

Artigo / Article

Utilização de saponina em citometria de fluxo: uma alternativa factível para permeabilização celular

Use of saponin in flow cytometry: a feasible alternative to cellular permeabilization

Juliana Pereira¹

Graciela A. Brocardo-Lima²

Beatriz Beitler¹

Dalton A. F. Chamone¹

A pesquisa de antígenos intracelulares por citometria de fluxo é essencial para o estudo imunofenotípico das doenças onco-hematológicas. A utilização de saponina para permeabilização celular tem se mostrado eficaz e de menor custo. Com suas propriedades detergentes, permeabiliza a membrana citoplasmática sem danificá-la ou alterar a expressão dos antígenos de membrana, permitindo a detecção simultânea de antígenos intracelulares e de superfície. O objetivo deste trabalho foi analisar a eficácia da técnica de permeabilização celular com a utilização de saponina como agente permeabilizante. Foram avaliadas 36 amostras de sangue periférico e de medula óssea enviadas ao Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para estudo imunofenotípico. Realizamos a técnica de imunofluorescência direta e utilizamos o programa CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA) do citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) para aquisição e análise dos dados. Observamos excesso de perda celular quando utilizamos o tampão de lavagem estocado por período superior a sete dias, à temperatura de 2°C a 8°C, e perda mínima com tampão de lavagem recém-preparado ou congelado no momento do preparo e descongelado apenas no momento do uso. Para eliminar o excesso de perda celular realizamos análise sistemática das etapas da técnica, o que nos permitiu adequá-la e utilizá-la na rotina de nosso laboratório. Em país de recursos escassos padronizamos uma técnica viável para pesquisar antígenos intracelulares por citometria de fluxo, mais rápida, eficaz e com redução dos custos financeiros em 35%. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(2):109-113.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; membrana citoplasmática; saponina, permeabilização celular; antígenos intracelulares.

Introdução

A pesquisa de antígenos intracelulares (nuclear e citoplasmático) por citometria de fluxo (CMF) é essencial durante o estudo imunofenotípico das doenças onco-hematológicas. Alguns antígenos específicos de linhagem como a mieloperoxidase (MPO), a deoxinucleotidiltransferase

terminal (TdT) e CD79a localizam-se respectivamente no núcleo e citoplasma.¹ Por outro lado, alguns antígenos como CD22,² CD3^{3,4} e a cadeia pesada de imunoglobulina μ (IgM) são encontrados apenas no citoplasma em uma fase precoce da maturação celular. Para detectar a presença destes antígenos é preciso permeabilizar a membrana citoplasmática antes da marcação com anticorpos específicos.⁵

¹Médico(a) da Disciplina e Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

²Pós-graduanda da Disciplina de Hematologia da Universidade de São Paulo e Farmacêutica do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Instituição: Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Correspondência: Juliana Pereira

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, 1º andar, Bloco 4, Sala 61

Laboratório de Imunopatologia – Cerqueira César

05403-000 – São Paulo-SP – Brasil

Tel.: (11) 3061-5544 R.: 339 / 3069-6043; Fax: (11) 3085-2290

E-mail: drajulianapereira@uol.com.br

Existem vários protocolos e *kits* de permeabilização disponíveis, porém nenhum é apropriado para a pesquisa de todos os antígenos intracelulares, sendo impossível recomendar um único método.⁶ Entretanto, a despeito da ausência de padronização, vários aspectos devem ser ponderados no momento da seleção do método de permeabilização a ser utilizado em cada laboratório.

Uma abordagem sistemática requer avaliação das substâncias permeabilizantes e fixadoras, das classes de anticorpos monoclonais (AcMo), dos fluorocromos, da relação fluorocromo:proteína do anticorpo, o uso de controles negativos e positivos e, nos países em desenvolvimento, é essencial avaliar o custo/benefício de cada protocolo.⁷ O menor custo, desde que se preserve a qualidade, deve estar entre os objetivos.

