



| Citometria de  
Fluxo  
para  
todas as aplicações

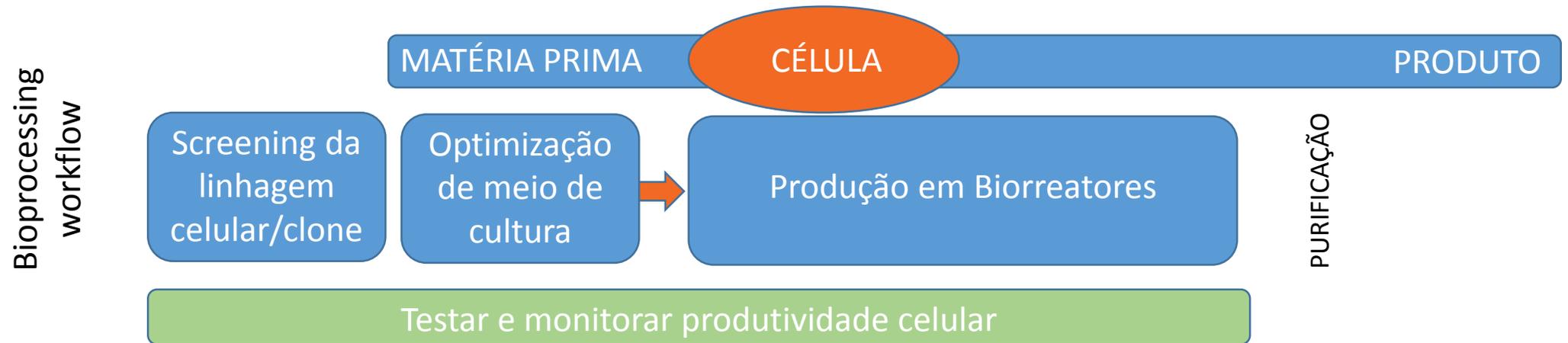
Funcionalidades da Citometria de Fluxo em Bioprocessos

Tiago Simões – BD Industrial Segment

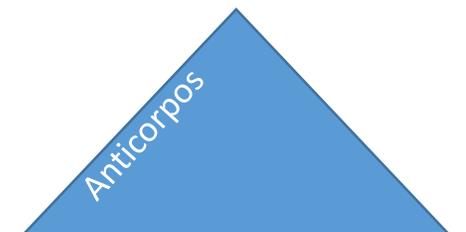


## BIOFÁRMACOS:

*Proteínas para uso terapêutico ou diagnóstico in vivo.*



- 1- Viabilidade celular;
- 2- Proliferação celular;
- 3- Estado fisiológico da cultura celular;



- 4- Análise simultânea de parâmetros

Definição:

## CITO METRIA DE FLUXO



*Poderosa*

ferramenta para  
detectar

partículas em meio líquido...



Poderosa ferramenta utilizada na **caracterização** e análise de células, além de suas organelas e subprodutos.



