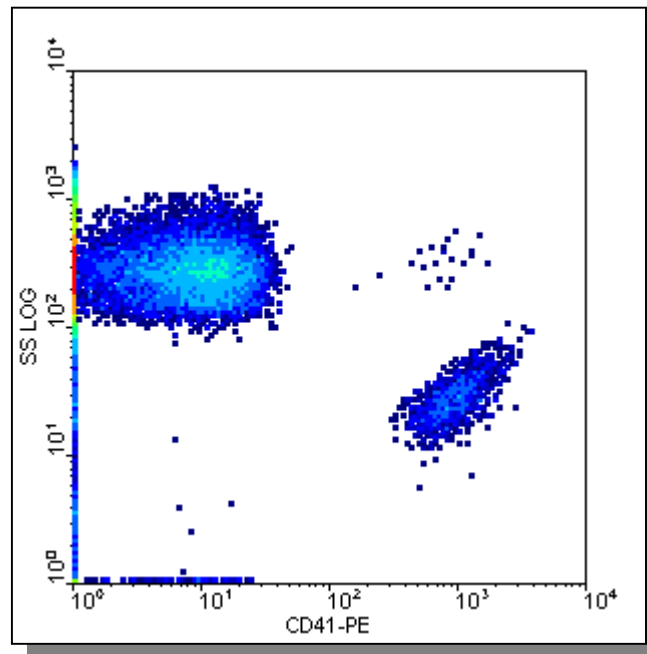


# PROTOSCOLOS EXPERIMENTÁIS DE CITOMETRIA DE FLUXO



Os protocolos experimentais foram adaptados e traduzidos pela Doutora Maria do Céu Rodrigues Monteiro, responsável do Laboratório de Citometria de Fluxo do Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte (ISCSN), Paredes, Portugal. Os protocolos foram utilizados durante o Curso de Formação Avançada em Análise Citométrica dos Fenómenos de Ativação Celular, celebrado no ISCSN em 2002.

# **Protocolos Experimentais**

## **1. Ativação de Plaquetas**

- Análise da expressão de marcadores de ativação na superfície da plaqueta: CD62 e receptor GPIIb/IIIa activada (PAC-1)
- Análise da cinética de cálcio intracelular em plaquetas do sangue total
- Análise do pH citosólico em plaquetas de sangue total
- Análise da cinética da expressão de fosfatidilserina em plaquetas de sangue total
- Interação plaquetas-leucócitos

## **2. Ativação de Linfócitos**

- Análise da expressão de marcadores de ativação: CD69
- Activação de linfócitos para análise citométrica de citocinas intracelulares
- Análise da cinética de cálcio intracelular em linfócitos
- Análise da expressão de fosfatidilserina na membrana plasmática
- Análise citométrica do pH intracelular em leucócitos de sangue total

### **Análise da proliferação de linfócitos:**

- Análise da permeabilidade parcial ao iodeto de propídio
- Análise do conteúdo em DNA em suspensões celulares
- Análise do conteúdo em DNA em sangue e medula óssea
- Análise simultânea do conteúdo em DNA e o fenótipo de superfície

## **3. Ativação de granulócitos e monócitos**

- Análise da produção de espécies oxidantes em leucócitos isolados de sangue periférico
- Análise simultânea da fagocitose e burst oxidativo em leucócitos isolados de sangue periférico
- Análise da expressão de moléculas de adesão em leucócitos

# ***ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ACTIVAÇÃO NA SUPERFÍCIE PLAQUETÁRIA: CD62p***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com citrato

Tampão de Tyrode (modificado) pH 7.4 (137mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.35% BSA, 10 mM HEPES, 5.5 mM glucose, pH 7.4)

PBS (opcional)

Anticorpos monoclonais CD41-PE e CD62p-FITC (Immunotech)

Agonistas plaquetários:

- ADP
- Trombina

Inibidor da coagulação:

- Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) 22mM

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Diluir a 1/10 o sangue total com tampão Tyrode (25 µl de sangue + 225 µl de tampão).
2. Rotular tubos de 12x75 mm, incluindo um tubo para o controlo de activação espontânea (sem agonista).
3. Colocar em cada tubo 25 µl de sangue diluído e 5 µl de cada anticorpo.
4. Adicionar 4 µl de GPRP no tubo de activação com trombina.
5. Misturar o conteúdo de cada tubo por agitação suave.
6. Adicionar a cada tubo 5µl da concentração indicada do agonista correspondente.
7. Incubar à temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos.
8. Adicionar a cada tubo 1 mL de tampão Tyrode (PBS) à temperatura ambiente.
9. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita (não exceder as 2 horas,).
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros (2.5mL).
3. O frio aumenta a activação plaquetária pelo que a diluição final (passo 8) deve fazer-se com tampão à temperatura ambiente.
4. No caso de não se poder analisar imediatamente a amostra, pode fixar-se a suspensão diluída (passo 7) com (1mL) paraformaldeído a 2% em PBS e manter a 4-8°C durante 24-48h.