A utilização de saponina para permeabilização celular tem se mostrado eficaz e de menor custo em relação aos *kits* disponíveis no mercado. Com suas propriedades detergentes, permeabiliza a membrana citoplasmática sem danificá-la ou alterar a expressão dos antígenos de membrana, permitindo a detecção simultânea de antígenos intracelulares e de superfície.⁸

Neste artigo relatamos a padronização da técnica de permeabilização celular para pesquisa de antígenos intracelulares por CMF com saponina no Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Casuística e Métodos

Amostras e estudo imunofenotípico

Foram avaliadas 36 amostras, 17 de sangue periférico (SP) e 19 de medula óssea (MO), compreendendo 13 casos de leucemia mieloide aguda (sete de SP e seis de MO), nove casos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) B (dois de SP e sete de MO), dois casos de LLA T (um de SP e um de MO), três casos de leucemia aguda bifenotípica linfóide T/mielóide (um de SP e dois de MO), dois casos de leucemia aguda bifenotípica linfóide B/mielóide (um de SP e um de MO), dois casos de leucemia mieloide crônica em crise blástica (SP), um caso de linfoproliferação crônica B (SP), um caso de síndrome mielodisplásica (MO) e três casos normais (dois de SP e um de MO), enviadas ao Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para estudo imunofenotípico. Todas as amostras foram estudadas ao diagnóstico.

Os clones dos AcMo e os respectivos fluorocromos utilizados encontram-se na Tabela 1.

Inicialmente foram avaliadas 15 amostras, sete de SP e oito de MO, utilizando-se os AcMo MPO, CD22 e CD3, TdT (três casos) e IgM (um caso). Dupla marcação membrana/citoplasma com CD34 (um caso), CD45 (um caso) e CD13 (um caso) também foi efetuada. Cinco amostras foram conduzidas em paralelo pela técnica padrão do nosso laboratório com

Tabela 1. Descrição das características dos anticorpos monoclonais utilizados para a realização da técnica

Anticorpos monoclonais	Fluorocromos	Marca	Clone
MPO	FITC	DAKO	MPO-7
CD22	PE	IOTest	SJ10.1H11
CD3	PE	IOTest	UCHT1
TdT	FITC	DAKO	HT-6
IgM	FITC	BD/PharMingen	G20-127
Kappa	FITC	DAKO	Policlonal
Lambda	FITC	DAKO	Policlonal
CD19	PE	IOTest	J4.119
CD34	PE	IOTest	581
CD13	PE	IOTest	SJ1D1
CD45	PC5	IOTest	J33

FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: Phycoerythrin; PC5: Phycoerythrin-cyanine-5

Tween-Twenty (Sigma) e FACS™ Lysing Solution diluído 1:10 (Becton Dickinson {BD}).

Na segunda etapa foram avaliadas 21 amostras, dez de SP e 11 de MO, com os AcMo MPO, CD22 e CD3, TdT (dois casos), IgM (um caso), κ , λ e CD19 (um caso). Destas, 11 reações foram conduzidas em paralelo com a técnica padrão supracitada e 11 com tampão de lavagem congelado logo após o preparo e descongelado no momento do uso.

Em todos os casos, a autofluorescência controle basal foi determinada utilizando-se tubo controle negativo contendo concentrações mínimas de anticorpos isotípicos conjugados com os respectivos fluorocromos para delimitar o limite de referência de positividade da fluorescência.

Técnica da Saponina

Utilizamos a técnica de imunofluorescência direta (IFD) em todos os casos. Para as reações de dupla marcação membrana/citoplasma, procedeu-se primeiro à marcação de membrana colocando-se 10 μ L de AcMo a um tubo contendo 2 x 10⁶ células, o qual foi incubado no escuro por 20' à temperatura ambiente (TA). Na seqüência, as células foram fixadas com paraformaldeído (Sigma) a 4% por 10' à TA e posteriormente lavadas duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem contendo solução salina balanceada (PBS) com albumina bovina BSA (Biotest) a 1%. Em seguida adicionou-se solução tampão permeabilizante contendo albumina bovina BSA a 0,2%, azida sódica a 0,1% (Merck) e PBS com saponina a 0,5% (Merck) e, finalmente, o AcMo específico para o antígeno intracelular a ser pesquisado, em concentrações previamente tituladas.