Adolfo Lutz  
1855 - 1940



Oswaldo Cruz  
1872 - 1917



Vital Brasil  
1865 - 1950



Evidenciar  
Discriminar  
Classificar  
Segregar  
Enaltecer

F

Fluorescence-activated cell sorting

A

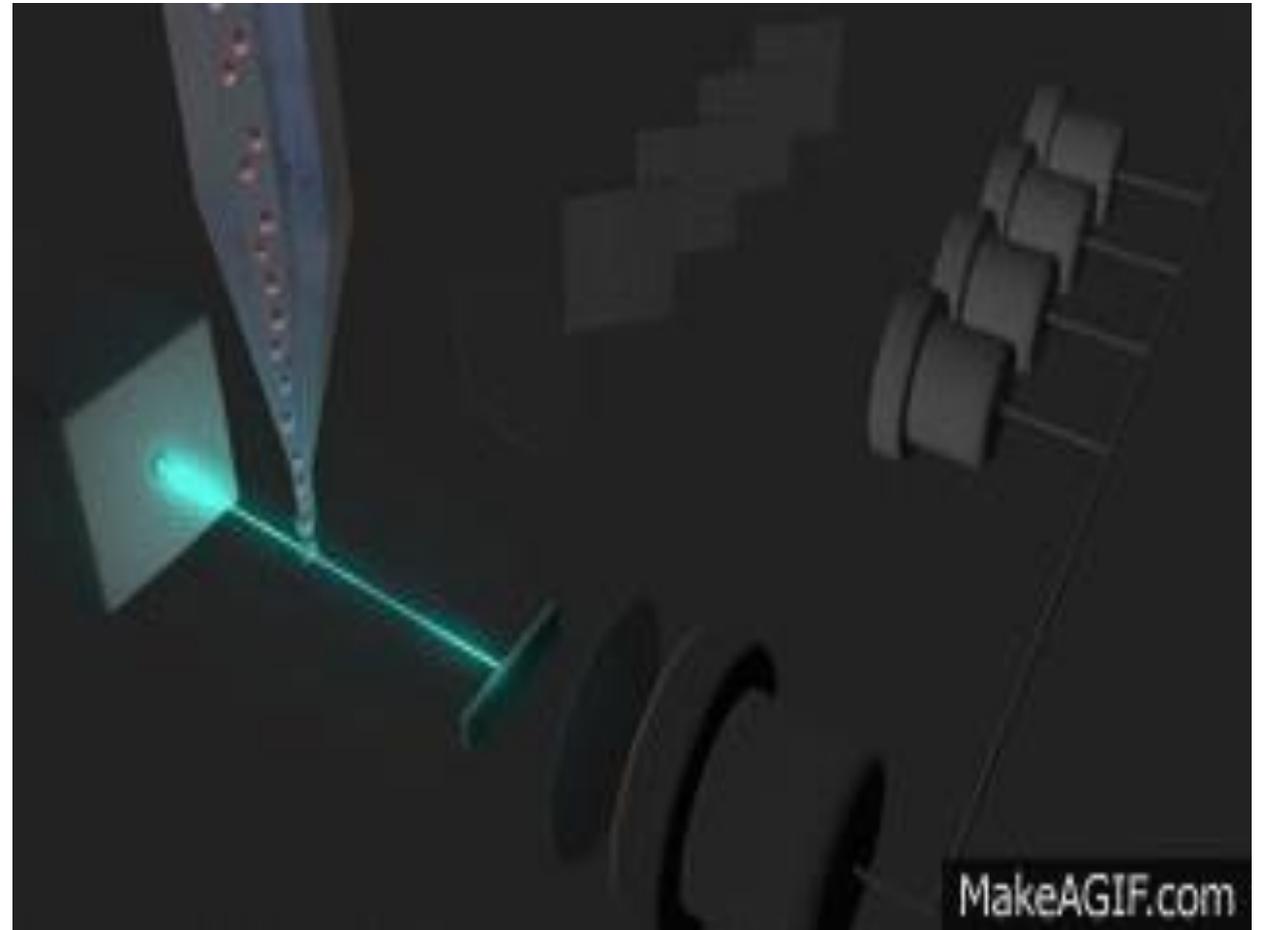
Fluorescence-activated cell sorting

C

Fluorescence-activated cell sorting

S

Fluorescence-activated cell sorting



F

Fluorescence-activated cell sorting

A

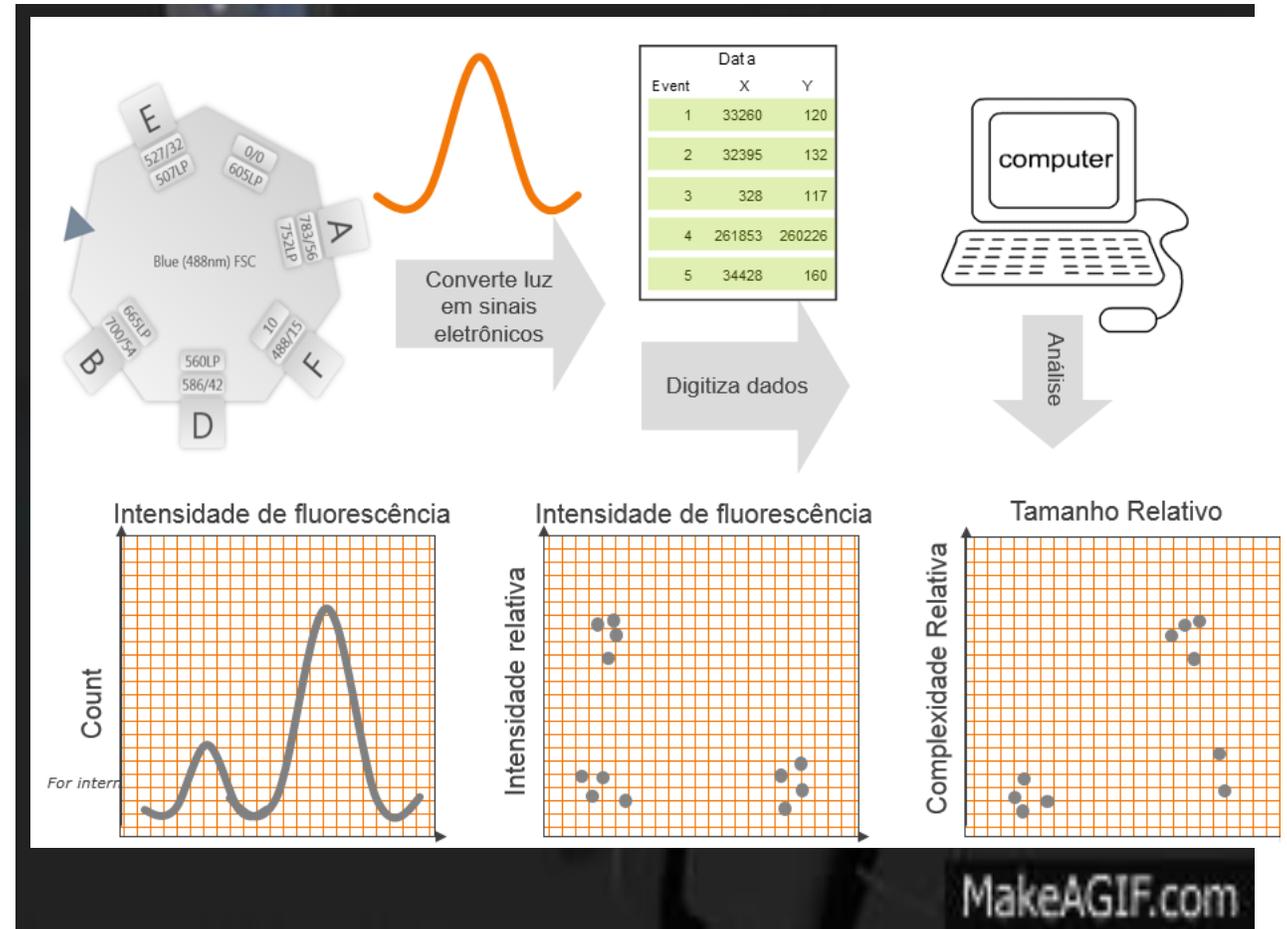
Fluorescence-activated cell sorting

C

Fluorescence-activated cell sorting

S

Fluorescence-activated cell sorting



F **Fluorescence-activated cell sorting**

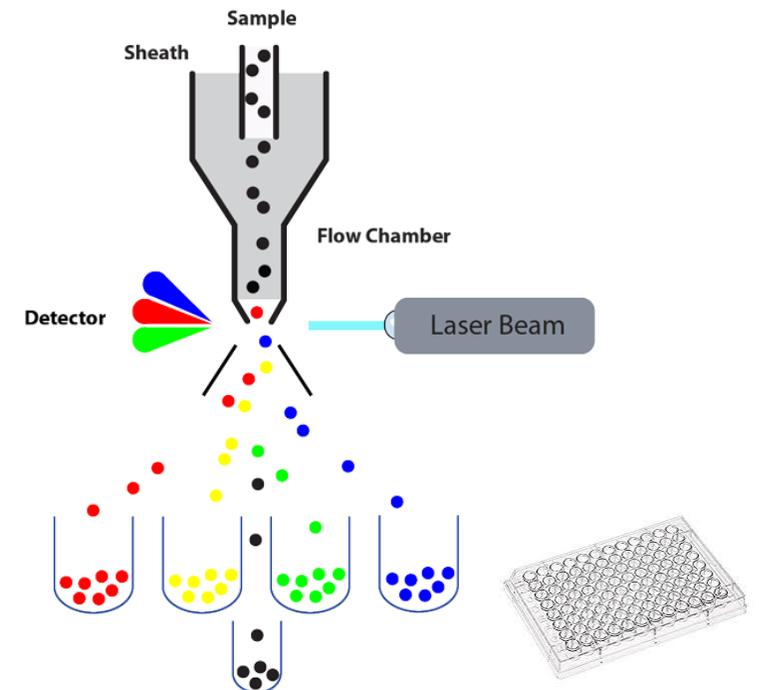
A **Fluorescence-activated cell sorting**

C **Fluorescence-activated cell sorting**

S **Fluorescence-activated cell sorting**

Um citometro de fluxo do **tipo sorter**:

- 1- Fonte de radiação;
- 2- câmara de fluxo;
- 3- unidade de filtros ópticos;
- 4- foto diodos ou fotomultiplicadores;
- 5- unidade que processa os dados;
- 6- Placas de voltagem.



# SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOFÁRMACOS | ACFB/BD

Princípio de detecção e caracterização:

| MARCADORES  | LIGANTES   | ESTRUTURA CELULAR                                       | RESULTADO VERIFICÁVEL  |
|---|--|---|--|
| IODETO DE PROPÍDEO<br>7-AAD<br>DAPI<br>LARANJA DE TIAZOL<br>ANEXINA-V | BASES NUCLEOTÍDICAS<br>BASES NUCLEOTÍDICAS<br>BASES NUCLEOTÍDICAS<br>BASES NUCLEOTÍDICAS<br>FOSFATIDILSERINA | DNA<br>DNA<br>DNA/RNA<br>DNA/RNA<br>MEMBRANA PLASMÁTICA | INTEGRIDADE DE MEMBRANA<br>VIABILIDADE CELULAR E APOPTOSE<br>VIABILIDADE CELULAR E EXPRESSÃO<br>DIFERENCIA CÉLULAS DE “DEBRIS”<br>APOPTOSE |

Anticorpos Monoclonais

+ Fluorocromos



ANTI-CASPASES,  
 ANTI-FAS, ANTI-BAX,  
 ETC...

PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

MEMBRANA PLASMÁTICA

APOPTOSE

ANTI (EPO)

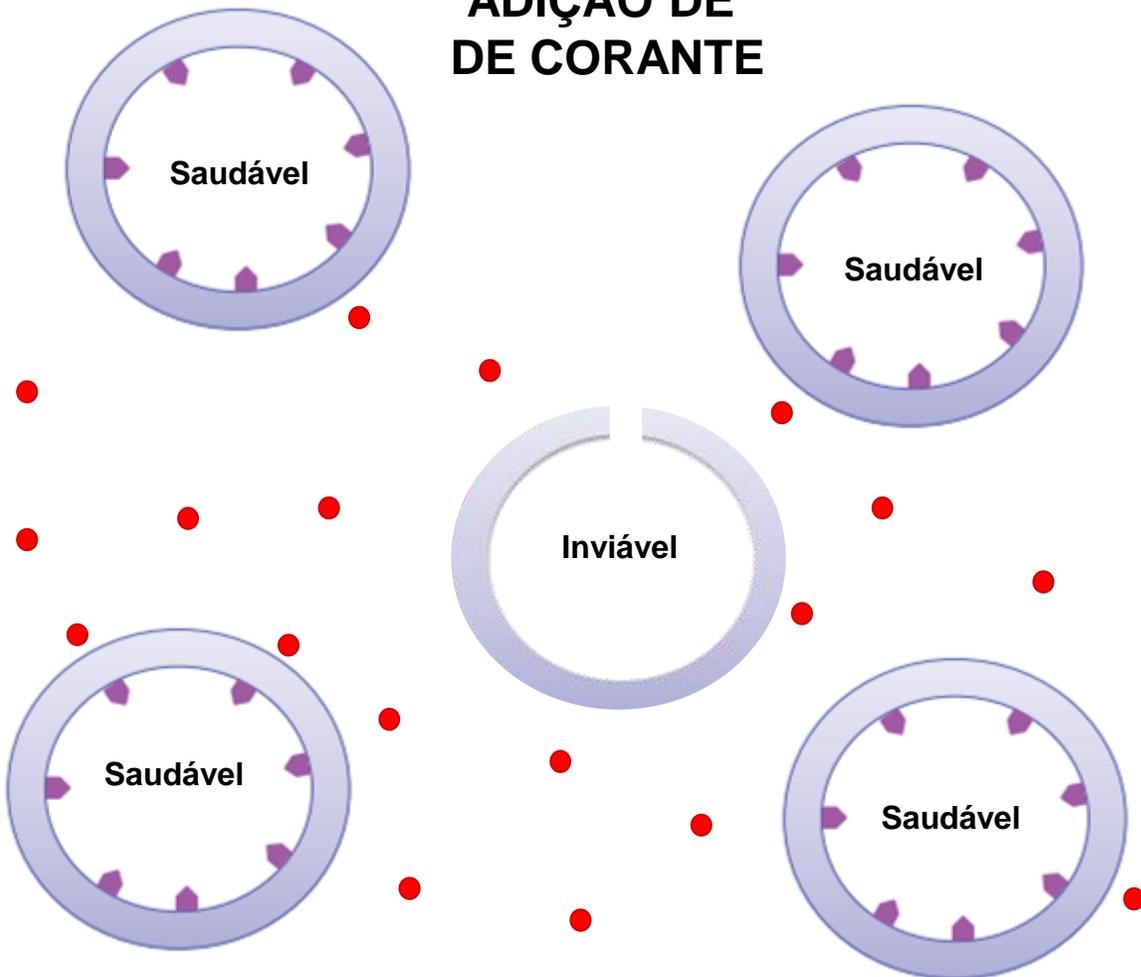
ERITROPOITINA

CITOPLASMA

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

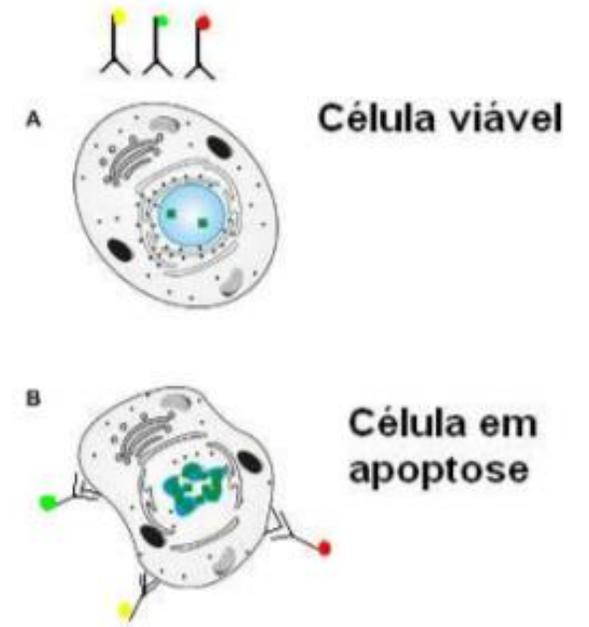
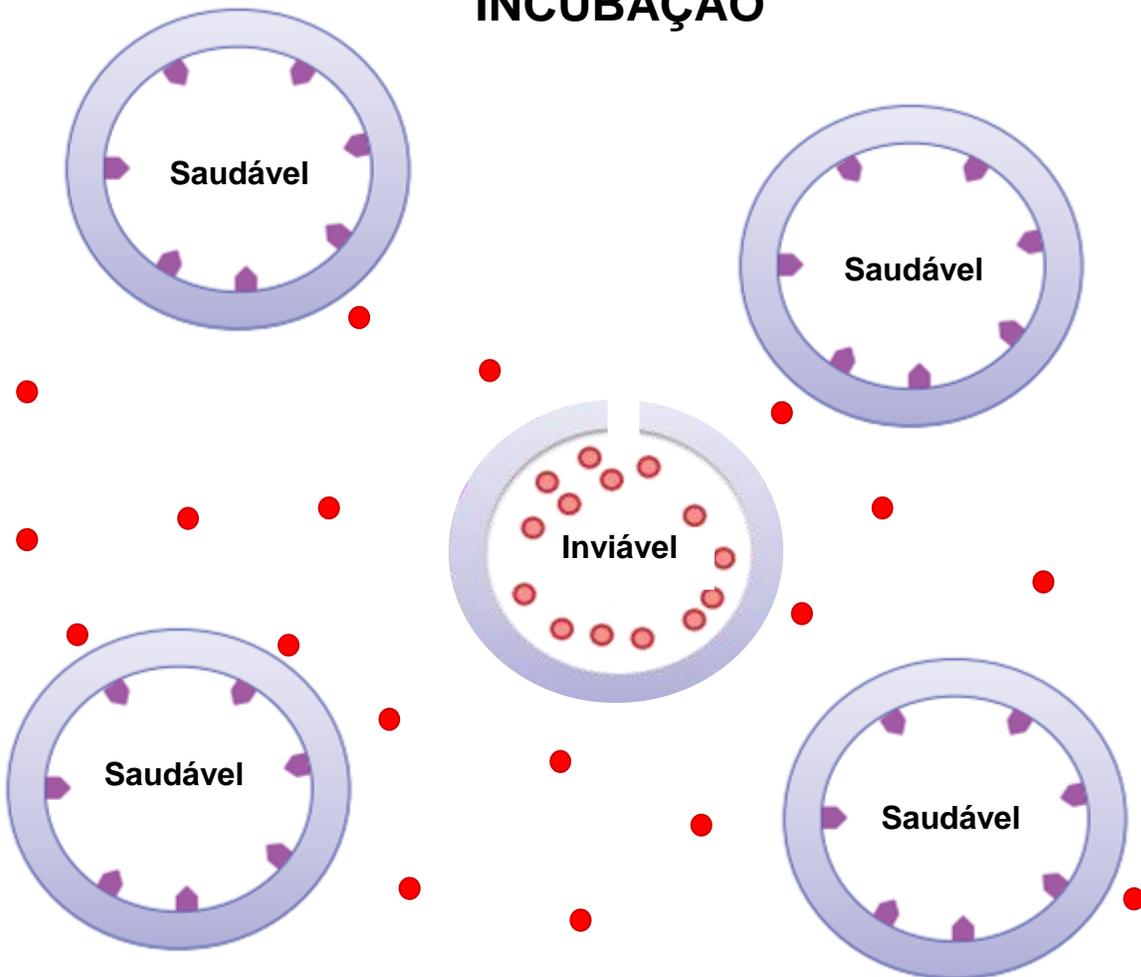
Princípio de detecção e caracterização: Viabilidade e apoptose