# ***ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ACTIVAÇÃO NA SUPERFÍCIE PLAQUETÁRIA: receptor GPIIb/IIIa activado (PAC-1)***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com citrato  
Tampão de Tyrode  
PBS (opcional)  
Anticorpos monoclonais CD61-PercP e PAC1-FITC (BD)  
Agonistas plaquetários:

- ADP
- Trombina

Inibidor da coagulação:

- Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) 22mM

Tubos de polipropileno 12x75 mm  
Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Diluir a 1/10 o sangue total com tampão Tyrode (25 µl de sangue + 225 µl de tampão).
2. Rotular tubos de 12x75 mm, incluindo:
  - um tubo para avaliar de activação espontânea , sem agonista
  - um tubo para o controlo negativo, sem agonista e com RGD .
3. Colocar em cada tubo 25 µl de sangue diluído, 5 µl de anticorpo CD61-PercP e 10 µl de PAC-1.
4. Adicionar 4 µl de GPRP no tubo de activação com trombina.
5. Misturar o conteúdo de cada tubo por agitação suave.
6. Adicionar a cada tubo 5µl da concentração indicada do agonista correspondente.
7. Incubar à temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos.
8. Adicionar a cada tubo 1 mL de tampão Tyrode (PBS) à temperatura ambiente.
9. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita (não exceder as 2 horas,).
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros (2.5mL).
3. O frio aumenta a activação plaquetária pelo que a diluição final (passo 8) deve fazer-se com tampão à temperatura ambiente.
4. No caso de não se poder analisar imediatamente a amostra, pode fixar-se a suspensão diluída (passo 7) com (1mL) paraformaldeído a 2% em PBS e manter a 4-8°C durante 24-48h.

# ***ANÁLISE DE INTERACÇÕES PLAQUETA-LEUCÓCITOS***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com citrato

Tampão de Tyrode

PBS (opcional)

Anticorpos monoclonais CD41-PE e CD14-FITC (Immunotech)

Agonistas plaquetários:

- ADP
- Trombina

Inibidor da coagulação:

- Gly-Pro-Arg-Pro (GPRP) 22mM

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Diluir a 1/5 o sangue total com tampão Tyrode (50 µl de sangue + 200 µl de tampão).
2. Rotular tubos de 12x75 mm, incluindo um tubo para o controlo de activação espontânea (sem agonista).
3. Colocar em cada tubo 25 µl de sangue diluído e 10 µl de cada anticorpo.
4. Adicionar 4 µl de GPRP no tubo de activação com trombina.
5. Misturar o conteúdo de cada tubo por agitação suave.
6. Adicionar a cada tubo 5µl da concentração indicada do agonista correspondente.
7. Incubar à temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos.
8. Adicionar a cada tubo 1 mL de tampão Tyrode (PBS) à temperatura ambiente.
9. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita (não exceder as 2 horas,).
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros (2.5mL).
3. O frio aumenta a activação plaquetária pelo que a diluição final (passo 8) deve fazer-se com tampão à temperatura ambiente.
4. No caso de não se poder analisar imediatamente a amostra, pode fixar-se a suspensão diluída (passo 7) com (1mL) paraformaldeído a 2% em PBS e manter a 4-8°C durante 24-48h.

# ***ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA CINÉTICA DE CÁLCIO INTRACELULAR EM PLAQUETAS DE SANGUE TOTAL***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com citrato  
Tampão Tyrode com 0.35% BSA  
Fluo-3 AM (Sigma): 1mM em DMSO  
Anticorpo monoclonal CD41-PE (Immunotech)  
Agonistas de activação plaquetária:  
- ADP e Trombina  
Inibidor da coagulação: GPRP  
Banho termostatizado a 37°C  
Tubos de polipropileno 12x75 mm  
Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Rotular um tubo de 12x75 mm por amostra.
2. Diluir 50 µl de sangue total com 450 µl de tampão (diluição 1/10).
3. Adicionar 2.5 µl de Fluo-3 AM (cf 5µM) a cada tubo.
4. Incubar 15 minutos a 37°C no escuro.
5. Separar amostras de 25µl de sangue diluído marcado com Fluo-3.
6. Adicionar 5 µl de CD41-PE a cada tubo.
7. Adicionar 4 µl de GPRP nos tubos a activar com trombina
8. Incubar à temperatura ambiente, no escuro durante 15 minutos.
9. Diluir com 1mL de tampão Tyrode e usar amostras de 500µl para determinar as variações cinéticas de cálcio intracelular
10. Analisar no citómetro de fluxo segundo o protocolo correspondente:
11. Determinar a fluorescência verde basal do Fluo-3 da população plaquetária durante 20s
12. Interromper a aquisição da amostra (PAUSE), retirar o tubo e adicionar 25µl do agonista na concentração apropriada.
13. Colocar rapidamente o tubo no citómetro e retomar a aquisição (CONT) até que finalize o tempo programado.

### **Sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita de sangue (não exceder as 2 horas).
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros.
3. Para evitar a contaminação com plaquetas activadas entre duas análises consecutivas, recomenda-se intercalar tubos de sangue diluído entre as amostras activadas, adquirindo durante 15-30 segundos e interrompendo a análise. No caso da activação com trombina, deve ainda começar por intercalar-se um tubo com lixívia diluída.

# ***ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DO pH CITOSÓLICO EM PLAQUETAS DE SANGUE TOTAL***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com citrato

Tampão Hepes-Na<sup>+</sup>

BCECF AM (Molecular Probes): 1mM em DMSO

Anticorpo monoclonal CD41-PE (Immunotech)

Modificadores do pH:

- Propionato de Sódio 2M (pH 7.4)
- NH<sub>4</sub>Cl 200 mM (pH 7.4)
- Nigericina 40 μM
- EIPA

Banho termostatizado a 37°C

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Rotular um tubo de 12x75 mm por amostra.
2. Diluir 50 μl de sangue total com 450 μl de tampão (diluição 1/10).
3. Adicionar 4 μl de BCECF AM a cada tubo.
4. Incubar 10 minutos a 37°C no escuro
5. Separar amostras de 50 μl de sangue diluído marcado com BCECF.
6. Adicionar 10 μl de CD41-PE a cada tubo.
7. Incubar à temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos.
8. Adicionar a cada tubo 1mL de tampão HEPES-Na<sup>+</sup>
9. Analisar no citómetro de fluxo segundo o protocolo correspondente:
10. Introduzir o tubo da amostra no citómetro e começar a adquirir dados.
11. Aos 15 segundos parar a aquisição (PAUSE), retirar o tubo e adicionar 25 μl do agente modificadores do pH correspondente.
12. Colocar rapidamente o tubo no citómetro e recomençar a aquisição (CONT) até que termine o tempo programado.