Após incubação por 20' à TA no escuro, as células foram novamente lavadas duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem e ressuspensas em 1 mL de solução tampão de

lavagem para leitura em citômetro de fluxo. Caso a aquisição não fosse imediata acrescentava-se 200 µL de paraformaldeído a 1%.

Coleta dos dados por citometria de fluxo

Antes da coleta dos dados procedia-se à calibração e alinhamento do citômetro de fluxo de acordo com protocolo padrão, utilizando-se esferas de calibração CaliBRITE™3 (BD) e o programa de autocompensação FACSCComp (BD, San Jose, CA). Os dados foram coletados ajustando-se o limiar de dispersão frontal (FSC) em células viáveis para excluir plaquetas e debris (células mortas). Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos de cada tubo usando-se o programa CellQuest (BD, San Jose, CA) do citômetro de fluxo FACS Calibur (BD, San Jose, CA). Os dados foram analisados no programa CellQuest. Os resultados foram reportados como porcentagem de células positivas e intensidade média de fluorescência (IMF) das células positivas como número médio do canal em escala logarítmica de histograma de 10^0 a 10^4 .

Resultados

Houve excesso de perda celular quando utilizamos o tampão de lavagem estocado por período superior a sete dias à temperatura de 2°C a 8°C e perda mínima com tampão de lavagem novo (Figura 1).

O congelamento do tampão de lavagem recém-preparado a -20°C e seu posterior descongelamento no momento do uso eliminou a perda celular (Figura 2).

Houve variabilidade mínima na intensidade de dispersão lateral (SSC) e FSC da luz entre as amostras testadas simultaneamente com a técnica de marcação intracelular com saponina e a técnica de detecção de antígenos de membrana (Figura 3).

A sensibilidade e a intensidade de detecção dos antígenos intracelulares não foram alteradas pelo método de permeabilização utilizando saponina quando comparado à técnica padrão do nosso laboratório (Figura 4).

Discussão

Neste estudo relatamos detalhes técnicos da pesquisa de antígenos intracelulares por CMF com saponina como permeabilizante. Em nosso laboratório, situado em país de recursos escassos, estabelecemos metas de redução de

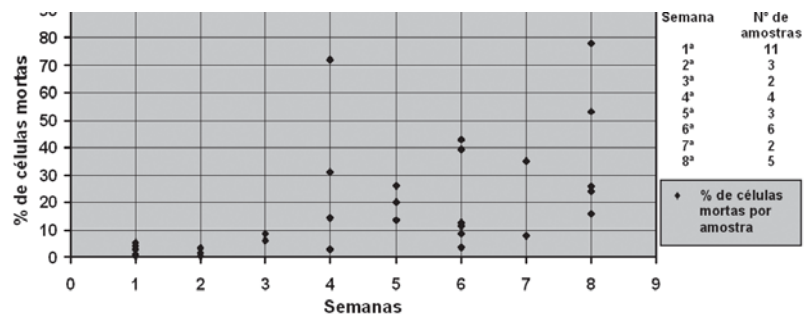


Figura 1. Porcentagem de células mortas utilizando tampão de lavagem conservado entre 2°C e 8°C

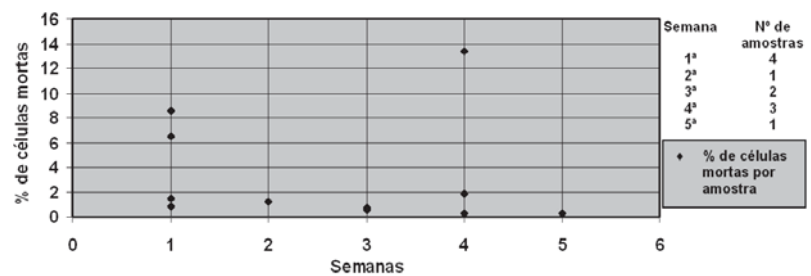


Figura 2. Porcentagem de células mortas utilizando tampão de lavagem conservado a -20°C e descongelado no momento do uso