**ADIÇÃO DE  
DE CORANTE**

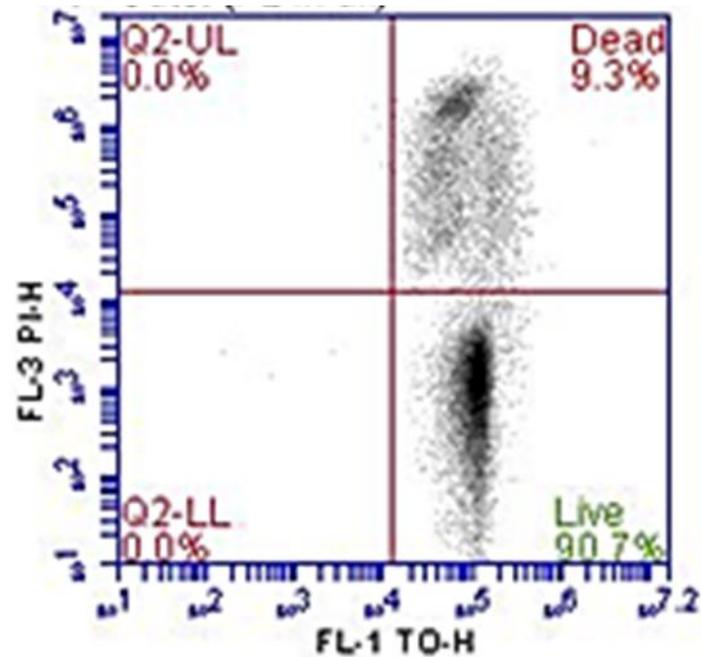


Princípio de detecção e caracterização: Viabilidade e apoptose

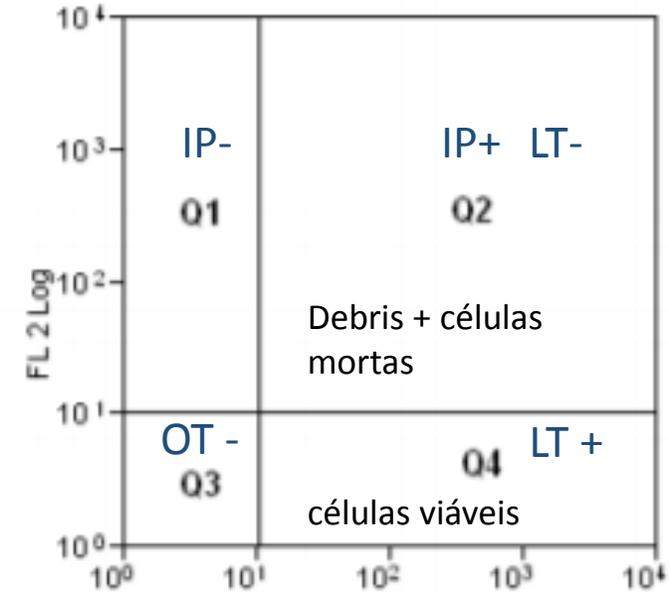
## INCUBAÇÃO



Princípio de detecção e caracterização: Viabilidade



FLUORESCÊNCIA 2 →

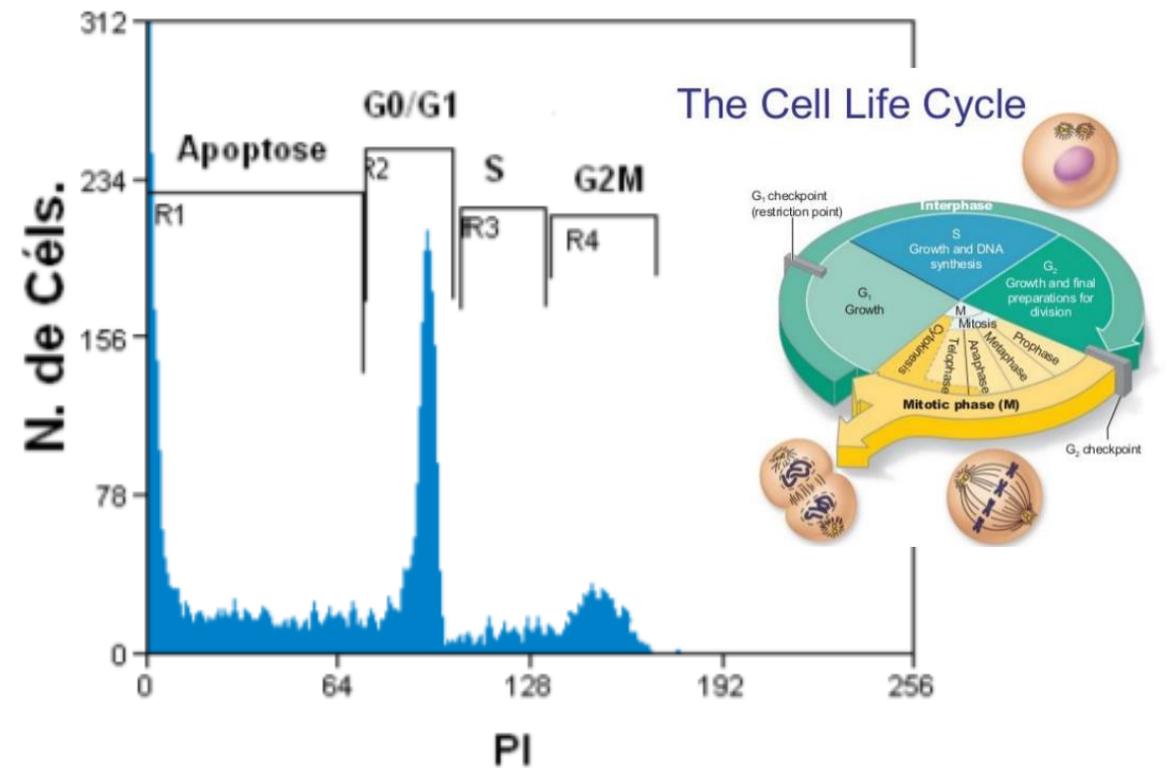
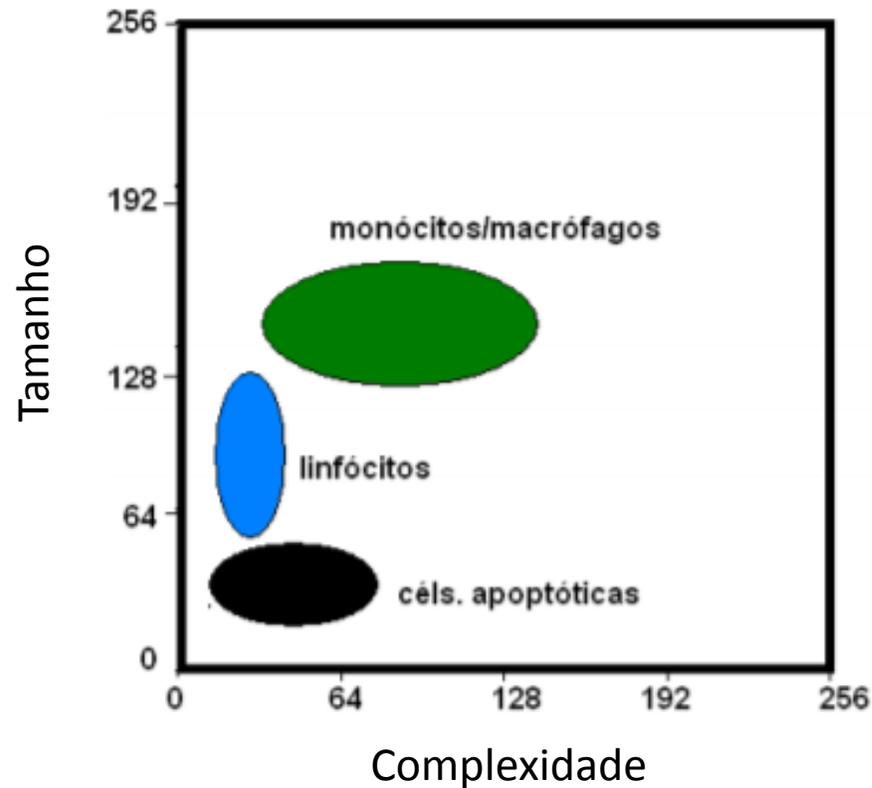