### **Sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita de sangue (não exceder as 2 horas)
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros.
3. Para evitar a contaminação com plaquetas activadas entre as determinações consecutivas, recomenda-se intercalar tubos de sangue diluído entre amostras activadas, adquirindo durante 15-30 segundos e abortando depois a análise.

# **ANÁLISE DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO FOSFATIDILSERINA NA MEMBRANA PLAQUETÁRIA**

## **1. Material:**

Annexina V FITC Kit ( Immunotech):  
Sangue total anticoagulado com citrato  
Tampão Tyrode com 0.35% BSA  
Tampão Tyrode contendo  $\text{CaCl}_2$  2mM  
Tampão Tyrode contendo  $\text{CaCl}_2$  1.5 mM  
Anticorpo monoclonal CD41-PE (Immunotech)  
Agonistas de activação plaquetária:  
- íonoforo de  $\text{Ca}^{2+}$  A23187: 200 $\mu\text{M}$  em etanol  
Inibidor da coagulação: GPRP  
Banho termostatizado a 37°C  
Tubos de polipropileno 12x75 mm  
Citómetro de Fluxo

## **3. Procedimento:**

1. Rotular um tubo de 12x75 mm por amostra.
2. Diluir 50  $\mu\text{l}$  de sangue total com 450  $\mu\text{l}$  de tampão (diluição 1/10).
3. Colocar em cada tubo 50  $\mu\text{l}$  de sangue diluído e 10  $\mu\text{l}$  de CD41-PE.
4. Adicionar 8  $\mu\text{l}$  de GPRP
5. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente.
6. Adicionar 150 $\mu\text{l}$  de tampão Tyrode  $\text{CaCl}_2$  2mM e 4 $\mu\text{l}$  de anexina V-FITC
7. Incubar 10 min a 37°C
8. Diluir com 500 $\mu\text{l}$  tampão Tyrode  $\text{CaCl}_2$  1.5mM
9. Analisar no citómetro de fluxo segundo o protocolo correspondente:
10. Determinar a fluorescência verde basal da anexina V-FITC da população plaquetária 10-15s.
11. Interromper a aquisição da amostra (PAUSE), retirar o tubo e adicionar um volume apropriado do íonoforo de Cálcio A23187 (5-10 $\mu\text{l}$  da solução stock)
12. Colocar rapidamente o tubo no citómetro e retomar a aquisição (CONT) até que finalize o tempo programado.

### **Sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita de sangue (não exceder as 2 horas)
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros.
3. Para evitar a contaminação com plaquetas activadas entre as determinações consecutivas, recomenda-se intercalar tubos de sangue diluído entre amostras activadas, adquirindo durante 15-30 segundos e abortando depois a análise.



# ***ANÁLISE DA CINÉTICA DE CÁLCIO INTRACELULAR EM LINFÓCITOS***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com citrato  
Linfócitos esplênicos de rato  
Timócitos de rato  
Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)  
Solução de Hanks com 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 1 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  e 1% SBF (inativado) ou 0.5% BSA (solução de Hanks-Ca-Mg-Proteína)  
Fluo-3 AM (Sigma): solução stock de 1mg/mL em DMSO  
Manter congelado em alíquotas, a  $-20^\circ\text{C}$  ou  $-80^\circ\text{C}$   
Iodeto de propídio (Sigma, Molecular Probes): 1 mg/mL em água bidestilada  
Ionicina (Sigma): 1 mg/mL em DMSO  
Banho termostatizado a  $37^\circ\text{C}$   
Centrífuga clínica  
Tubos de polipropileno 12x75 mm  
Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Proceder à obtenção de suspensões de linfócitos humanos (isolamento de células mononucleares com Ficoll) ou de rato (desagregação do baço ou timo e ressuspender):  $10^6$  células/mL de solução de Hanks-Ca-Mg-Proteína
2. Separar 1 mL da suspensão celular em tubos de polipropileno 12x75 mm
3. Adicionar Fluo-3 AM a cada tubo: para estabelecer a concentração óptima de Fluo-3, experimentar concentrações de 1-5  $\mu\text{g/mL}$  (1-5  $\mu\text{L}$  de solução stock)
4. Incubar 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  no escuro,
5. Centrifugar a suspensão celular: 5 min x 180 g
6. Decantar cuidadosamente o sobrenadante e ressuspender em 1 mL de solução de Hanks-Ca-Mg-Proteína.
7. Deixar as células no escuro à temperatura ambiente até ao momento de análise (cerca de 15 minutos depois).
8. Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de propídio para excluir células mortas.
8. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente:
9. Introduzir o tubo da amostra no citómetro e começar a adquirir eventos.
10. Aos 15 segundos, parar a aquisição (PAUSE), tirar o tubo e adicionar o volume do agonista correspondente.
11. Colocar rapidamente o tubo no citómetro e recomeçar a aquisição (CONT) até que termine o tempo programado (300 segundos).

