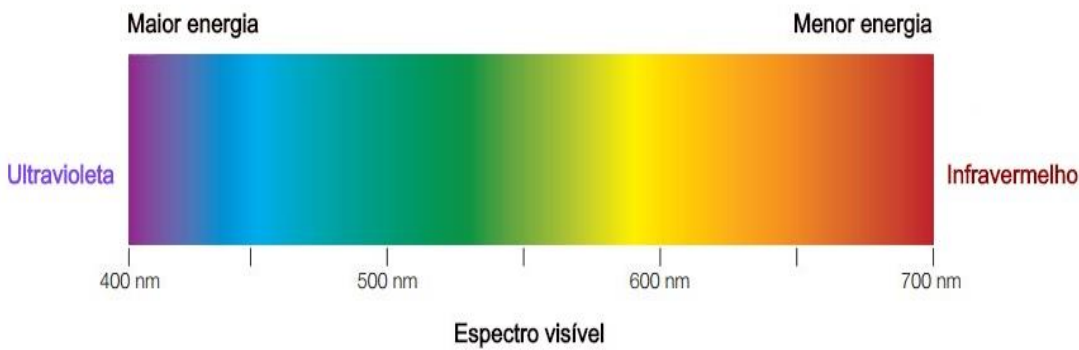


Figura 5. Espectro eletromagnético da luz visível ao olho humano.

Os fluoróforos fazem parte de um grupo de moléculas que, ao entrarem em contato com a luz de um determinado comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz em um comprimento de onda maior (com menor energia). Esses dois processos são chamados de excitação e emissão, respectivamente. A emissão segue a excitação de forma extremamente rápida, geralmente em nanossegundos, e é conhecida como fluorescência.

As moléculas fluorescentes podem ser conjugadas a outras moléculas ou serem utilizadas como corantes. Há uma diversidade de moléculas fluorescentes que podem ser utilizadas na citometria de fluxo e são úteis em uma ampla gama de aplicações, incluindo a identificação e quantificação de populações distintas de células, a imunofenotipagem, os experimentos de fluxo de cálcio, a determinação do conteúdo de ácido nucléico, a proliferação celular, a medição de atividade enzimática, os estudos sobre morte celular, entre muitos outros.

Vários fluoróforos podem ser excitados por um único *laser* e a CF é capaz de diferenciar os fluóforos devido ao uso de vários filtros. Esta característica dos citômetros de fluxo permite analisar vários parâmetros em uma única amostra e é a base dos estudos de fluorescência multicolorida, muito utilizada nos ensaios de imunofenotipagem. Nos ensaios multicoloridos, é muito comum utilizar anticorpos conjugados a fluoróforos pois os anticorpos se ligam com alta especificidade a uma região específica (epítipo) de uma



molécula presente em uma determinada população celular, e permitem quantificar as propriedades biológicas e bioquímicas da amostra (Figura 6).

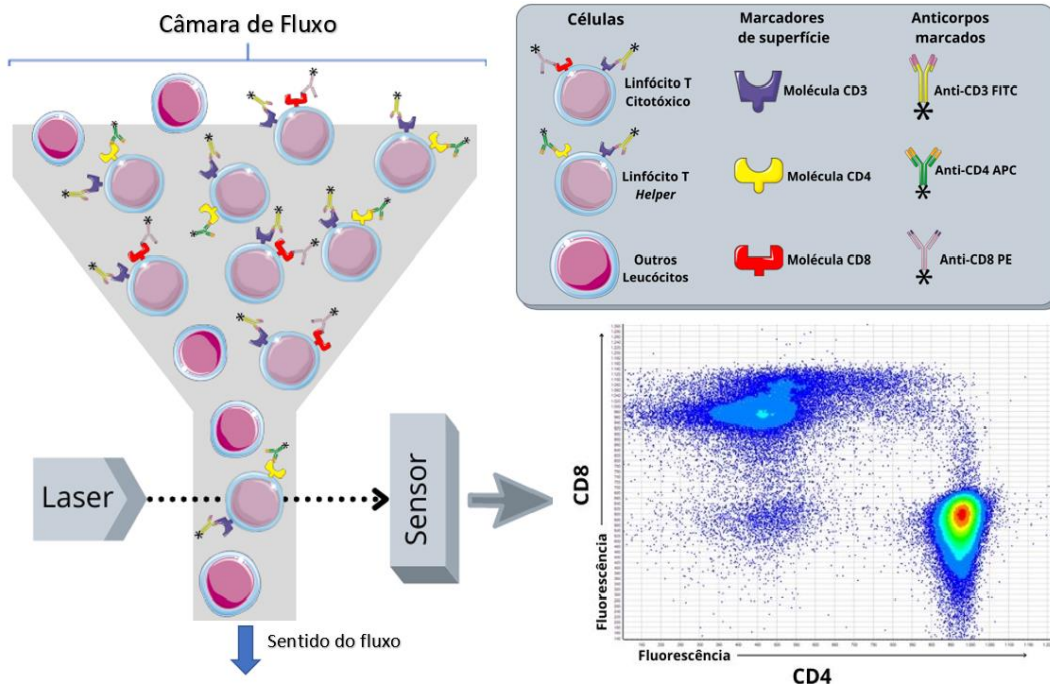


Figura 6. Exemplo de uma imunomarcção para identificação e quantificação de linfócitos T CD4 e CD8. Esta prática ainda é muito utilizada no laboratório clínico de rotina para o monitoramento de pacientes HIV positivos.

Os fluoróforos conjugados a anticorpos podem ser simples ou compostos (*Tandem Dyes*), sendo este último constituído por dois fluoróforos simples acoplados. Nos fluoróforos compostos, o primeiro fluoróforo é excitado e a energia emitida é transferida para o segundo, ativando-o e emitindo fluorescência em comprimento de onda 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 simples e compostos utilizados em CF.



Tabela 1. Fluoróforos utilizados em CF com seus picos de excitação e emissão.

Fluoróforos	Laser (nm)	Pico de excitação (nm)	Pico de emissão (nm)	Brilho relativo
Alexa Fluor 350	355	340	440	
Alexa Fluor 405	405	401	420	
eFluor 450	405	405	445	
Pacific Blue	405	401	452	
Alexa 488	488	495	519	
FITC	488	490	525	
PerCP	488	490	675	
PerCP-Cy5.5	488	490	695	
PE	488/561	496/546	578	
PE-Cy5	488/561	496/546	667	
PE-Cy7	488/561	496/546	785	
eFluor 660	640	633	660	
APC	640	650	661	
Alexa Fluor 647	640	650	665	
DyLight 650	640	654	673	
Alexa Fluor 700	640	702	723	
APC-Cy7	640	650	785	

Há moléculas que emitem fluorescência quando excitadas, que se ligam especificamente a constituintes celulares (DNA, RNA, mitocôndria, membrana plasmática etc.), e que não necessitam de conjugação com anticorpos para serem utilizadas em CF. Como exemplos, podemos citar o Iodeto de Propídio (PI), a 7-amino-actinomicina D (7-AAD), o Diamino-2-Fenilindol (DAPI) que, geralmente, são utilizados para análises de viabilidade baseadas na integridade da membrana celular. Neste tipo de ensaio, os corantes somente irão penetrar na célula quando a membrana não estiver íntegra, indicando morte celular. Estes corantes também podem ser utilizados para quantificar o DNA da célula e inferir a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (G1, S, G2/M). Neste caso, as células são previamente permeabilizadas. Um outro exemplo é a Rodamina 123, substância que emite fluorescência quando se acumula no interior da mitocôndria biologicamente ativa. Quando há perda do potencial de membrana da



mitocôndria, a Rodamina 123 deixa de ser acumulada, refletindo na redução da intensidade de fluorescência detectada.

Algumas moléculas não fluorescentes interagem com constituintes específicos das células. Nestes casos, estas moléculas são conjugadas a fluoróforos para serem detectadas por CF. Por exemplo, a Anexina-V é uma proteína utilizada para detectar células em apoptose por apresentar a propriedade biológica de se ligar à fosfatidilserina, molécula presente na superfície interna da membrana plasmática de células viáveis, mas que é translocada para a superfície externa da célula quando esta entra em apoptose. Já as proteínas fluorescentes, como a GFP e YFP (do inglês *green fluorescent protein* e *yellow fluorescent protein*, respectivamente), entre outras, são utilizadas como ferramentas de engenharia genética para avaliar a taxa de tradução, funcionando como um gene-repórter, ou seja, a população celular que expressar tal proteína será identificada por CF pela luz característica emitida.