↑  
FLUORESCÊNCIA 1

ENSAIO: DETECÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Marcadores: Iodeto de Propídeo e Laranja de Tiazol

## Princípio de detecção e caracterização: Apoptose e ciclo celular



## Princípio de detecção e caracterização: Apoptose e ciclo celular

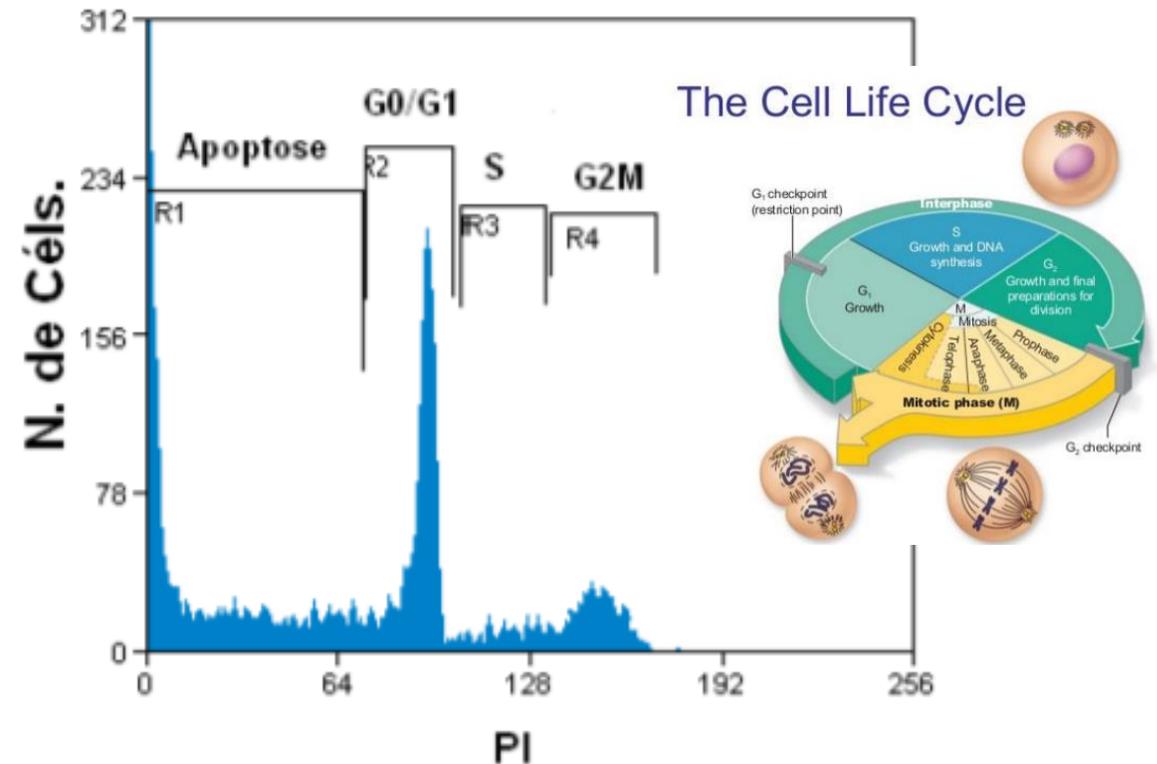
### C i c l o   C e l u l a r

- Iodeto de Propídeo;
- Detergentes (NP-40 + Triton X-100)
- Ribonuclease A
- Citrato de sódio e cloreto de sódio

**Finalidade:** Quantificação do DNA no interior da Célula.

Células em G2M: tem o dobro de DNA que G0/G1.

Células em apoptose tem menos intensidade de fluorescência já que o DNA está fragmentado.



## DETECTAR E CARACTERIZAR

- a. Células/produtos em processos fermentativos; (Art. 1)
- b. Produtividade celular e seleção de clones; (Art. 2)
- c. Microrganismos para controle microbiológico e liberação de produtos.

a. Células/produtos em processos fermentativos:

Cytotechnology (2016) 68:399–408  
DOI 10.1007/s10616-014-9791-3



ORIGINAL RESEARCH

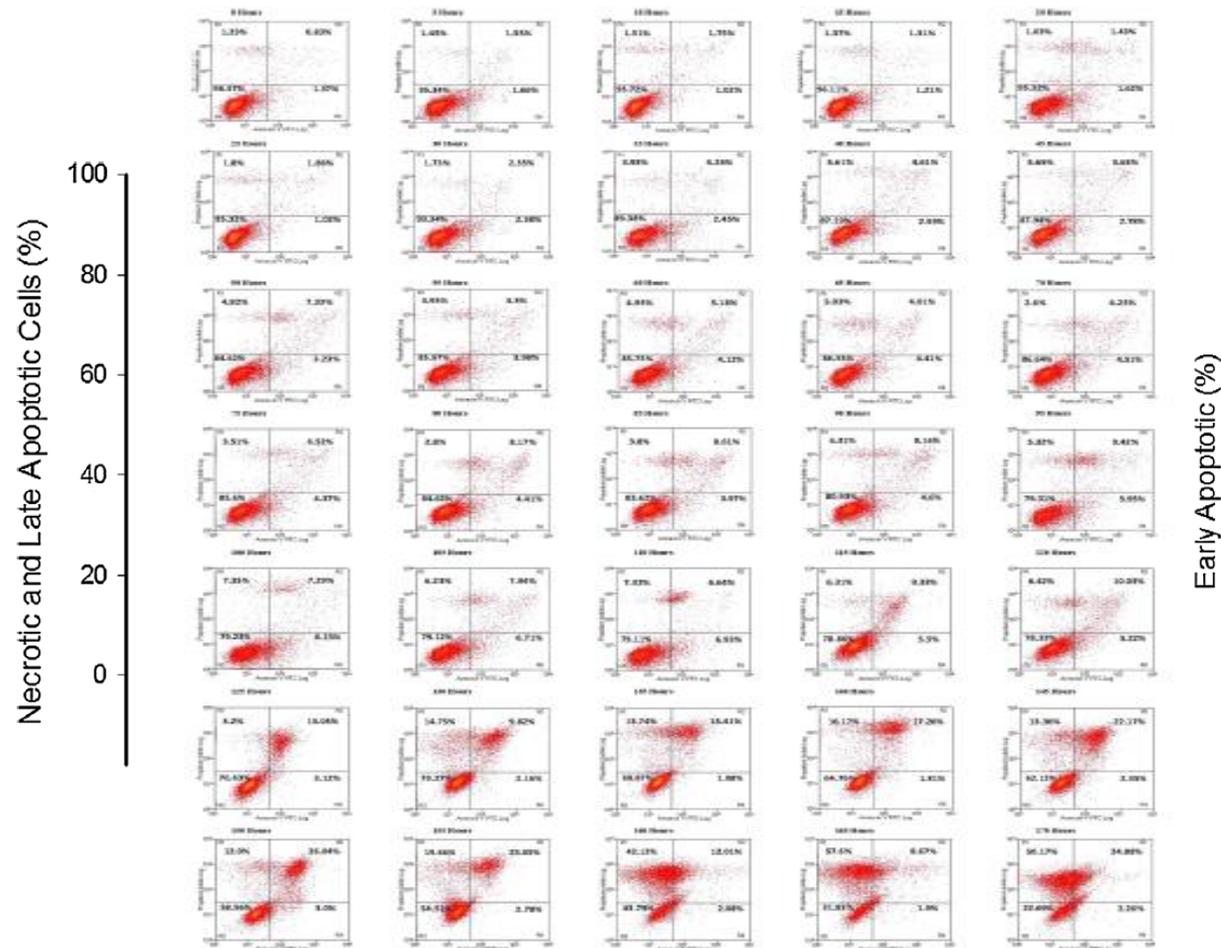
## **Online flow cytometry for monitoring apoptosis in mammalian cell cultures as an application for process analytical technology**