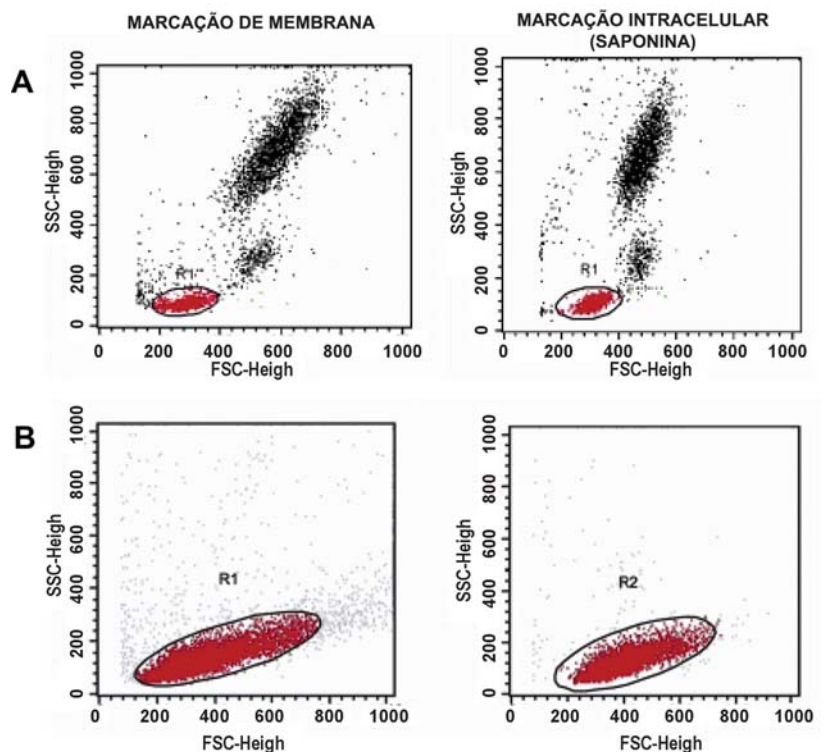


Figura 3. Citogramas apresentando pequena modificação na intensidade dos parâmetros de FSC e SSC para marcação de superfície e intracelular em amostras de sangue periférico normal (A) e de leucemia aguda (B)