Devido à natureza da CF, a emissão de uma partícula é detectada não em um único detector, mas em todos os detectores usados no experimento. Por exemplo, o FITC (isotiocianato de fluoresceína) emite fótons em diversos comprimentos de onda (nm) que correspondem à luz verde, amarela e alaranjada, todas as quais passíveis de detecção em um equipamento com múltiplos detectores. Em alguns experimentos, o FITC pode ser combinado com outros fluoróforos, como, por exemplo, PE (ficoeritrina), que emite fótons em comprimentos de onda (nm) correspondentes à luz amarela e alaranjada. Esta sobreposição parcial dos espectros é chamada de *overlap* e pode gerar resultados falsos-positivos (Figura 7). Nestes casos, a contribuição relativa de cada fluoróforo em um determinado detector deve ser especificamente determinada e descontado o sinal do outro fluoróforo. Este processo matemático, chamado de compensação, deve ser utilizado em todos os ensaios multicoloridos.

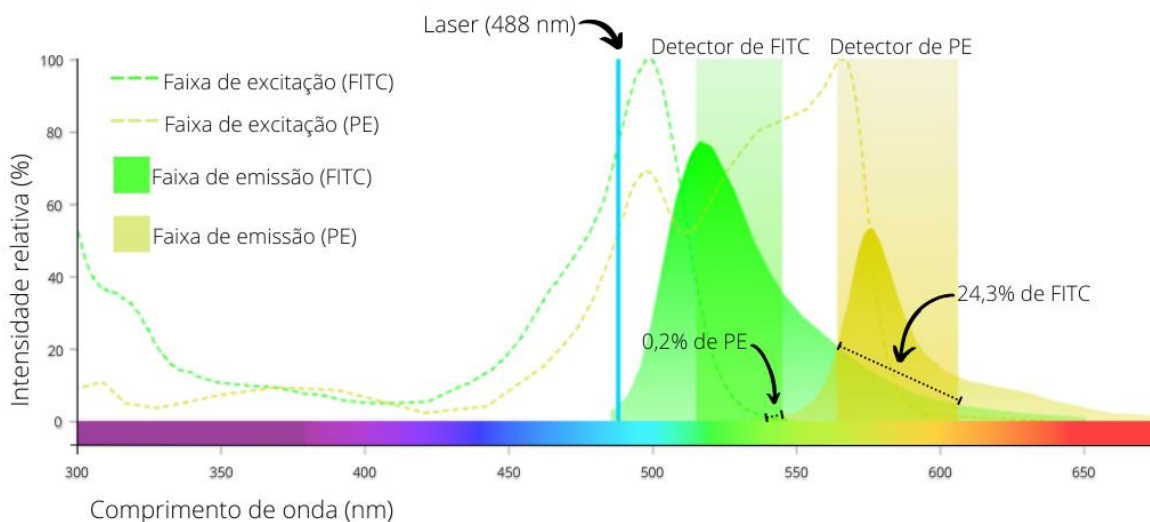


Figura 7. Visualizador de espectros de emissão e excitação (do inglês, *spectra viewer*). Neste exemplo, observamos que o mesmo *laser* (488 nm) excita ambos os fluoróforos (FITC e PE). No detector de FITC, há a detecção de uma pequena faixa (0,2%) da emissão do PE. Contudo, no detector de PE, a faixa de emissão do FITC detectada é de consideráveis 24,3%, denotando um alto *overlap* entre estes dois fluoróforos.

Para que a compensação seja realizada com êxito, recomenda-se a utilização de amostras controle marcadas individualmente com cada fluoróforo que será utilizado na análise, denominadas de controles com coloração única (do inglês *single stained controls* ou somente *single colors*). Com estas marcações simples, é possível ajustar o percentual de marcação somente para uma determinada fluorescência, traçando uma linha imaginária e avaliando a 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 automatizada, em *softwares* encontrados nos citômetros mais modernos. Após a compensação de cada fluoróforo, as amostras podem ser, então, adquiridas e analisadas, sem que haja sobreposições consideráveis 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. Portanto, podemos separar os componentes de excitação que trabalham para guiar os feixes de *laser* para o fluxo da amostra e os componentes de coleta que encaminham, filtram e coletam a luz dispersada e/ou a luz emitida pela amostra interrogada na câmara de fluxo, como veremos a seguir.

Feixes de *laser* são direcionados através de prismas e lentes para o núcleo da amostra na câmara de fluxo, onde ocorre a excitação da amostra e o espalhamento da luz





(Figura 8). A luz dispersada frontalmente (do inglês, *forward scatter* ou FSC) é coletada por um detector de estado sólido e remete ao tamanho da célula. Já a luz dispersada lateralmente (do inglês, *side scatter* ou SSC), remete à granulosidade ou complexidade interna da célula (Figura 9). O sinal da dispersão da luz, geralmente, é o primeiro resultado analisado em um experimento, e é visualizado em um gráfico contendo o parâmetro FSC no eixo X e SSC no eixo Y (Figura 10).

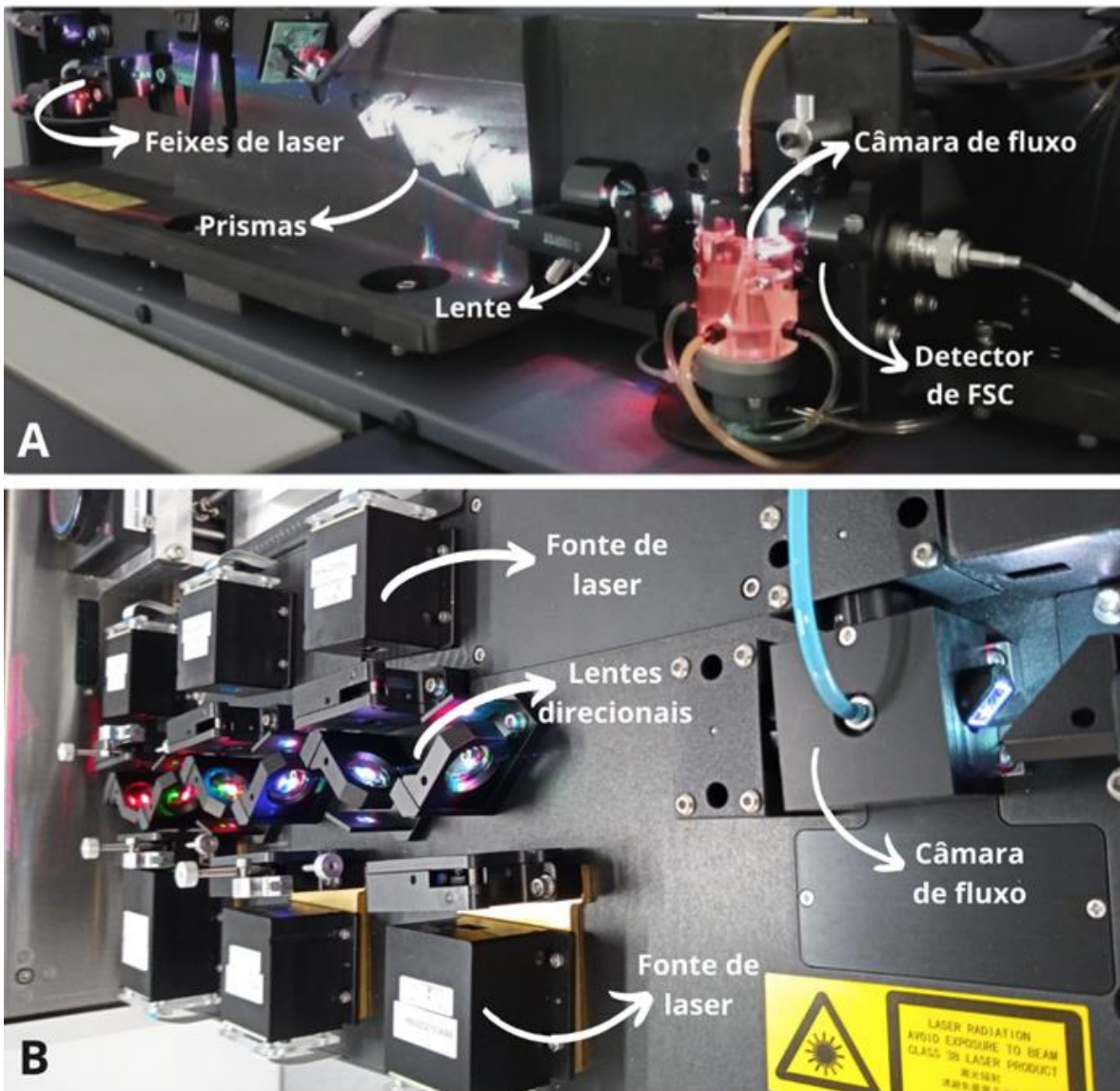


Figura 8. Imagens reais do interior de dois citômetros de fluxo de diferentes fabricantes. A imagem A apresenta os componentes de excitação (fontes de *laser*, prismas e lentes), a câmara de fluxo e o detector de FSC (fotodiodo). A imagem B apresenta um citômetro com outra tecnologia: são observadas 6 fontes de laser de diferentes cores, as lentes que direcionam os feixes de laser e a câmara de fluxo.