**Darrin Kuystermans · Mohd Avesh ·  
Mohamed Al-Rubeai**

## a. Células/produtos em processos fermentativos: (continuação)

- Apoptose é um processo comum em reatores de produção com linhagens de célula animal;
- A apoptose afeta a quantidade e a qualidade da proteína recombinante expressa;
- A apoptose é causada por processos celulares programados, já a necrose por processos extrínsecos, condições ambientais extremas, como: estresse por depleção de nutrientes, por acúmulo de produto, hypoxia, sub-optimal pH, hyper osmolaridade, etc...
- **Objetivo:** Descrever uma nova abordagem para viabilizar em tempo real de “early”/”late” apoptosis e populações com célula em estágio de “necrose”, em suspensão de célula CHO com processo automatizado de prepare de amostras acoplado à um citômetro de fluxo.
- **Protocolo de marcação: Anexina – V FITC e IP**

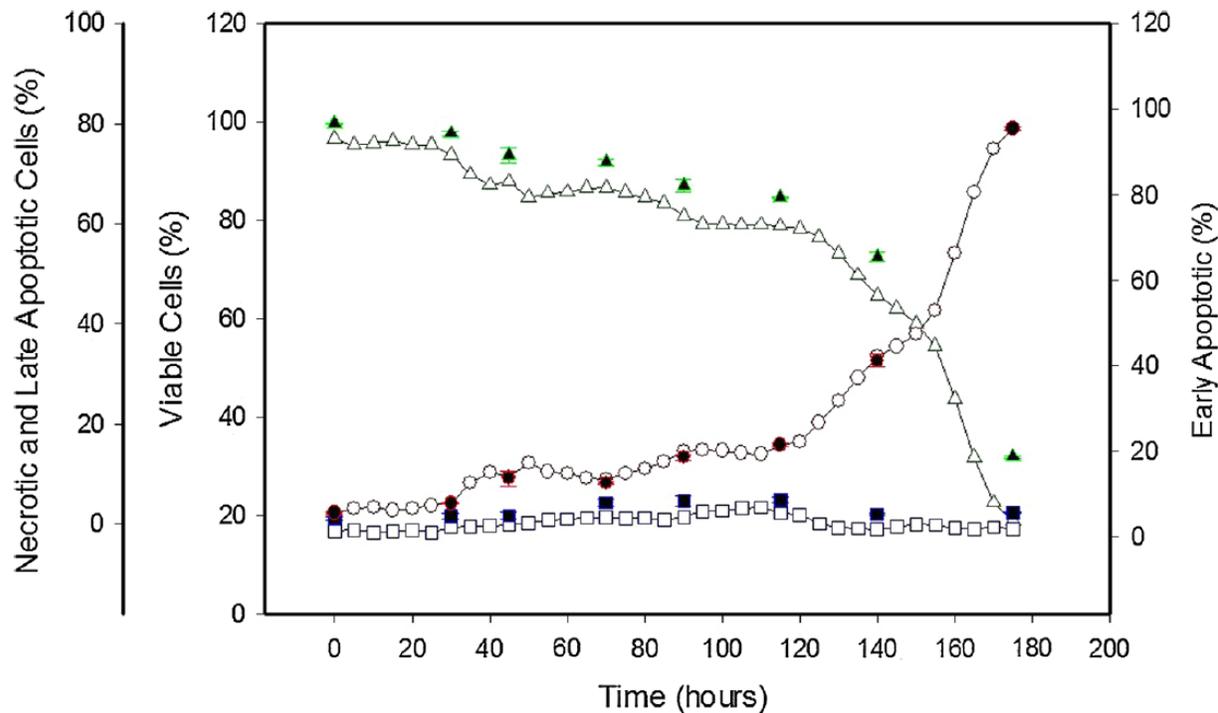
## a. Células/produtos em processos fermentativos: (continuação)



% células viáveis: triângulo branco  
 % early apoptose: quadrados brancos  
 % late apoptose/necrose: círculo branco

- Comparativo de eficiência entre o processo manual e o automatizado;
- Proteases ativadas no processo de apoptose **degradam o produto final**;
- Em processos de batelada contínua/alimentada, se possibilita **alternativas de rotas metabólicas**, adicionando determinados nutrientes e aditivos, retardando o processo de apoptose, mantendo a cultura ativa em produtividade e qualidade;
- DNA fragmentado dificulta processo de downstream**, detectando estágios de apoptose é possível reduzir perda de produto final.

## a. Células/produtos em processos fermentativos: (continuação)



% células viáveis: triângulo branco  
 % early apoptose: quadrados brancos  
 % late apoptose/necrose: círculo branco

- Comparativo de eficiência entre o processo manual e o automatizado;
- Proteases ativadas no processo de apoptose **degradam o produto final**;
- Em processos de batelada contínua/alimentada, se possibilita **alternativas de rotas metabólicas**, adicionando determinados nutrientes e aditivos, retardando o processo de apoptose, mantendo a cultura ativa em produtividade e qualidade;
- DNA fragmentado dificulta processo de downstream**, detectando estágios de apoptose é possível reduzir perda de produto final.

b. Produtividade celular e seleção de clones:

## **Accelerated Clone Selection for Recombinant CHO Cells Using a FACS-Based High-Throughput Screen**

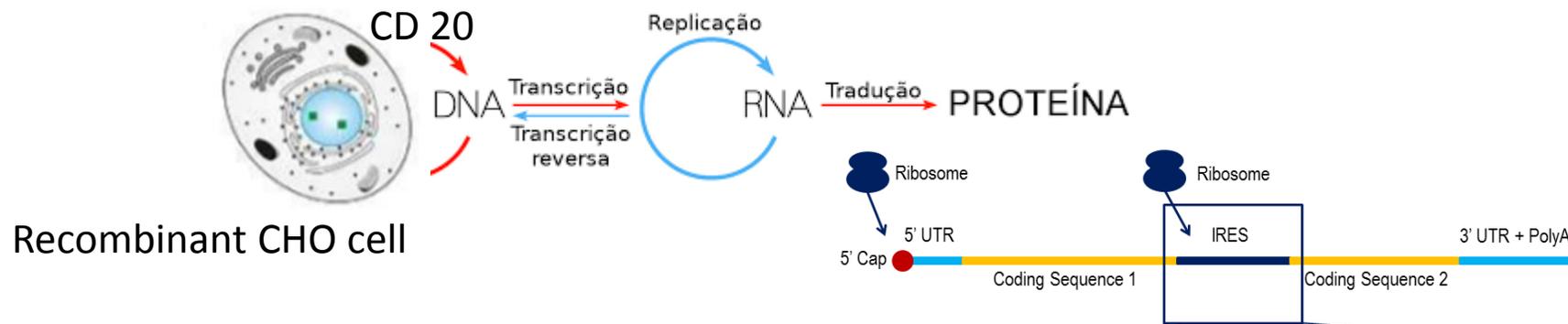
**Christine T. DeMaria,\* Victor Cairns, Cordula Schwarz, Jin Zhang, Megan Guerin,† Erin Zuena, Scott Estes, and Kenneth P. Karey**

Therapeutic Protein Expression Group, Department of Cell & Protein Therapeutics, Genzyme Corporation, Framingham, Massachusetts 01701