## **Sugestões**

1. Não se devem utilizar concentrações saturantes de Fluo-3, pois podem mascarar os movimentos reais de cálcio
2. Pode-se comprovar que a concentração de Fluo-3 não é saturante acrescentando ionomicina (conc. final: 2 µg/mL) e observando um aumento de fluorescência.

## **ACTIVAÇÃO DE LINFÓCITOS PARA A ANÁLISE DE CITOKINAS INTRACELULARES**

### **1. Material:**

Sangue total anticoagulado

Suspensões de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Meio de Cultura RPMI 1640

Ionóforos de Cálcio:

- Ionomicina (Sigma): 1 mg/mL em DMSO
- Ionóforo A23187 (Sigma): 1 mg/mL em etanol

Acetato de Forbol Miristato (PMA, Sigma): 1 mg/mL

Indutores específicos da síntese de citokinas/quimiocinas:

- Anticorpo CD3
- Anticorpo CD28
- IL-2 humana recombinante (rhIL-2, Pharmingen)
- IL-4 humana recombinante (rhIL-4, Pharmingen)
- IFN- $\gamma$  humano recombinante (rhIFN $\gamma$ , Pharmingen)
- Lipopolissacárido bacteriano (LPS, Sigma)

Bloqueadores do transporte de proteínas:

- Brefeldina A (Sigma) ou GolgiPlug<sup>TM</sup> (Pharmingen)
- Monensina (Sigma) ou GolgiStop<sup>TM</sup> (Pharmingen)

Placas de cultura de múltiplos poços

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Agitador de tubos (vórtex)

Incubador a 37°C/5% CO<sub>2</sub>

### **2. Procedimento de activação em sangue total:**

1. Diluir 1:1 vol/vol o sangue total com meio RPMI 1640 e misturar bem.
2. Adicionar uma das seguintes combinações de activadores:  
PMA 50 ng/mL + Ionomicina 1 µM  
PMA 50 ng/mL + ionóforo A23187 1 µg/mL  
em presença de um inibidor do transporte de proteínas.
3. Agitar brevemente no vortex para misturar bem.
4. Distribuir alíquotas de 200 µl em tubos de polipropileno de 12x75 mm.
5. Incubar 4 a 6 horas numa estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>
6. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **3. Procedimento de indução de citokinas específicas:**

1. Obter suspensões de PBMC ou de células CD4+ ou CD8+ purificadas (sobre tudo para a indução de IL-5 e IL-13).
2. Dispensar alíquotas de  $10^6$  células em cada poço da multiplaca.
3. Processar as amostras de acordo com o padrão de citocinas a induzir:

### **3.1 Indução de IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GM-CSF:**

1. Recobrir a superfície dos poços com anticorpo CD3 (10  $\mu$ g/mL)
2. Dispensar alíquotas de  $10^6$  células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
3. Adicionar a seguinte mistura de ativadores :
  - Anticorpo CD28: 2  $\mu$ g/mL
  - rhIL-2: 10 ng/mL
  - rhIL-4: 20 ng/mL
4. Incubar durante 2 dias em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> .
5. Lavar as células e ressuspender em meio RPMI contendo rhIL-2 e rhIL-4.
6. Incubar durante 3 dias.
7. Recolher as células e reestimulá-las durante 4 horas com uma das combinações de ativadores:
  - PMA 5 ng/mL + Ionomicina 500 ng/mL
  - PMA 5 ng/mL + ionóforo A23187 250 ng/mLem presença de um inibidor do transporte de proteínas.
8. Proceder à marcação simultânea de superfície/intracelular.

### **3.2 Indução de TNF- $\beta$ :**

1. Recobrir a superfície dos poços com anticorpo CD3 (10  $\mu$ g/mL)
2. Dispensar alíquotas de  $10^6$  células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
3. Adicionar rhIL-2: 10 ng/mL
4. Incubar durante 2 dias em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> .
5. Lavar as células e ressuspender em meio RPMI contendo rhIL-2.
6. Incubar durante 3 dias.
7. Recolher as células e reestimulá-las durante 4 horas com uma das combinações de ativadores:
  - PMA 5 ng/mL + Ionomicina 500 ng/mL
  - PMA 5 ng/mL + ionóforo A23187 250 ng/mL
  - anticorpo CD3 + anticorpo CD28em presença de um inibidor de transporte de proteínas.
8. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **3.3 Indução de IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ :**

1. Dispensar alíquotas de  $10^6$  células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
2. Estimular as células durante 6 horas com uma das combinações de ativadores:
  - PMA 50 ng/mL + Ionomicina 500 ng/mL
  - PMA 50 ng/mL + ionóforo A23187 500 ng/mLem presença de um inibidor de transporte de proteínas.
3. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **3.4 Indução de IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8 e GRO- $\alpha$ :**

1. Dispensar alíquotas de 10<sup>6</sup> células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
2. Estimular as células durante 4 horas com LPS (1  $\mu$ g/mL) na presença de um inibidor do transporte de proteínas.
3. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **3.5 Indução de IL-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MCP-3 e MIG:**

1. Dispensar alíquotas de 10<sup>6</sup> células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
2. Estimular as células durante 24 horas com LPS (1  $\mu$ g/mL) em presença de um inibidor do transporte de proteínas.
3. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **3.6 Indução de IL-12:**

1. Dispensar alíquotas de 10<sup>6</sup> células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
2. Pré-estimular as células durante 2 horas com rhIFN- $\gamma$  (10 ng/mL)
3. Estimular as células com rhIFN- $\gamma$  (10 ng/mL) e LPS (1  $\mu$ g/mL) durante 22 horas em presença de um inibidor do transporte de proteínas.
4. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **3.7 Indução de RANTES:**

1. Dispensar alíquotas de 10<sup>6</sup> células (1 mL RPMI) nos poços determinados.
2. Cultivar as células (preferencialmente células T) durante 24 horas em presença de um inibidor do transporte de proteínas (preferencialmente monensina ou GolgiStop).
3. Proceder à marcação simultânea superfície/intracelular.