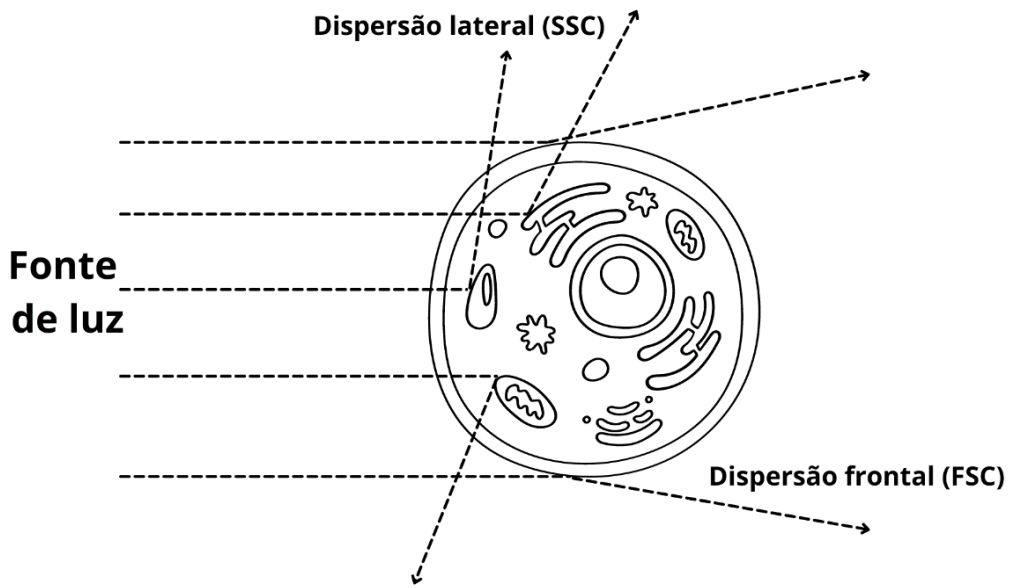


Figura 9. Esquema didático do modo em que a luz é dispersada, remetendo às informações morfológicas de uma célula por meio de suas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

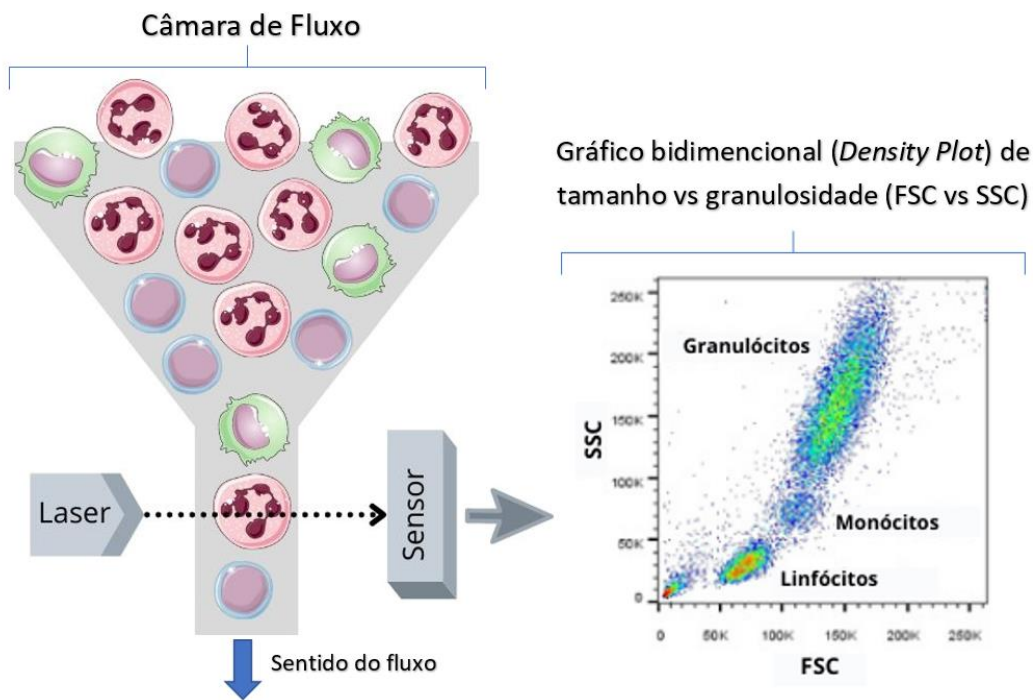


Figura 10. Demonstração da possibilidade de identificação de diferentes populações celulares somente por meio das características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), dispensando quaisquer tipos de marcações fluorescentes. Geralmente, utiliza-se este tipo de gráfico para ajustar o citômetro e identificar a amostra.



Os fótons emitidos pelos fluoróforos presentes na amostra são coletados e encaminhados por meio de cabos de fibra óptica para os detectores. Neste caminho, a luz passa por filtros e espelhos, nos quais determinadas faixas de comprimento de onda são transmitidas para serem coletadas pelos detectores correspondentes (Figura 11).

Desta forma, a luz fluorescente emitida é coletada por lentes em posições apropriadas e, em seguida, direcionada, por meio de cabos de fibra óptica, para um conjunto de filtros e detectores ópticos específicos. No exemplo dos componentes de coleta do citômetro A da Figura 11, os fótons resultantes do interrogatório do *laser* azul são transmitidos para detectores em uma matriz em formato octogonal, em que há filtros e espelhos na frente de cada detector. Estes refletem e transmitem fótons com comprimentos de onda específicos, garantindo que os fótons com comprimentos de onda maiores e com menor energia sejam transmitidos para o primeiro tubo fotomultiplicador (PMT), enquanto fótons com comprimentos de onda menores e com maior energia sejam refletidos e enviados para o detector subsequente, e assim por diante. No mesmo exemplo da Figura 11, 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 de outros *lasers* presentes no equipamento. Existem diversas marcas de citômetros de fluxo com outras configurações de *lasers* e filtros, bem como outros tipos e tecnologias de detecção, como observado no citômetro B da Figura 11, que possui vários filtros somente do tipo *bandpass* (como veremos logo adiante) que direcionam faixas específicas de luz diretamente para os detectores do tipo APD (fotodiodos em avalanche).

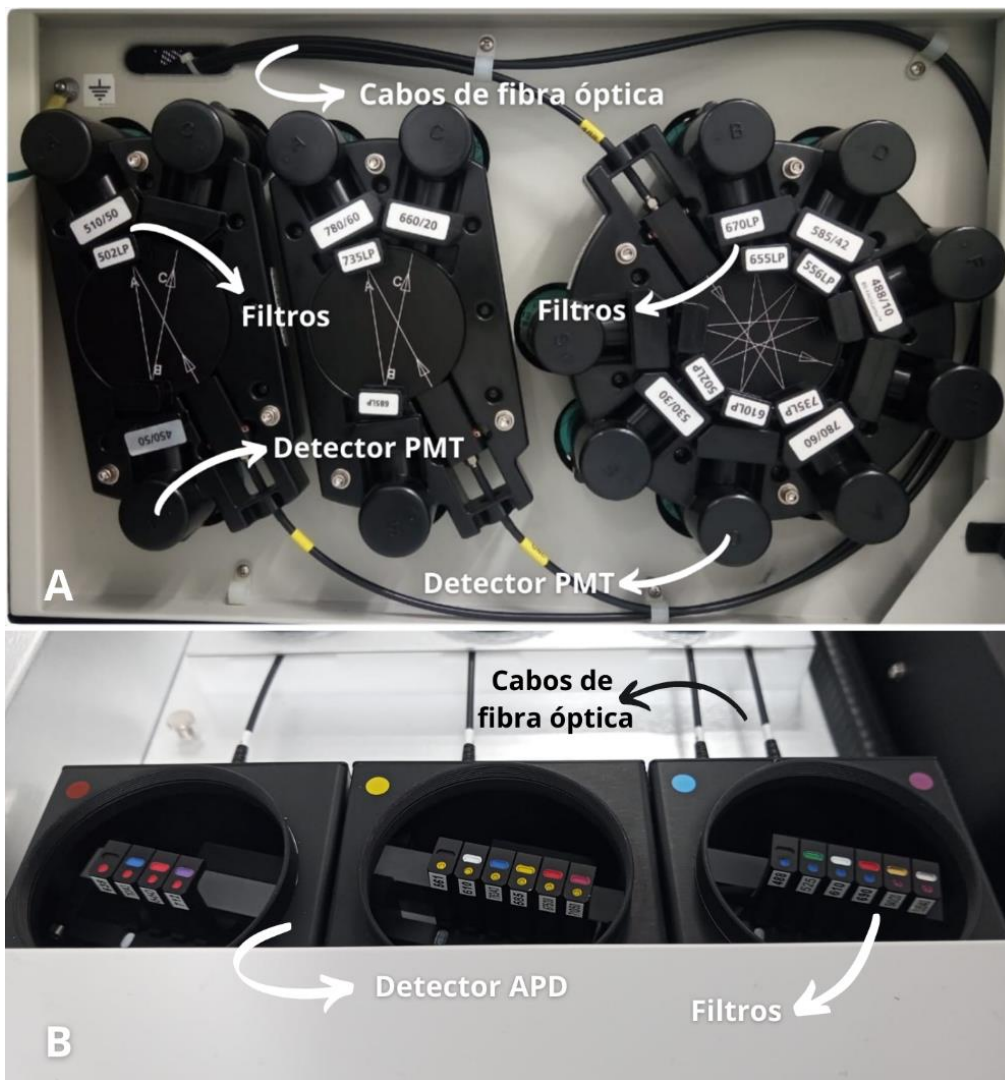


Figura 11. Imagens reais do interior de dois citômetros de fluxo de fabricantes diferentes, nos quais são encontrados os componentes de coleta da luz dispersada lateralmente (SSC) e das fluorescências emitidas pela excitação da amostra. Esta luz que passa pelos cabos de fibra óptica é filtrada e cada faixa de comprimento de onda específico é distribuída para os fotodetectores do tipo PMT (citômetro A) ou para os fotodiodos em avalanche, APDs (citômetro B).