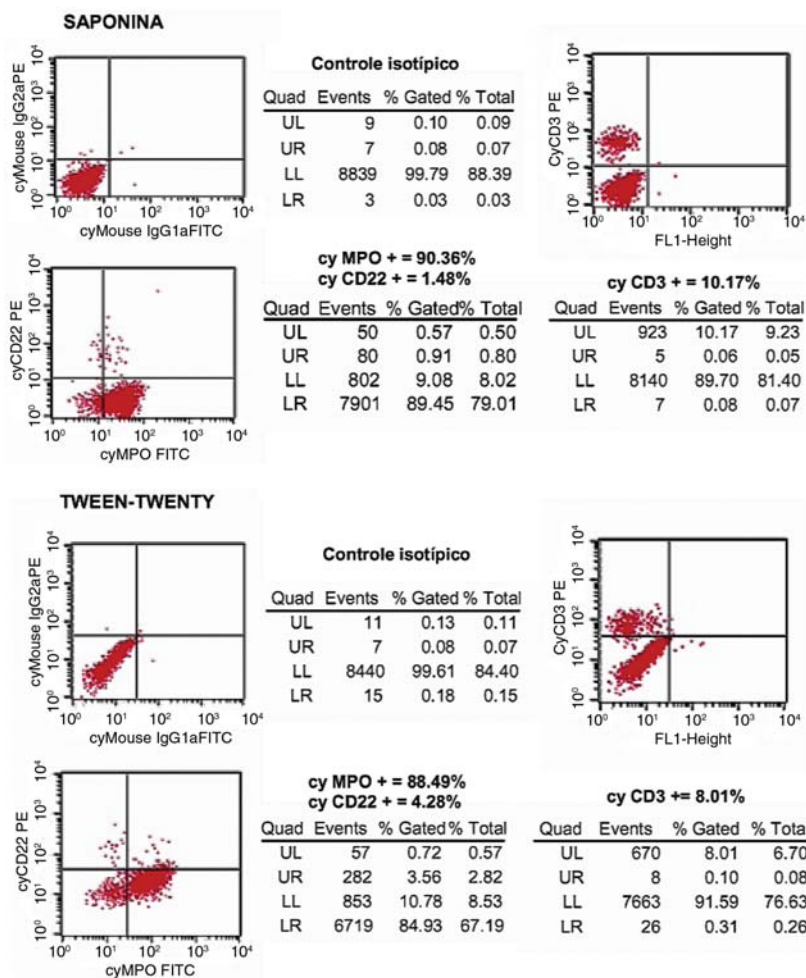


Figura 4. Porcentagem e intensidade da expressão dos antígenos utilizando a técnica de saponina comparada à técnica de Tween-Twenty e FACS TM lysing Solution 1:10

custo com preservação da qualidade. Após quatro meses padronizamos a técnica e julgamos necessário divulgar nossa experiência posto que a maioria das dúvidas que surgiram durante o processo não foi subsidiada pela literatura. Ao final reduzimos os custos financeiros em 35% e o operacional de permeabilização em vinte minutos.

Desde os anos 90, a saponina tem sido utilizada na prática laboratorial para permeabilização da membrana citoplasmática durante a detecção da produção de citocinas intracelulares.^{9,10,11} Em nosso trabalho, utilizamos a permeabilização da membrana citoplasmática com saponina para detectar outros marcadores intracelulares. Observamos que não houve alteração da sensibilidade ou da especificidade dos antígenos pesquisados em relação às técnicas habitualmente utilizadas.

A saponina é um agente detergente símile derivada da árvore *Quillaja*.¹² Interege com o colesterol da membrana citoplasmática e, em pequenas concentrações, a permeabiliza, preservando a morfologia normal da célula como determinado por microscopia eletrônica.^{13,14} Há preservação dos

antígenos de membrana, sendo factível a marcação simultânea de membrana e citoplasma. Alguns autores relatam pequena modificação nos parâmetros de dispersão de luz quando detergentes são utilizados para permeabilização e marcação de antígenos intracelulares,^{7,8} entretanto, em nossa pesquisa, a saponina preservou a integridade da membrana citoplasmática, não havendo perda significativa da morfologia das células comparativamente à marcação de membrana. Preservou-se a distinção da região de linfócitos, monócitos e granulócitos em sangue periférico normal.

Alguns detalhes foram decisivos, tais como a fixação inicial das células em paraformaldeído para preservar e estabilizar a membrana celular e suas propriedades de dispersão da luz.¹⁵ O tampão de lavagem contendo albumina a 1% foi essencial para manter a viabilidade celular. Observamos quantidade excessiva de células mortas com tampão de lavagem estocado por mais de sete dias em geladeira, mas perda mínima com tampão de lavagem novo ou preservado a -20°C.

Para chegar à conclusão em relação aos interferentes fizemos análise sistemática das etapas da técnica. Checamos o pH das soluções tampões, a concentração da azida sódica no tampão de permeabilização (testamos as concentrações de 0,1%, 0,05% e 0% de azida sódica). Refizemos novo tampão de lavagem semanalmente, excluímos a lavagem inicial da amostra com PBS-azida e ressuspendemos as células no próprio tampão de lavagem. Ao final, conseguimos adequar a técnica e atualmente a utilizamos de rotina em nosso laboratório.

Conclusão

A utilização da técnica *in house* de permeabilização com saponina para pesquisa de marcadores intracelulares por CMF mostrou-se eficaz, rápida e de menor custo. Desta forma, sua aplicabilidade na prática laboratorial pode ser factível, pois não foram observadas perdas na sensibilidade e na especificidade de detecção dos antígenos intracelulares testados neste estudo.