---

## b. Produtividade celular e seleção de clones:

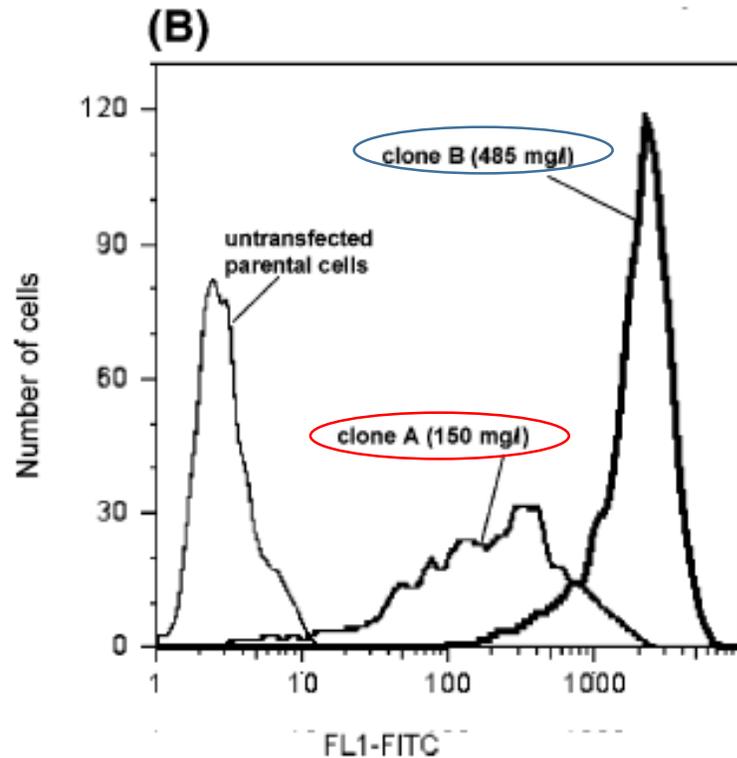
- A citometria de fluxo foi utilizada para detectar uma proteína “reporter” não fluorescente em estágio prematuro, identificando clones com alta produção de proteína terapêutica.
- **Objetivo:** Detectar clones com alta expressão de uma população heterogênea de células transfectadas.



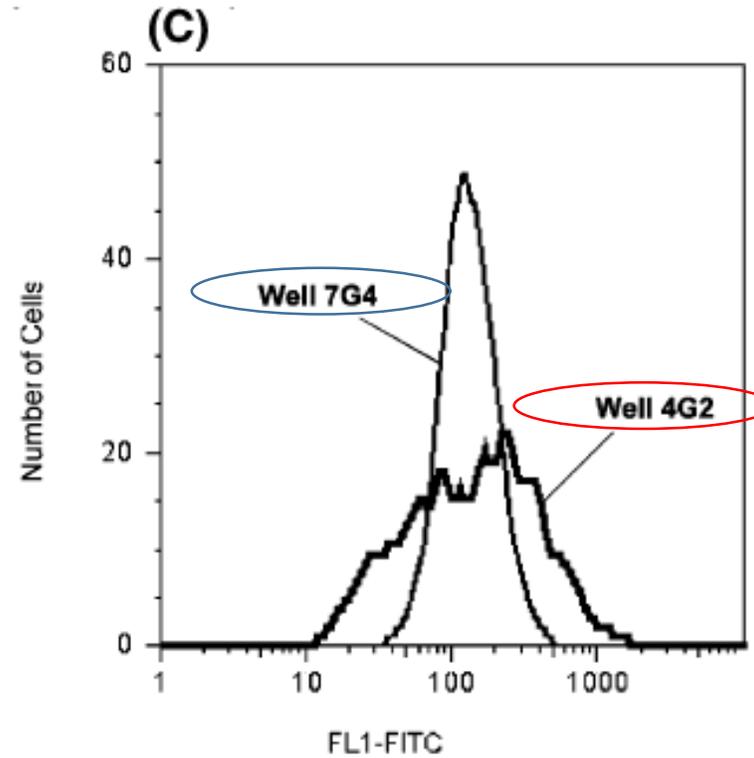
- **Protocolo de marcação:** Anti-human CD20 – FITC conjugated



## b. Produtividade celular e seleção de clones: (continuação)

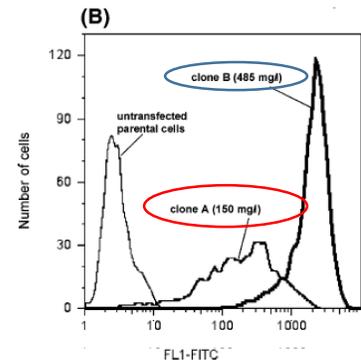


Informação Quantitativa

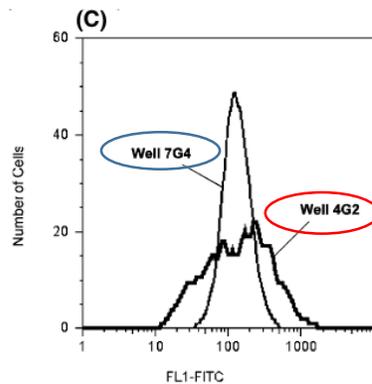


Informação Quantitativa e Qualitativa

## b. Produtividade celular e seleção de clones: (continuação)



- Expressão de 2 diferentes clones (Baseado em FITC\_CD-20) com correlação intensidade de fluorescência e títulos de proteína final.



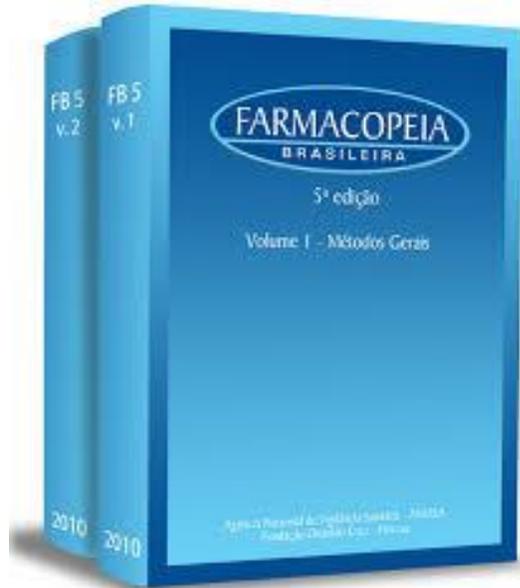
- O gráfico apresentou dois clones (4G2 e 7G4) com fluorescências similares, em quantidade relativa, conforme estimado pelo estudo, 127,5 RFU e 127,1 RFU, respectivamente (o que remete à boa produtividade). No entanto, o perfil de cada clone se diferencia. Enquanto 7G4 possui uma distribuição mais homogênea, 4G2 se mostra heterogênea, o que pode representar instabilidade do clone ou até mesmo populações misturadas.

## c. Microrganismos para controle microbiológico e liberação de produtos

### 3.2.3 Citometria de fluxo

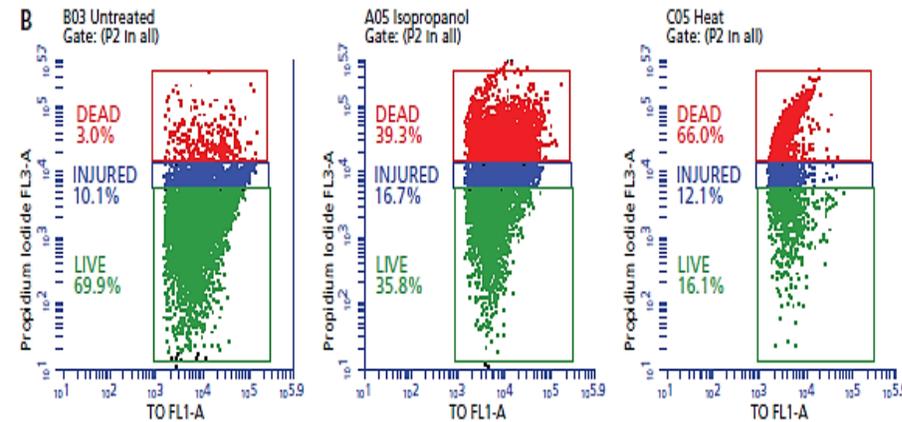
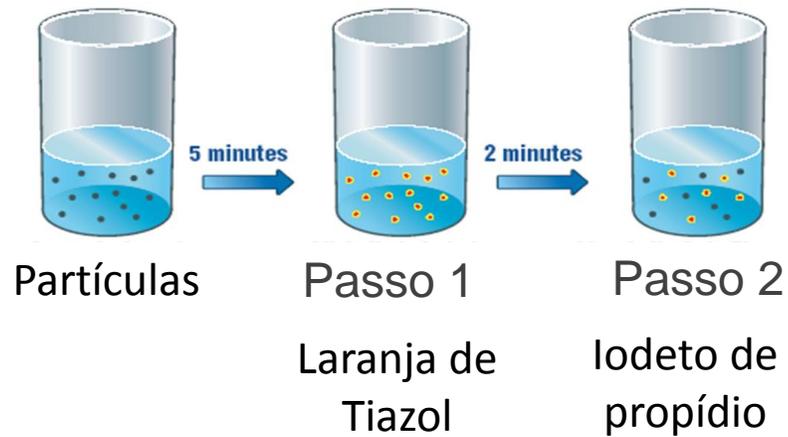
A citometria de fluxo possibilita **detectar microorganismos** suspensos em um **meio líquido**.