Os filtros posicionados antes dos detectores podem ser classificados em três tipos: *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 luz igual ou menor que o comprimento de onda especificado (Figura 12).

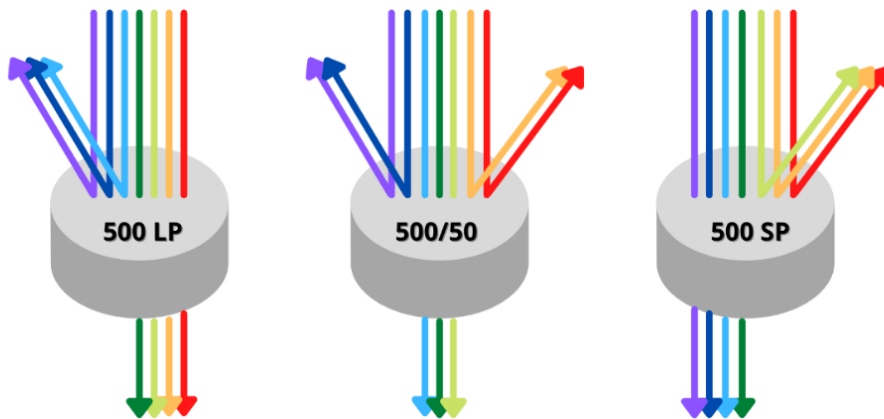


Figura 12. Esquema didático dos filtros *longpass* (LP), *bandpass* e *shortpass* (SP), em ordem de esquerda para direita, mostrando como exercem a filtração do espectro de luz em um citômetro de fluxo.

Eletrônica

As principais funções do sistema eletrônico são converter sinais de luz em dados numéricos digitais e eliminar o sinal de pequenos eventos como ruídos eletrônicos e *debris*. Isto é feito com uso de um *threshold*, uma espécie de limiar ou região de corte de dados não relevantes para favorecer a análise das células ou partículas que realmente interessam. Um *threshold* é definido em um, ou, possivelmente, em dois parâmetros, de modo que o sinal seja detectado apenas quando o sinal estiver acima desse nível especificado (Figura 13).

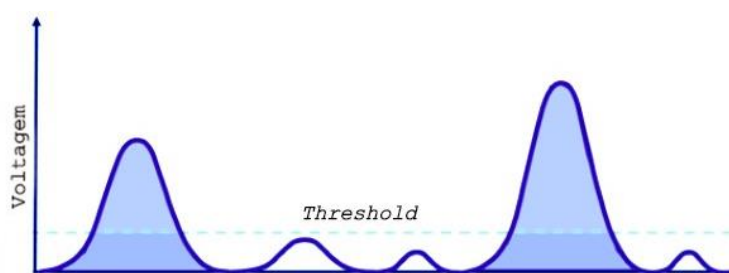


Figura 13. Gráfico representativo de como funciona um *threshold*. Somente os valores acima da linha tracejada são gravados pelo computador e considerados para a análise.

Para que a luz detectada seja convertida em dados, são necessários três componentes: fotodetectores, 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 visualizados em gráficos 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. Conforme os pulsos são gerados, sua quantificação é necessária para que os sinais de dispersão da luz e fluorescências sejam exibidos em gráficos, analisados e interpretados. Este é o trabalho da eletrônica de processamento de sinal.

À medida que a célula ou partícula passa pelo feixe de *laser*, 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 14). 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 grupos celulares. A medição de cada detector é referida como um parâmetro que pode ser exibido em valores de altura ou *height* (H), área (A) e largura ou *width* (W) nos histogramas e demais gráficos no *software* do citômetro de fluxo.



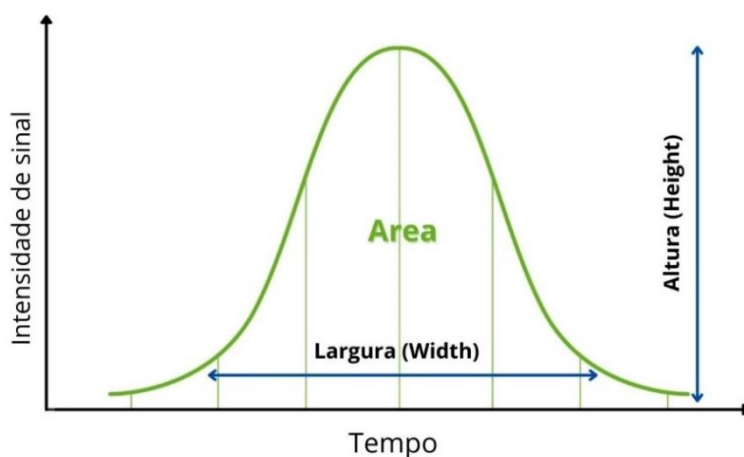


Figura 14. Esquema didático representativo de um pulso de sinal de um único evento. *Height* (H) representa a quantidade máxima de saída de corrente pelo detector; *Width* (W) indica o intervalo de tempo durante o qual o pulso ocorre, ou seja, o tempo em que a célula passa pelo *laser*, e *Area* (A) remete à área integral do pulso.

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 fotodetector começará a subir, atingindo o pico quando a partícula estiver localizada no centro do feixe de *laser*. Nesse ponto, a partícula estará totalmente iluminada (os fótons estarão 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 14). O somatório de todos os eventos adquiridos de uma amostra irá compor os gráficos de citometria.

Cada evento (célula ou partícula) gerará um valor numérico, que será salvo e exibido graficamente. Por exemplo, vamos considerar dois eventos, contendo dois parâmetros de intensidade de fluorescência, plotados um contra o outro, em um gráfico de dispersão (*dot plot*) (Figura 15). O evento 1 gerará um sinal de 300 no detector do PE e de 550 no detector do FITC. Estes valores serão mapeados no gráfico de dispersão, contendo o parâmetro FITC no eixo X e PE no eixo Y. O evento 2 possui sinal de 9500 para PE e de 12500 para FITC. A Figura 15 demonstra como estes dois eventos ficariam representados no gráfico. Assim ocorre, sucessivamente, com todos os eventos analisados da amostra. Ao analisar os dados





obtidos, observa-se um acúmulo de eventos nos gráficos e as diferenças entre as populações podem ser detectadas (Figura 16).

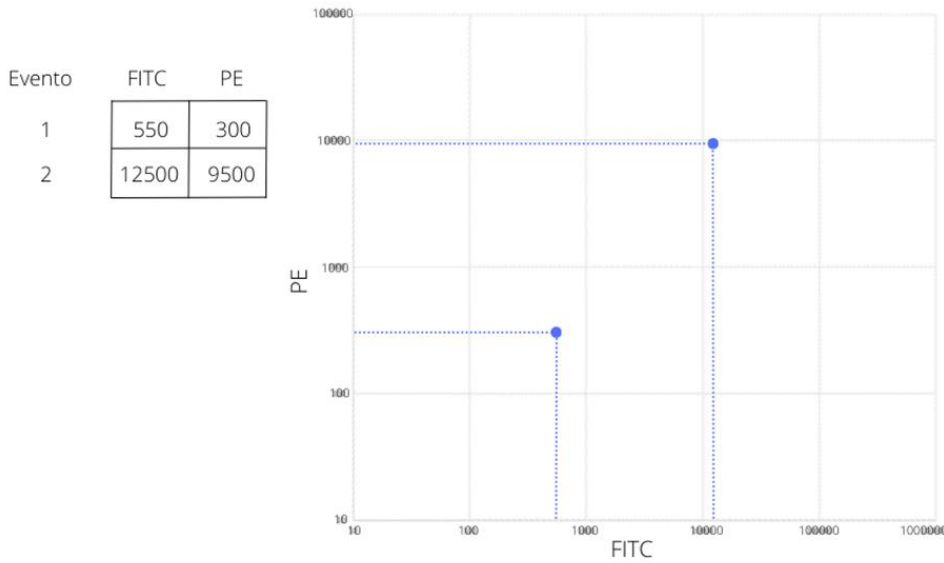


Figura 15. Gráfico demonstrativo de apenas dois pontos numéricos convertidos pelo sistema eletrônico, que representam dois pulsos únicos de sinal, ou seja, dois únicos eventos (duas células que passaram pelo ponto de interrogação no feixe do *laser*).