Agradecimento

Agradecemos à biomédica Noemia Mieorii, responsável pelo setor de Citometria de Fluxo do Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela contribuição no desenvolvimento da técnica.

Abstract

Intracellular antigen investigations by means of flow cytometry are essential for immune phenotypical studies of oncohematological diseases. The use of Saponin for cellular permeabilization has proved to be cost-effective. Due to its detergent properties, Saponin permeabilizes the cytoplasmic membrane without harming it or altering membrane antigen expressions, thus allowing simultaneous detection of intracellular and surface antigens. The objective was to analyze the efficiency of the cell permeabilization technique using Saponin as a permeabilizing agent. Thirty-six samples of peripheral blood and bone marrow underwent an immune phenotypical study at the Immune Pathology Laboratory of the Hospital das Clínicas of the University of São Paulo. Direct immunofluorescence was accomplished using the CellQuest program (Becton Dickinson, San Jose, CA) of the FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) to acquire and analyze the data. Excessive cell loss was observed when using rinsing buffers stored for more than seven days at temperatures ranging from 2°C to 8°C. Minimal cell loss was found when rinsing buffers were used immediately after preparation or frozen at the time of preparation and thawed just before use. In order to eliminate excessive cell loss, a systematic analysis of the technique stages was carried out, allowing us to restructure the technique to our purposes and its use in our laboratory. In a country with scarce resources, a viable, faster, more cost-effective technique (35% reduction in cost) aimed at investigating intracellular antigens by flow cytometry has been standardized. Rev. bras. hematol. hemoter. 2007;29(2):109-113.

Key words: Flow cytometry; cytoplasmic membrane; saponin, cellular permeabilization; intracellular antigens.

10. Kallas EG *et al.* Detection of Intracellular Antigen-Specific Cytokines in Human T Cell Populations. *J Infect Dis.* 1999;179(5): 1124-31.
11. Nakamura H *et al.* Flow cytometric detection of cell-associated cytokines in alveolar macrophages. *Eur Respir J.* 1996;9:1181-7.
12. Goldenthal KL *et al.* Post-fixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem.* 1985;33:813.
13. Bohn W. A fixation method for improved antibody penetration in electron microscopical immunoperoxidase studies. *J Histochem Cytochem.* 1978;26:293.
14. Willingham MC, Yamada SS, Pastan I. Ultrastructural antibody localization of alpha2-macroglobulin in membrane-limited vesicles in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(9): 4359-63.
15. Halldén G *et al.* A new membrane permeabilization method for the detection of intracellular antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1989;124(1):103-9.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 19/05/2006

Aceito após modificações: 04/12/2006

Referências Bibliográficas

1. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry.* 1994;18:187.
2. Mason DY, *et al.* Value of monoclonal anti-CD22 (p135) antibodies for the detection of normal and neoplastic B lymphoid cells. *Blood.* 1987;69(3):836-40.
3. Campana D, *et al.* The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol Methods.* 1987;138:648-55.
4. Van Dongen JJ, *et al.* Cytoplasmic expression of the CD3 antigen as a diagnostic marker for immature T-cell malignancies. *Blood.* 1988; 71(3):603-12.
5. Schroff RW, *et al.* Detection of intracytoplasmic antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1984;70(2):167-77.
6. Clevenger CV, Shankey TV. Immunofluorescence measurement of intracellular antigens. In: Bauer KD, Duque RE, Shankey TV. *Clinical Flow Cytometry: Principles and Application.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1993. p. 157.
7. Koester SK, Bolton WE. Intracellular markers. *J Immunol Methods.* 2000;243:99-106.
8. Jacob MC, Favre M, Bensa JC. Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry.* 1991;12:550-8.
9. Grützkau A *et al.* Detection of Intracellular Interleukin-8 in Human Mast Cells: Flow Cytometry as a Guide for Immunoelectron Microscopy. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:935-46.