### **Sugestões**

1. Os parâmetros críticos na análise citométrica de citocinas são o tipo celular e o protocolo de activação; a duração do período de incubação; a inclusão de um inibidor do transporte de proteínas e a eleição de um anticorpo anti-citocina.
2. A incubação com inibidores do transporte de proteínas pode interferir com a expressão de marcadores de superfície (p.ex., a brefeldina diminui a expressão na superfície de CD14)
3. A activação com PMA provoca uma diminuição transitória da expressão de CD4. A activação com PMA e ionóforos de cálcio provoca uma diminuição mais duradoura e intensa.

# ***DETECÇÃO DE CITOKINAS INTRACELULARES EM LINFÓCITOS ACTIVADOS***

## **A) CONTROLO DA ACTIVAÇÃO BASAL (CD69 na superfície)**

1. Tomar 100  $\mu$ L de sangue total incubado com GolgiStop sem estímulos.
2. Adicionar 10  $\mu$ L de CD69-PC5.
3. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
4. Lisar-fixar no preparador automático TQ-PREP.
5. Analisar no citómetro de fluxo.

## **B) CONTROLO DA ACTIVAÇÃO (CD69 na superfície)**

1. Tomar 100  $\mu$ L de sangue total incubado com PMA e ionomicina e sem GolgiStop.
2. Adicionar 10  $\mu$ L de CD69-PC5.
3. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
4. Lisar-fixar mediante o sistema TQ-PREP.
5. Analisar no citómetro de fluxo.

## **C) CONTROLO DA PERMEABILIZAÇÃO (CD69 intracelular)**

1. Tomar 100  $\mu$ L de sangue total incubado com PMA, ionomicina e GolgiStop.
2. Lavar com tampão de lavagem (PBS + BSA a 05%) durante 5 minutos a 500g.
3. Adicionar 250  $\mu$ L de CytoFix/CytoPerm à pellet e incubar 20 minutos a 4°C.
4. Lavar 2 vezes com solução Perm/Wash 1X (5 minutos a 500g).
5. Adicionar à pellet 50  $\mu$ L de solução Perm/Wash 1X e 10  $\mu$ l do anticorpo para detecção da activação CD69-PC5.
6. Incubar 30 minutos a 4°C.
7. Lavar 2 vezes com solução Perm/Wash 1X (5 minutos a 500g).
8. Ressuspender o pellet em 1 mL de PBS.
9. Analisar no citómetro de fluxo.

## **D) DETECÇÃO INTRACELULAR DA PRODUÇÃO BASAL DE CITOKINAS EM LINFÓCITOS**

1. Tomar 100  $\mu$ L de sangue total incubado com GolgiStop sem estímulos.

2. Adicionar 20  $\mu$ L de CD8-FITC e 20  $\mu$ L de CD3-PC5.
3. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
4. Lavar com tampão de lavagem (PBS + BSA a 05%) durante 5 minutos a 500g.
5. Adicionar 250  $\mu$ L de CytoFix/CytoPerm à pellet e incubar 20 minutos a 4°C.
6. Lavar 2 vezes com solução Perm/Wash 1X (5 minutos a 500g).
7. Adicionar à pellet 50  $\mu$ L de solução Perm/Wash 1X e 20  $\mu$ l do anticorpo para a marcação intracelular de citocinas (IL2-PE, IFN $\gamma$ -PE...) ou o controlo isotípico correspondente (IgG1-PE o IgG2-PE).
8. Incubar 30 minutos a 4°C.
9. Lavar 2 vezes com solução Perm/Wash 1X (5 minutos a 500g).
10. Ressuspender o pellet em 1 mL de PBS.
11. Analisar no citómetro de fluxo.

#### **E) DETECÇÃO INTRACELULAR DE CITOKINAS EM LINFÓCITOS ACTIVADOS**

1. Tomar 100  $\mu$ L de sangue total incubado com PMA, ionomicina e GolgiStop.
2. Adicionar 20  $\mu$ L de CD8-FITC e 20  $\mu$ L de CD3-PC5.
3. Incubar 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
4. Lavar com tampão de lavagem (PBS + BSA a 05%) durante 5 minutos a 500g.
5. Adicionar 250  $\mu$ L de CytoFix/CytoPerm a pellet e incubar 20 minutos a 4°C.
6. Lavar 2 vezes com solução Perm/Wash 1X (5 minutos a 500g).
7. Adicionar à pellet 50  $\mu$ L de solução Perm/Wash 1X e 20  $\mu$ l do anticorpo para a marcação intracelular de citocinas (IL2-PE, IFN $\gamma$ -PE...) ou o controlo isotípico correspondente (IgG1-PE o IgG2-PE).
8. Incubar 30 minutos a 4°C.
9. Lavar 2 vezes com solução Perm/Wash 1X (5 minutos a 500g).
10. Ressuspender a pellet em 1 mL de PBS.
11. Analisar no citómetro de fluxo.