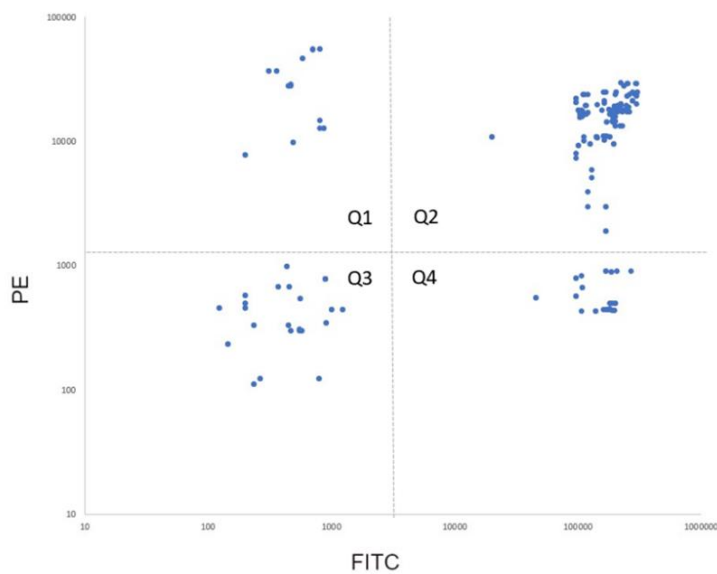


Figura 16. Exemplo de um gráfico de citometria (*dot plot*), no qual cada ponto do gráfico representa o valor numérico da intensidade de fluorescência de dois parâmetros ao mesmo tempo (de PE e de FITC). O gráfico foi dividido em quatro quadrantes, que representam a positividade ou não de ambos os fluoróforos, onde Q1 = PE+/FITC-; Q2 = PE+/FITC+; Q3 = PE-/FITC- e Q4 = PE-/FITC+. Lembrando que, em CF, todos os resultados são comparativos e os quadrantes são definidos com os controles não marcados e isotópicos no momento da aquisição dos dados no citômetro de fluxo.



O número de eventos adquiridos para cada amostra é geralmente determinado antes da análise. Um valor de aquisição convencional é de cerca de 10.000 eventos/amostra. No entanto, esse valor pode variar e chegar a mais de 100.000 eventos/amostra, dependendo do objetivo experimental. Em citometria, sempre será necessário o uso de controles (por exemplo, controles sabidamente negativos e positivos para determinada fluorescência) para servirem de base para configurar as voltagens e/ou ganhos dos fotodetectores, e, assim, adquirir as amostras, tendo-se um padrão de comparação.

Uma vez finalizada a aquisição das amostras de um determinado experimento, os dados recebidos e armazenados pelo computador permitirão a análise numérica e estatística descritiva, além da exibição gráfica dos resultados. Os dados armazenados dos experimentos podem ser convertidos em arquivos específicos (como arquivos FCS) para que possam ser analisados e comparados com os resultados de outros experimentos em softwares específicos de análise de dados, conforme a necessidade do analista e/ou pesquisador.

Princípios de preparo de amostras: controles necessários para uma análise de dados adequada

Antes mesmo de iniciar um experimento, o investigador define sua hipótese experimental para poder escolher e projetar os melhores fluoróforos e, assim, obter todas as informações necessárias. As perguntas a serem feitas são: (1) Quais populações de células devem ser investigadas e quantos marcadores são necessários para definir adequadamente essas populações? (2) Os marcadores específicos de interesse são expressos na superfície celular ou intracelular? (3) Os antígenos são expressos com alta ou baixa densidade? (4) Qual área no gráfico de dispersão deve ser selecionada para distinguir as células de interesse?

Outra questão a se levar em consideração é a presença de células mortas em uma amostra, pois isso pode afetar o sinal detectado e, portanto, a qualidade dos dados obtidos.



As células mortas têm maior autofluorescência do que as células viáveis e nelas ocorrem mais ligações de anticorpos de forma inespecífica, o que pode dificultar a identificação de amostras fracamente positivas e de populações raras. Além disso, no geral, as células inviáveis geralmente são excluídas dos resultados por não serem importantes para a maioria das análises. Por isso, recomenda-se o uso de corantes para distinguir as células vivas das mortas, como mencionado anteriormente.

Com relação aos controles necessários para uma análise satisfatória, o primeiro indicado é o controle não marcado (*unstained control*), que deve ser preparado como amostra, mas sem a adição de qualquer corante fluorescente. Este controle é usado para identificar a população celular e avaliar a autofluorescência das células. O controle não marcado juntamente com os controles com coloração única (*single stained controls*) são utilizados para realizar o procedimento de compensação, descrito anteriormente.

Nas análises de imunofenotipagem, além dos controles descritos acima, o controle isotípico (*isotype control*) é essencial. O controle isotípico consiste em uma amostra contendo anticorpos não relacionados, ou seja, anticorpos que não possuem afinidade aos componentes da amostra, mas são dos mesmos isotipos e conjugados com os mesmos fluoróforos que os anticorpos que serão utilizados nas amostras.

O controle isotípico é imprescindível para determinar a interação inespecífica dos anticorpos com a amostra, pois estes podem se ligar de maneira inespecífica a receptores presentes na superfície de determinadas populações celulares, a componentes intracelulares, ou a fragmentos celulares formados durante os processos de morte celular. Desta forma, a interação inespecífica será detectada e será definido o sinal negativo. A partir deste sinal, pode-se observar o deslocamento das amostras com marcações positivas.

Cabe destacar que se a amostra possui receptor com alta afinidade para a região constante do anticorpo, como os receptores Fc em células do sistema imunológico, é necessário bloquear estes receptores. Há alguns protocolos descritos na literatura com o uso de soro e outras alternativas comerciais.

Por fim, um outro tipo de controle tem sido utilizado de forma crescente nos ensaios de imunofenotipagem, em situações em que controles isotípicos e sem marcação



não são a melhor estratégia para definir de forma exata o ponto de corte entre as populações positiva e negativas. Tratam-se dos controles de “fluorescência menos um” (do inglês, *Fluorescence-minus-one* ou *FMO*), que revelam a fluorescência máxima esperada para uma determinada coloração, em um determinado canal, quando o reagente utilizado nesse canal é omitido da amostra. O raciocínio por trás do uso desses controles é o seguinte: os valores exibidos para a fluorescência associada às células em um determinado filtro incluem a autofluorescência intrínseca da célula somada à fluorescência resultante da ligação do reagente utilizado. A variação nessas medições, que tende a ser mais visível em células com pouca ou nenhuma fluorescência associada, é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo a compensação. Como as correções de compensação diferem de acordo com a quantidade dos reagentes presentes nas células, é importante determinar, de forma independente, o limite entre as células positivas e negativas para cada marcação. Isso é feito usando os controles FMO para todos os fluoróforos usados no experimento, exceto um deles (por exemplo, um controle FMO FITC contém todos os fluoróforos, exceto o FITC).

Análise de dados

Os dados podem ser exibidos com diferentes opções de escala. Convencionalmente, os dados da citometria de fluxo são exibidos em escala logarítmica (log) ou em escala linear, dependendo do tipo de amostra ou componente celular. Por exemplo, nas análises de ciclo celular utiliza-se escala linear para detectar a quantidade de DNA da célula. Neste tipo de experimento, pretende-se definir as fases G1, S, G2/M do ciclo celular, sabendo-se que a fase G2/M possui o dobro da quantidade de DNA que a fase G1 devido ao processo de duplicação do DNA durante a mitose. Por outro lado, quando analisamos uma amostra heterogênea em que há tipos celulares com morfologias muito distintas entre si, provavelmente a escala log se enquadraria melhor para visualização de todas as populações no gráfico de FSC por SSC. Mesmo assim, os dados obtidos em escala log podem não ser capazes de mostrar todos os resultados de maneira ideal porque alguns dados podem estar plotados sobre o eixo ou abaixo do mesmo. Neste caso, recomenda-se usar a



escala biexponencial, que utiliza escala logarítmica típica na extremidade superior e faz a transição para escala linear em torno de zero, exibindo os eventos que geraram resultados próximos ou abaixo de zero. A alteração da escala altera somente a apresentação visual dos dados e permite analisar os eventos com baixos valores, sem que haja perda de informações (Figura 17).