Os mecanismos de **marcação e detecção** são similares à citometria de fase sólida, porém a **amostra não precisa ser filtrada**. Os microorganismos marcados pelo indicador de viabilidade não fluorescente podem ser detectados em suspensão, ao passar por um citômetro de fluxo. **A amostra marcada é injetada em uma célula de fluxo de quartzo e passa por um feixe de laser excitatório para detecção dos micro-organismos**. A citometria de fluxo também fornece resultados rápidos, mas é menos sensível que a citometria de fase sólida. Para melhorar o desempenho, pode ser realizada uma etapa prévia de incubação em meio de cultura, o que tornaria o método baseado em crescimento.



# SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOFÁRMACOS | ACFB/BD

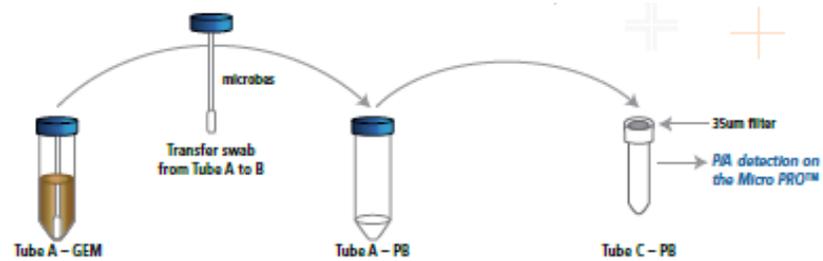
## PROTOCOLO 1: DETECÇÃO E CONTAGEM DIRETA



Microrganismos Totais

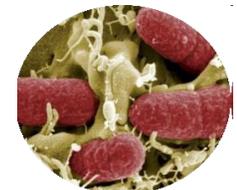
Microrganismos Viáveis

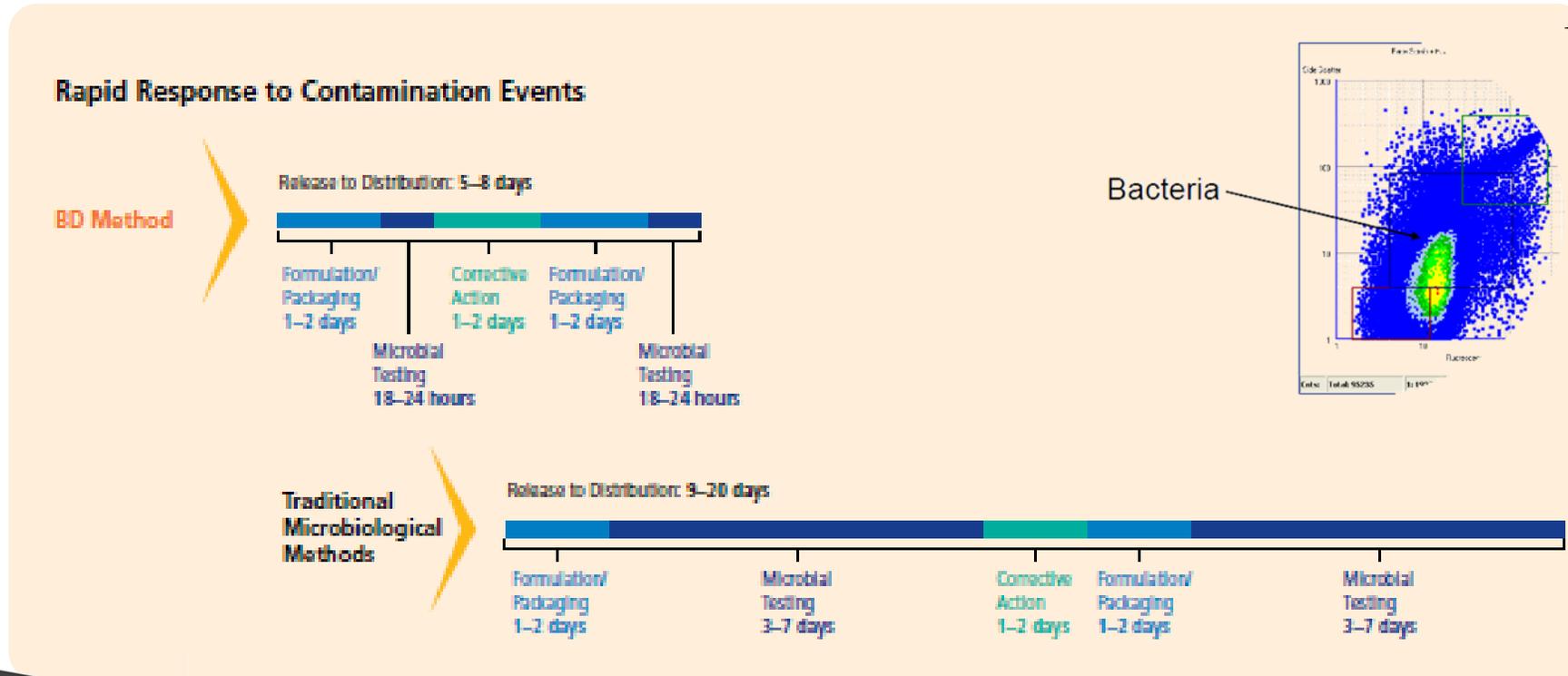
## PROTOCOLO 2: LIBERAÇÃO POR CONTAGEM INDIRETA



PASS / FAIL PROTOCOL

Protocolo STD para 10 UFC/mL | 100UFC/mL





## CFR 21 Part 11 FDA regulation ::: Integridade de dados

- Permite a identificação de todos os usuários e suas ações.
- Geração de perfis de usuários protegidos por senhas.
- Controle de lotes de reagentes.
- Auditoria de ensaios e rotinas.



## Hot Spots:

- A citometria de fluxo é uma ferramenta ponderosa para avaliação da saúde celular;
- A citometria de fluxo traz respostas rápidas para otimização de bioprocessos;
- A apoptose é um evento intracelular que pode ser alcançado por protocolos de citometria para melhorar rendimento e impactar em custos;
- Em determinados processos podemos correlacionar de forma direta rendimento de produto com estado fisiológico da cultura celular



| Citometria de  
Fluxo  
para  
todas as aplicações

Curiosidade

Criatividade

Solução

Singularidade

Descoberta

Inovação

Conectividade

## Agradecimentos:

Augusto Geraldi

PS team

Oscar Raziel

BD Bioscience

Renan Antonielli

Prof. Marco Antônio Stephano

ACFB

---

## Funcionalidades da Citometria de Fluxo em Bioprocessos

Tiago Simões – BD Industrial Segment



tiago.Simoes@bd.com