# ***ANÁLISE DO pH INTRACELULAR EM LEUCÓCITOS DE SANGUE TOTAL***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado com EDTA

Tampão Hepes-Na<sup>+</sup>

BCECF- AM (Sigma): 1mM em DMSO

Anticorpo monoclonal CD45-PC5 (Immunotech)

Modificadores do pH:

- Propionato
- CINH<sub>4</sub>
- Nigericina
- EIPA

Inibidor da coagulação: GPRP

Banho termostatizado a 37°C

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Rotular um tubo de 12x75 mm por amostra.
2. Diluir 50 µl de sangue total com 450 µl de tampão (diluição 1/10).
3. Adicionar 4 µl de BCECF AM a cada tubo.
4. Incubar 10 minutos a 37°C no escuro
5. Separar amostras de 50 µl de sangue diluído marcado com BCECF.
6. Adicionar 5 µl de CD45-PC5 a cada tubo.
7. Incubar à temperatura ambiente e no escuro durante 15 minutos.
8. Adicionar a cada tubo 1mL de tampão HEPES-Na<sup>+</sup>
9. Analisar no citómetro de fluxo segundo o protocolo correspondente:
10. Introduzir o tubo da amostra no citómetro e começar a adquirir eventos.
11. Aos 15 segundos, parar a aquisição (PAUSE), retirar o tubo e Adicionar o volume do agonista (ou agente modificador do pH) correspondente.
12. Colocar rapidamente o tubo no citómetro e recomeçar a aquisição(CONT) até que termine o tempo programado.

### **Sugestões**

1. A determinação da activação plaquetária deve fazer-se o mais rapidamente possível após a colheita de sangue (não exceder as 2 horas.)
2. A colheita de sangue deve fazer-se evitando a possível utilização de torniquete e rejeitando os primeiros mililitros.
3. Para evitar a contaminação com plaquetas activadas entre as determinações consecutivas, recomenda-se intercalar tubos de sangue diluído entre amostras activadas, adquirindo durante 15-30 segundos e abortando depois a análise.

# ***ANALISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DO CONTEÚDO EM DNA EM CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA***

## **1. Material:**

### ***Sistema DNA-Prep*** (Beckman-Coulter)

- ***DNA-Prep LPR***: Reagente de lise dos eritrócitos e permeabilização de membranas celulares
- ***DNA-Prep Stain***: Reagente de iodeto de propídio e RNase

Meio de cultura RPMI 1640 ou análogo

Filtros de nylon de 35-60 µm de diâmetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Contador electrónico de células

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Determinar a concentração leucocitária da amostra com um contador electrónico de células ou hemocítmetro. Se for necessário acrescentar RPMI ou eliminar plasma até que a concentração esteja no intervalo de  $1-10 \times 10^6$  células/mL.
2. Adicionar 100 µl de amostra a cada tubo.
3. Processar cada tubo no sistema DNA-Prep utilizando a opção "CYCLE".
4. Incubar 1 hora à temperatura ambiente e no escuro ou deixar uma noite a 4°C.
5. Filtrar a través da malha de nylon.
6. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. Na maior parte dos casos, pode-se omitir a contagem celular prévia. Recomenda-se ajustar a concentração em casos de síndromes linfoproliferativas ou de imunodeficiências.
2. A incubação das amostras a 4°C durante toda a noite melhora a qualidade da marcação.
3. Pode-se aumentar a velocidade de análise da amostra centrifugando a suspensão de células coradas e eliminando parte do sobrenadante.
4. Analisar sempre utilizando uma baixa velocidade de fluxo no citómetro.



# **ANÁLISE DO CONTEÚDO EM DNA EM SUSPENSÕES CELULARES**

## **1. Material:**

Sistema DNA-Prep (Beckman-Coulter)

- **DNA-Prep LPR:** Reagente de lise dos eritrócitos e permeabilização de membranas celulares
- **DNA-Prep Stain:** Reagente de iodeto de propídio e RNasa

Meio de cultura RPMI 1640 ou análogo

PBS

Etanol 70% (manter a  $-20^{\circ}\text{C}$ )

Filtros de nylon de 35-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Banho de gelo

Contador electrónico de células

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Obter suspensões de células individuais a partir de culturas celulares em monocamada ou em suspensão.
2. Centrifugar as suspensões e lavar uma vez com meio de cultura ou PBS.
3. Decantar o sobrenadante e ressuspender o sedimento com o vortex.
4. Fixar as células adicionando gota a gota 1 mL de etanol 70% gelado, mantendo o tubo em agitação com o vortex.
5. Manter a  $-20^{\circ}\text{C}$  pelo menos durante 1 hora.
6. Lavar uma vez a suspensão de células fixadas com PBS e decantar o sobrenadante.
3. Processar o tubo com o sedimento no sistema DNA-Prep utilizando a opção "CYCLE".
4. Incubar 1 hora a temperatura ambiente e no escuro ou deixar uma noite a  $4^{\circ}\text{C}$ .
5. Filtrar através de malha de nylon.
6. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. Pode-se evitar a fixação das células com etanol. No entanto, este procedimento permite conservar as células durante várias semanas no congelador ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) antes da análise. Além disso, a permeabilização induzida pelo etanol é necessária para outros procedimentos analíticos (marcação de proteínas totais, determinação de células apoptóticas com conteúdo subdiploide de DNA), etc., que se poderiam aplicar à mesma amostra.
2. A incubação das amostras a  $4^{\circ}\text{C}$  durante toda a noite melhora a qualidade da marcação
3. Pode-se aumentar a velocidade de análise da amostra centrifugando a suspensão de células coradas e eliminando parte do sobrenadante.
4. Analisar sempre utilizando uma baixa velocidade de fluxo no citómetro.