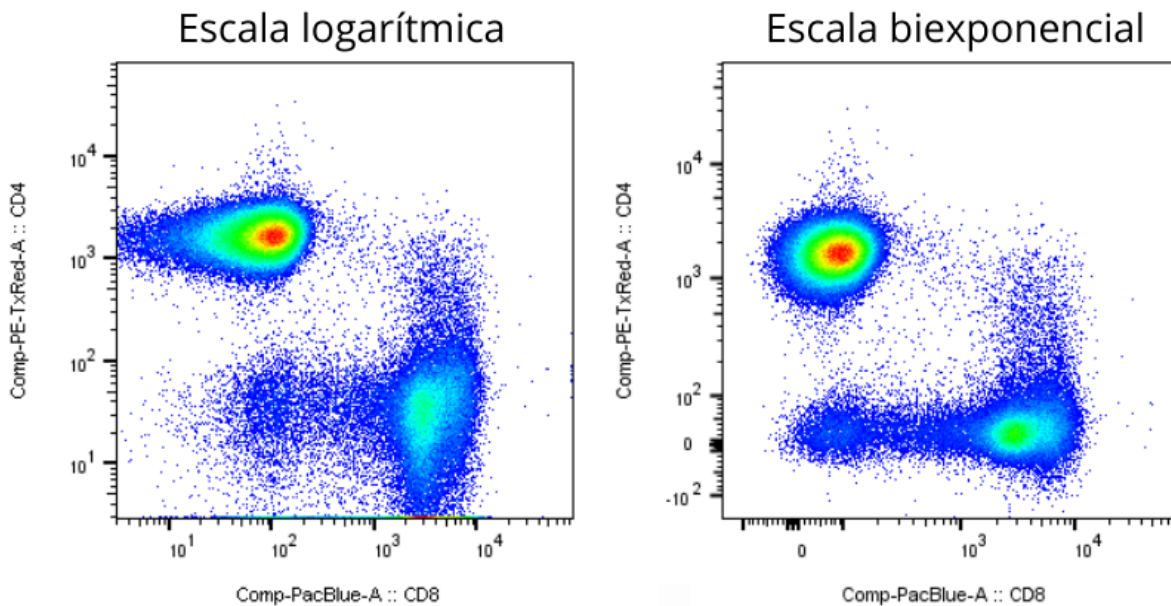


Figura 17. Demonstração dos mesmos dados em um gráfico na escala log e em outro na escala biexponencial.

A análise de dados é muito orientada graficamente. Os quatro principais tipos de gráficos que representam dados de citometria são: histograma, *dot plot*, *density plot* e *contour plot* (Figura 18).

O histograma representa a intensidade de um único parâmetro (eixo X) em relação ao número de seus eventos (eixo Y). Eventos com maior intensidade de sinal ou fluorescência aparecem mais à direita do eixo X, enquanto que eventos com maior número apresentam um pico mais alto no eixo Y (Figura 18A). O *dot plot* representa dois parâmetros, simultaneamente, e cada ponto que aparece no gráfico indica um único evento (célula ou partícula)(Figura 18B). Quanto mais acima no eixo Y e mais à direita no eixo X, maior é a intensidade de sinal ou fluorescência dos parâmetros representados em cada eixo. O *density plot* (Figura 18C), além de apresentar as mesmas características do *dot plot*, dá a impressão de 3° dimensão, usando diferentes intensidades de cores. Os eventos



que apresentam as mesmas características ou muito semelhantes são representados com a mesma cor no gráfico, demonstrando a concentração de eventos semelhantes, ou seja, uma população. Por fim, o *contour plot*, da mesma forma que o *density plot*, dá a impressão de 3° dimensão, porém, desta vez, ao contar os eventos, utiliza um formato similar aos mapas topográficos (Figura 18D).

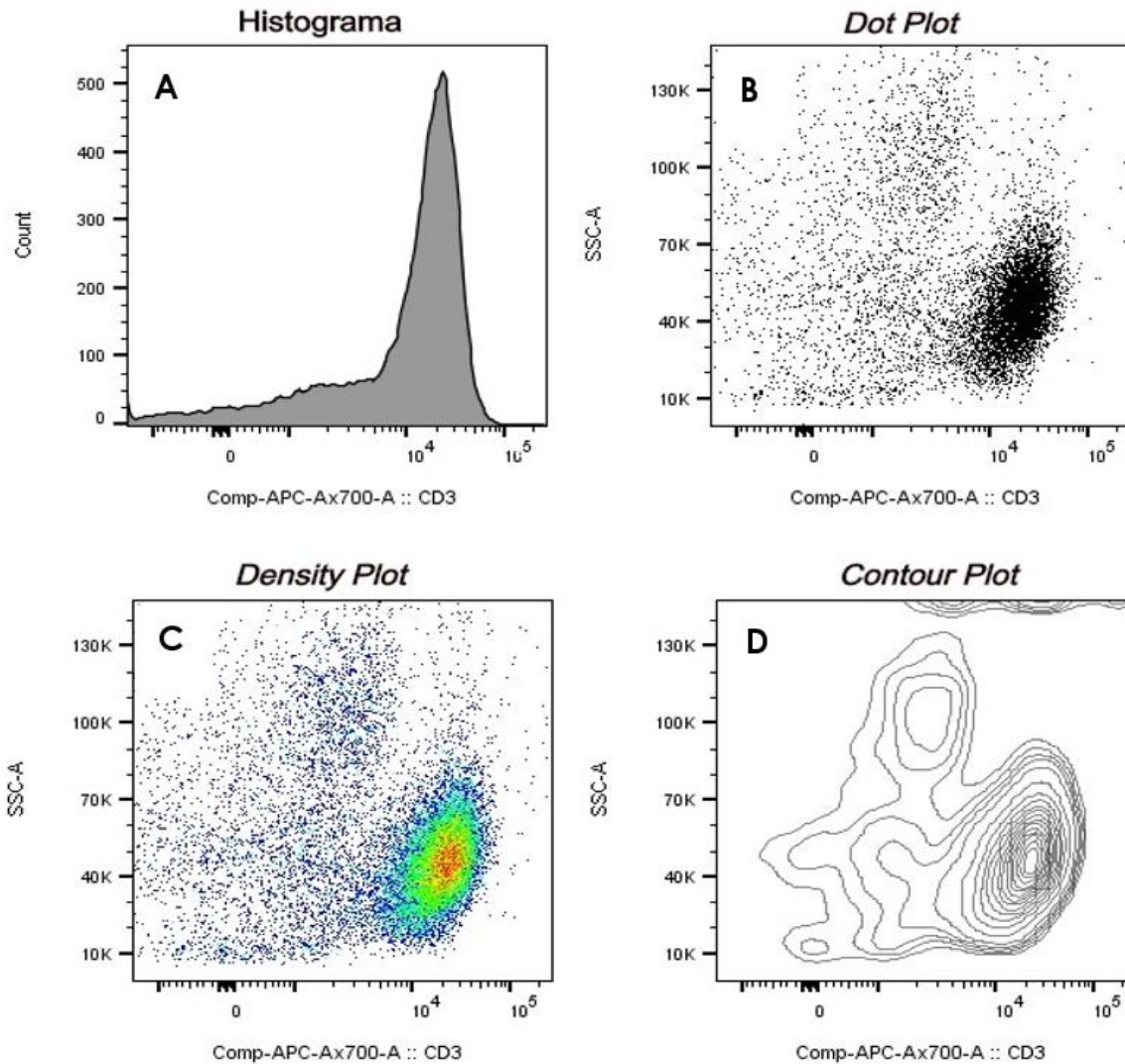


Figura 18. Os quatro principais tipos de gráficos que representam dados de citometria (histograma, *dot plot*, *density plot* e *contour plot*).

Para delimitar um subconjunto de dados nos gráficos, utilizamos a ferramenta chamada *gate*. As *gates* geram um limite numérico, selecionando um conjunto fechado de eventos em um gráfico. Ao selecionar uma população com *gate*, é possível exibir e analisar



a informação selecionada em outro gráfico utilizando outros parâmetros. Dentro dessa população, pode-se selecionar outra subpopulação com outra *gate*, e assim sucessivamente, até que uma hierarquia dessas populações seja obtida. Além disso, ao selecionar tais populações por meio de *gates*, pode-se destacá-las com diferentes cores com o *software* do citômetro para identificá-las visualmente nos gráficos. Estas ferramentas são utilizadas para determinar a porcentagem de cada população/subpopulação celular e gerar cálculos estatísticos, como média, mediana, coeficiente de variação, entre outros. Portanto, o uso de *gates* é de extrema importância na análise e interpretação dos resultados obtidos por CF.

Como exemplo, podemos observar na Figura 19 uma estratégia de *gates* para identificação da porcentagem de linfócitos T *helper* (CD4) e linfócitos T citotóxicos (CD8) viáveis em uma amostra de sangue periférico. A *gate* 1 baseou-se nas características de tamanho vs granulosidade (FSC vs SSC) para separar uma população de linfócitos totais. Então, dentro desta população, optou-se por separar as células vivas das células mortas pela marcação com o corante de DNA (PI), selecionando as células vivas como demonstrado na *gate* 2. A seguir, dentro do conjunto das células viáveis, a população de linfócitos T (CD3) foi identificada pela intensidade de fluorescência deste marcador (anticorpo anti-CD3 conjugado ao fluoróforo APC) (*gate* 3). Por último, dentro da população dos linfócitos T, as subpopulações CD4 e CD8 foram identificadas baseadas na fluorescência dos marcadores e as porcentagens estabelecidas (76,8% de CD4 e 19,7% de CD8) através dos quadrantes da *gate* 4 .

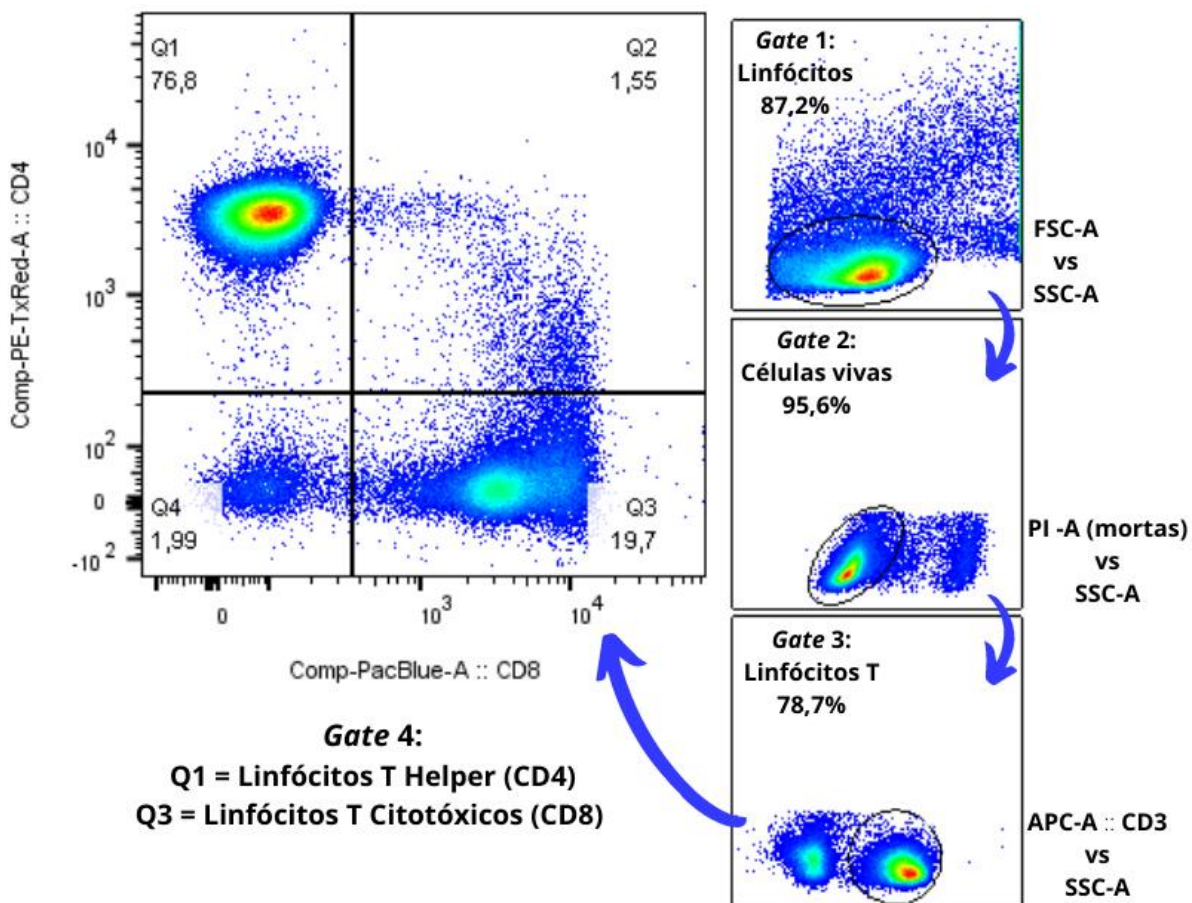


Figura 19. Exemplo de uma estratégia de *gates* para identificação da porcentagem de linfócitos T *helper* (CD4) e linfócitos T citotóxicos (CD8) viáveis em uma amostra de sangue periférico.

Quando há necessidade de se analisar a mudança na intensidade de fluorescência de um determinado marcador em uma população de células para demonstrar um aumento ou diminuição de sua expressão, geralmente utiliza-se a MFI (do inglês, *Median of Fluorescence Intensity*) em gráficos do tipo histograma (Figura 20). Assim, pode-se comparar a amostra com os controles (não marcado, isotipo, FMO, etc.) e avaliar se há diferença na intensidade do sinal. Cabe ressaltar que, neste tipo de análise, o uso da mediana realmente é o mais indicado, pois o cálculo da média aritmética não expressa muito bem a realidade em uma escala logarítmica; além disso, em distribuições não normais, a média é facilmente afetada por valores discrepantes.



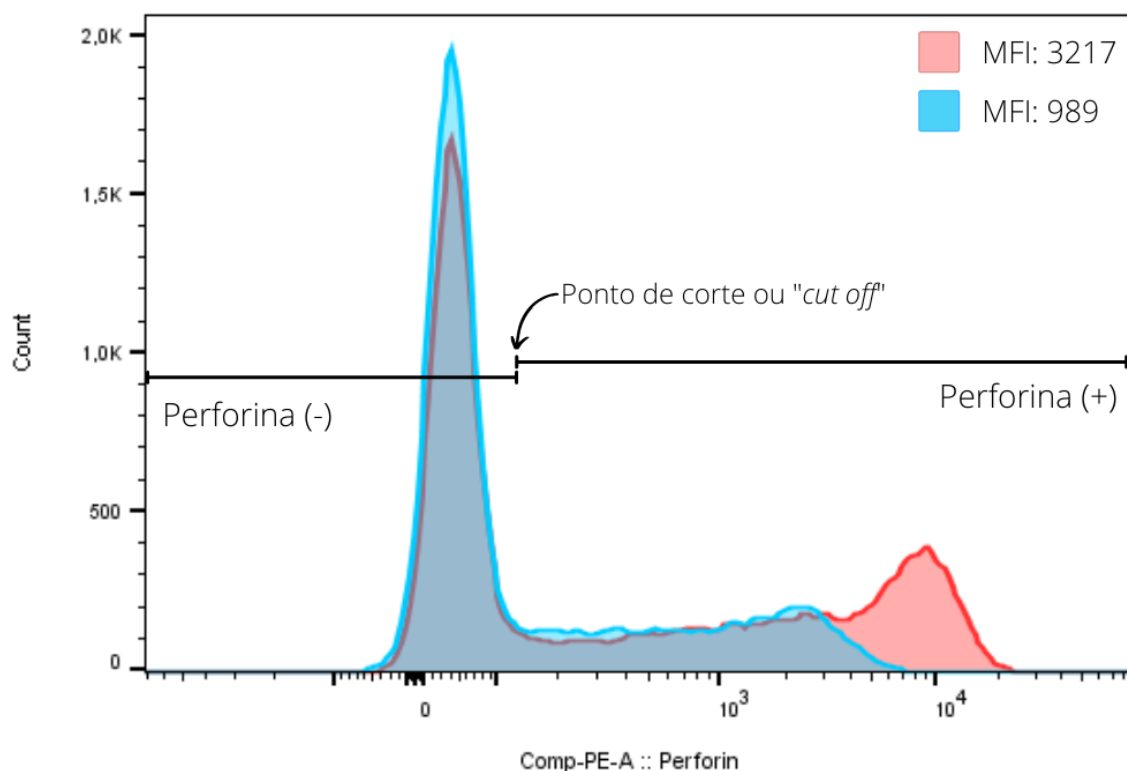


Figura 20. Comparação entre populações de linfócitos T citotóxicos (CD8) oriundos de duas amostras diferentes de sangue periférico.

O resultado de cada amostra está apresentado em histogramas sobrepostos (overlaid). Neste exemplo, pode-se visualizar a diferença de expressão do marcador “perforina” entre as amostras analisadas no gráfico. Para obter o valor de MFI das populações ativadas (perforina +), estas foram selecionadas a partir da linha de corte. A população destacada em vermelho possui MFI de 3217, mostrando maior expressão de perforina do que a população destacada em azul, com MFI de 989.

Há inúmeras abordagens e também muitos outros tipos de desfechos a serem analisados, dependendo dos objetivos de cada pesquisa. Em geral, uma vez realizados todos os ensaios e obtidos os resultados, procede-se à elaboração de gráficos comparativos, tabelas e análises estatísticas em *softwares* próprios de análise de dados.