# ***ANÁLISE SIMULTÂNEA DO CONTEÚDO EM DNA E DO FENÓTIPO DE SUPERFÍCIE***

## **1. Material:**

Anticorpos conjugados (FITC ou PC5) dirigidos para os antígenos de eleição  
Controlos isotípicos adequados aos anticorpos monoclonais utilizados  
IntraPrep Permeabilization Reagent (Immunotech)  
Reactivo DNA-Prep Stain (Beckman-Coulter): Diluir 1:10 em PBS  
Solução de iodeto de propídio (5 µg/mL em PBS, conservada a 4°C no escuro)  
Meio de cultura RPMI 1640 ou análogo  
PBS  
Filtros de nylon de 35-60 µm de diâmetro  
Tubos de polipropileno 12x75 mm  
Contador electrónico de células  
Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Obter uma suspensão celular (não fixada) como se descreve nos protocolos anteriores para os diferentes tipos de amostras de interesse.
2. Colocar 10 µl de anticorpo monoclonal conjugado num tubo de 12x75 mm. Adicionar 100 µl de amostra ( $5 \times 10^5$ ) e agitar no vórtex durante uns segundos.
3. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
4. Adicionar 100 µl de IntraPrep-Reactivo 1 (reagente de fixação) e agitar com vórtex.
5. Incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
6. Lavar com PBS e decantar o sobrenadante.
7. Adicionar ao sedimento celular 100 µl de IntraPrep-Reagente 2 e agitar suavemente.
8. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Agitar suavemente de vez em quando sem utilizar vortex.
9. Lavar com PBS e decantar o sobrenadante.
10. Ressuspender o sedimento celular em 1 mL de reagente DNA-Prep Stain diluído ou de solução de iodeto de propídio.
11. Incubar no escuro 1 hora à temperatura ambiente ou deixar uma noite a 4°C.
12. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. A utilização de soluções concentradas de iodeto de propídio complica os procedimentos de compensação de fluorescência, especialmente quando a marcação da imunofenotipagem é fraca.
2. A incubação das amostras a 4°C durante toda a noite melhora a qualidade da marcação.
3. Pode-se aumentar a velocidade de análise da amostra centrifugando a suspensão de células coradas e eliminando parte do sobrenadante.
4. Analisar sempre utilizando uma baixa velocidade de fluxo no citómetro.

# ***ANÁLISE DA PERMEABILIDADE PARCIAL AO IODETO DE PROPÍDIO***

## **1. Material:**

Solução de iodeto de propídio: 1 mg/mL em PBS  
Meio de cultura RPMI 1640 ou análogo  
PBS  
Tubos de polipropileno 12x75 mm  
Citómetro de Fluxo

## **3. Procedimento:**

### **4.**

1. Obter suspensões de células individuais a partir de culturas celulares em monocamada ou em suspensão.
2. Ressuspender as células em 1 mL de meio de cultura ou em PBS ( $10^5$ - $10^6$  células/mL).
3. Adicionar 5  $\mu$ l de solução de iodeto de propídio.
4. Incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente e no escuro.
5. Analisar no citómetro de fluxo seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. A análise monoparamétrica da fluorescência de iodeto de propídio pode incluir, entre a população de permeabilidade parcial ao propídio, corpos apoptóticos com necrose secundária. Para quantificar com precisão as células apoptóticas é melhor realizar uma análise biparamétrica de fluorescência de propídio frente à dispersão frontal de luz.
2. A incubação prolongada das amostras antes da sua análise pode aumentar a percentagem de células apoptóticas ou necróticas, especialmente se estão ressuspensas em PBS em vez de meio de cultura

# ***ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RESÍDUOS DE FOSFATIDILSERINA NA MEMBRANA PLASMÁTICA***

## **1. Material:**

Annexina V FITC Kit ( Immunotech):

- Anexina V humana recombinante, conjugada com FITC
- iodeto de propídio (250 µg)
- Tampão de ligação concentrado (Binding Buffer 10x)
- Água bidestilada

Meio de cultura ou RPMI 1640 ou análogo

PBS

Tubos de polipropileno 12x75 mm

Banho de gelo

Citómetro de Fluxo

## **2. Procedimento:**

1. Obter suspensões de células individuais pelos procedimentos específicos descritos anteriormente.
2. Diluir 1:10 o tampão de ligação com água bidestilada e manter em banho de gelo.
3. Dissolver 250 µg de iodeto de propídio em 1 mL de tampão de ligação diluído.
4. Lavar a suspensão celular em meio de cultura ou PBS frio.
5. Eliminar o sobrenadante e ressuspender o sedimento celular em tampão de ligação diluído a uma concentração de  $10^5$ - $10^6$  células/mL. Manter os tubos em gelo.
6. Separar para um tubo de propileno 490 µl de suspensão celular e acrescentar 5 µl de anexina V-FITC e 5 µl de solução de iodeto de propídio.
7. Incubar a 4°C e no escuro durante 10 minutos.
8. Analisar imediatamente por citometria de fluxo, seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. Preparar cada dia a quantidade aproximada de tampão diluído que for necessária. Se se utiliza um kit com anexina concentrada (Immunotech IM 2376), preparar cada dia a quantidade de anexina diluída (1:10 em tampão diluído) necessária. Conservar as soluções stock concentradas.
2. A apoptose é um fenómeno que pode prosseguir durante a incubação com anexina. Procurar analisar imediatamente as amostras marcadas.
3. O tampão de ligação contém cálcio que pode acelerar a lesão da membrana e induzir a necrose em células funcionalmente comprometidas.
4. O uso de iodeto de propídio para discriminar células apoptóticas e necróticas requer uma correcta compensação de fluorescência entre FITC e PI.

# ***ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES OXIDANTES EM LEUCÓCITOS ISOLADOS DE SANGUE PERIFÉRICO***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado

Hidroetidina (HE, Sigma): 1 mg/mL em DMSO

Dihidrorhodamina 123 (DHRH123, Sigma): 1 mg/mL em DMSO

Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)

Meio de cultura RPMI (Sigma)

Tubos eppendorf de 1.5 mL

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Citómetro de Fluxo

## **3. Procedimento:**

1. Dispensar 800  $\mu$ l de Ficoll (à temperatura ambiente) num tubo eppendorf de 1.5 mL colocado verticalmente sobre um suporte estável
2. Dispensar cuidadosamente 500  $\mu$ l de sangue total anticoagulado, evitando que se misture com o Ficoll.
3. Deixar repousar durante 15-20 minutos o tubo aberto para que os eritrócitos agreguem em presença do Ficoll e precipitem.
4. Quando os eritrócitos tiverem precipitado, aspirar cuidadosamente alíquotas de 100  $\mu$ l da parte superficial da camada superior.
5. Dispensar cada alíquota num tubo de 12x75 mm e diluir a 1/10 (900  $\mu$ l) com meio RPMI a 37°C.
6. Adicionar a cada tubo 5  $\mu$ l de HE e 5  $\mu$ l de DHRH123 (concentração final: 5  $\mu$ g/mL de cada fluorocromo) e incubar durante 10 minutos exactamente, no escuro.
9. Analisar imediatamente por citometria de fluxo, seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. Recomenda-se proceder à análise o mais rapidamente possível, após a extracção da amostra (não exceder as 4 horas).
2. A agitação, incubação prolongada e a luz intensa provocam a activação dos granulócitos.

# ***ANÁLISE SIMULTÂNEA DA FAGOCITOSE E BURST OXIDATIVO EM LEUCÓCITOS ISOLADOS***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado

Suspensão de leveduras (Mimosas, Sigma) fluorescentes opsonizadas com soro AB (Zimosan-FITC)

Hidroetidina (HE, Sigma): 1 mg/mL em DMSO

Ficoll Histopaque 1.077 (Sigma)

Meio de cultura RPMI (Sigma)

Tubos eppendorf de 1.5 mL

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Citómetro de Fluxo

## **3. Procedimento:**

1. Dispensar 800  $\mu$ l de Ficoll (à temperatura ambiente) num tubo eppendorf de 1.5 mL colocado verticalmente sobre um suporte estável
2. Dispensar cuidadosamente 500  $\mu$ l de sangue total anticoagulado, evitando que se misture com o Ficoll.
3. Deixar repousar durante 15-20 minutos o tubo aberto, para que os eritrócitos agreguem na presença do Ficoll e precipitem.
4. Quando os eritrócitos tiverem precipitado aspirar cuidadosamente alíquotas de 100  $\mu$ l da parte superficial da camada superior.
5. Dispensar cada alíquota em tubos de 12x75 mm e diluir 1/10 (900  $\mu$ l) com meio RPMI a 37°C. Incluir um tubo para o controlo de activação espontânea (na ausência de leveduras).
6. Adicionar a cada tubo 5  $\mu$ l de HE (concentração final: 5  $\mu$ g/mL) e incubar durante 10 minutos exactamente.
7. Adicionar 10  $\mu$ l de zimosan-FITC ao tubo correspondente.
8. Incubar 15 minutos a 37°C no escuro.
9. Analisar imediatamente por citometria de fluxo, seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. Recomenda-se proceder à análise o mais rapidamente possível, após a extracção da amostra (não exceder as 4 horas).
2. A agitação, incubação prolongada e a luz intensa provocam a activação dos granulócitos.
3. A concentração das suspensões de leveduras fluorescentes pode ser determinada no citómetro de fluxo utilizando um protocolo de contagem absoluta.

# ***ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NOS LEUCÓCITOS***

## **1. Material:**

Sangue total anticoagulado

Reagente Immuno-Prep e sistema de preparação Q-Prep (Coulter)

Anticorpos conjugados com FITC ou PE (Immunotech) específicos para moléculas de adesão da família das integrinas (CD18, CD11a, CD11b, CD11c) ou selectinas (CD62L).

Estímulos de activação leucocitária:

- N-formil-Met-Leu-Phe (FMLP, Sigma):
- Forbol-12-Miristato Acetato (PMA, Sigma):
- Lipopolissacárido bacteriano (LPS, Sigma):

Tubos de polipropileno de 12x75 mm

Banho termóstatizado a 37°C

Banho de gelo

Citómetro de Fluxo

## **3. Procedimento:**

1. Rotular tubos de 12x75 mm, incluindo um tubo para cada estímulo a usar e um tubo de controlo para a activação espontânea.
2. Colocar 100 µl de sangue total em cada tubo, procurando que fique no fundo do tubo.
3. Adicionar em cada tubo 5 µl dos anticorpos correspondentes, de acordo com a combinação de moléculas de adesão que se deseja investigar.
4. Adicionar o estímulo de activação correspondente a cada tubo.
5. Incubar durante 15 minutos.
6. Parar a activação introduzindo os tubos em gelo.
7. Lisar os eritrócitos e estabilizar a suspensão de leucócitos com o sistema Immuno-Prep.
8. Analisar por citometria de fluxo, seguindo o protocolo correspondente.

### **Sugestões**

1. O uso de sangue total minimiza a activação artefactual dos granulócitos e monócitos.
2. A fixação das amostras permite adiar a análise até 48 horas, se forem mantidas no frigorífico e no escuro.