O objetivo deste capítulo foi introduzir os conceitos e as ferramentas básicas de análise de dados obtidos por CF.



Sorting é uma tecnologia 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 são utilizadas para diversas finalidades, como cultivo celular para expansão da população para futuros experimentos *in vitro*, análises microscópicas e moleculares, bem como uma crescente aplicação na medicina reprodutiva e de transplantes.

O início do processo de separação celular por *sorting* é semelhante aos processos analíticos. Portanto, deve-se adquirir a amostra, elaborar os gráficos, realizar a compensação (caso necessária), e proceder à elaboração das devidas *gates* para identificar as células que serão separadas por *sorting*.

Ao passar pelo ponto de interrogação, o evento é analisado e pode ou não possuir os critérios selecionados nas *gates* feitas previamente. As partículas continuam percorrendo o caminho pelo fluxo até chegar o momento em que o fluxo se quebra em gotas, devido à vibração em alta frequência de uma peça chamada *nozzle*. As gotas geradas podem conter partículas de interesse e partículas que não cumprem os critérios de seleção, ou não conter qualquer partícula. Todavia, um dos parâmetros mais críticos do *sorting* é a medida do tempo entre o ponto de interrogação e o ponto exato em que a gota se quebra. O tempo e, portanto, a distância, é chamado de *drop delay*. Quando a partícula chega ao espaço referente à última “gota” ainda conectada, o fluxo é carregado. Portanto, quando a gota contendo a partícula de interesse se desprender do fluxo contínuo, estará carregada eletricamente.

Então, por meio de procedimentos prévios específicos de configuração realizados no citômetro, há a estabilização da pressão indicada para a faixa de tamanho das células, geração de carga elétrica aplicada ao fluxo, vibração em alta frequência para formação de gotas e sua estabilização após a passagem pela câmara de fluxo. Com isso, o software comandará o equipamento de tal forma que apenas a gota que contém a partícula de



interesse reterá a carga recebida e, à medida que as gotículas passarem entre duas placas de deflexão, apenas as gotículas carregadas serão desviadas e separadas em recipientes de coleta. As gotículas não carregadas passarão para o aspirador de resíduos e serão descartadas (Figura 21).

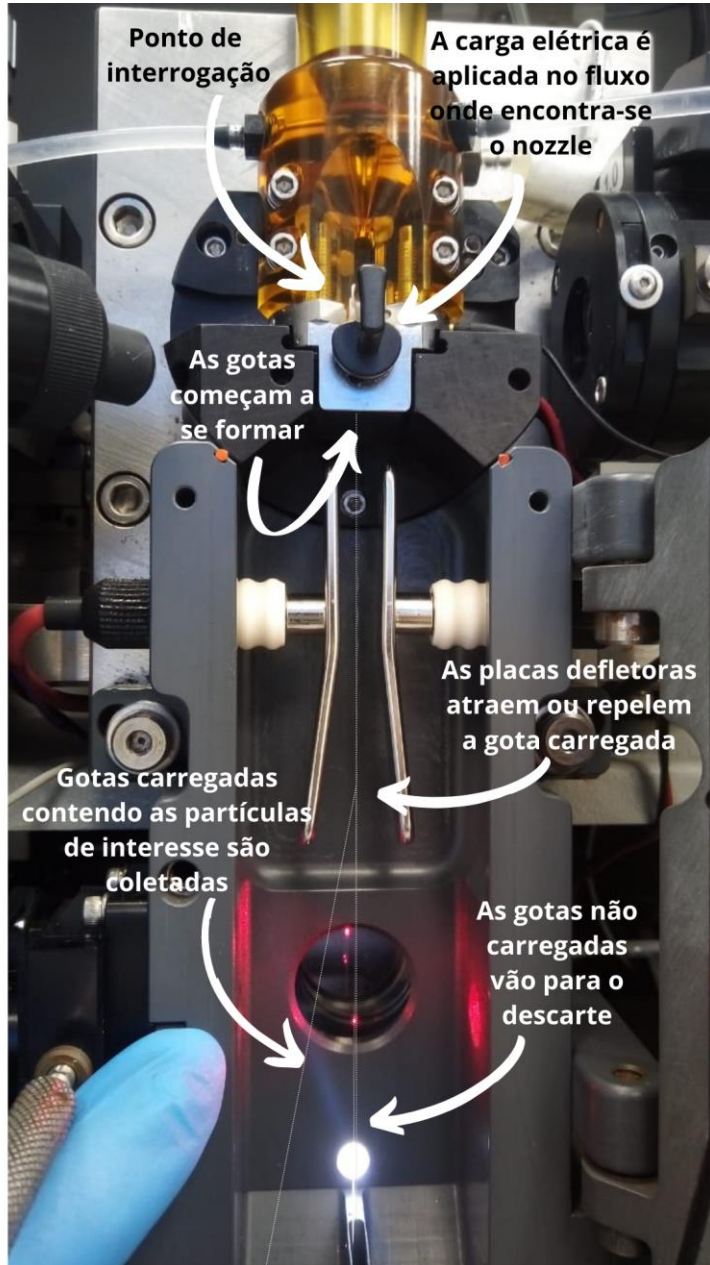


Figura 21. Imagem real da câmara de fluxo e dos componentes de separação celular de um citômetro *Cell Sorter*.



Ocasionalmente, as gotas podem conter mais de uma partícula e interferir no resultado do experimento. Basicamente, os citômetros trabalham com 3 tipos de *sorting*: rendimento, pureza e célula única (*single cell*), que serão explicados de forma resumida a seguir.

Se a intenção for um maior rendimento, todas as gotas contendo as células de interesse serão separadas, mesmo que, eventualmente, haja gotas contendo células de interesse e células que não cumprem o critério, ou possível contaminação pelas gotas adjacentes. Caso a intenção seja 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. Já o uso do parâmetro *single cell* se dá quando há necessidade do máximo grau de pureza possível, aplicando-se principalmente à seleção de clones celulares, ao serem separadas células únicas em cada um dos poços de uma microplaca de 96 cavidades, por exemplo. Portanto, deve-se definir previamente o objetivo do *sorting*, pois disso dependerá o sucesso dos experimentos e os resultados das pesquisas.



Créditos

1. Figuras provenientes do site “<https://smart.servier.com>” publicadas por LES LABORATOIRES SERVIER. Último acesso 28/01/2022.
2. Imagens editadas na versão gratuita do software online Canva no site “<https://canva.com>”. Último acesso 28/09/2021.
3. Software utilizado para elaboração dos gráficos de citometria de fluxo – FlowJo™ Software (for Windows) Version 10.8. Ashland, Becton, Dickinson and Company; 2021.

Referências

1. Adan, A. *et al.* Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.*, 37(2): 163–176, 2017.
2. Basu, S.; Campbell, H.M.; Dittel, B.N. and Ray, A. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). *J. Vis. Exp.*, 41: 1546, 2010.
3. Becton, Dickinson and Company. **Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide**. 2002. Disponível em: <<https://www.bu.edu/flow-cytometry/files/2010/10/BD-Flow-Cytom-Learning-Guide.pdf>>. Acessado em: 28/01/2022.
4. BIO-RAD. **Flow Cytometry Basics Guide**. 2021. Disponível em: <<https://www.bio-rad-antibodies.com/introduction-to-flow-cytometry.html>>. Acessado em: 28/01/2022.
5. Drescher, H.; Weiskirchen, S. and Weiskirchen, R. Flow Cytometry: A Blessing and a Curse. *Biomedicines*, 9: 1613, 2021.
6. Duarte, Alberto José da Silva (org). **Citometria de Fluxo Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.
7. Errante, P.R. *et al.* Flow Cytometry: a literature review. *Rev Ciênc Méd Biol*, Salvador, v.14, 2: 211-224, 2015.
8. Jaroszeski, M.J. and Radcliff, G. Fundamentals of Flow Cytometry. *Molecular Biotechnology*, 11:37-53, 1999.

9. McKinnon, K.M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120: 5.1.1-5.1.11, 2019.
10. Ormerod, M.G. **Flow Cytometry: A Basic Introduction**. 2008. Disponível em: <<https://flowbook.denovosoftware.com/>>. Acessado em: 28/01/2022.
11. Rodríguez-Casuriaga, R. and Geisinger, A. Contributions of Flow Cytometry to the Molecular Study of Spermatogenesis in Mammals. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 1151, 2021.
12. Shapiro, H.M. **Practical Flow Cytometry**. Ed. John Wiley & Sons. 4th Edition, 2003.
13. Tung, J.W. *et al.* Modern Flow Cytometry: A Practical Approach. *Clin Lab Med*, 27: 453-468, 2007.
14. Verschoor, C.P. *et al.* An introduction to automated flow cytometry gating tools and their implementation. *Front. Immunol*, 6: 380, 2015.

