

Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental

16. Preparo de células para avaliação de parâmetros inflamatórios e imunológicos

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

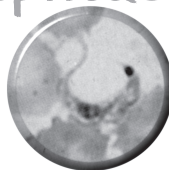


All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Capítulo 16



Preparo de Células para Avaliação de Parâmetros Inflamatórios e Imunológicos

Tania C. Araújo-Jorge, Vinicius Cotta-de-Almeida, Bianca P. Olivieri & Andrea Henriques-Pons

No Capítulo 15 descrevemos procedimentos para análise de marcadores humorais de inflamação e de resposta imune. No presente capítulo vamos nos concentrar nos procedimentos para análise de células obtidas de tecidos linfóides.

O sistema imune está distribuído em órgãos linfóides centrais e periféricos e também em vias de fluxo celular entre esses órgãos e outros tecidos-alvo, isto é, o sangue e a linfa. O estudo das células presentes em quaisquer desses compartimentos do sistema imunológico pode traduzir um estado patológico deste sistema. Como as células efetoras são essencialmente circulantes e migratórias, os órgãos linfóides funcionam como verdadeiros “sacos” de células, que podem ser fragmentados e homogeneizados de modo a colocar as células em suspensão apenas com dissociação mecânica, sem tratamentos enzimáticos do tecido.

Diversas alterações são observadas no sistema imunológico no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: ativação policlonal de células T e B, imunossupressão da resposta proliferativa, citotoxicidade exacerbada, apoptose de linfócitos, atividade auto-reativa, depleção de linfócitos tímicos, entre outras. Por isso a análise de células do sistema imunológico tem sido objeto de intensos e abrangentes estudos visando aprofundar as investigações da atividade imunitária na infecção pelo *T. cruzi*.

16.1 Obtenção de Células de Sangue, Peritônio, Baço e Linfonodos

O preparo de suspensões celulares com alta viabilidade é essencial para ensaios baseados em atividade celular: proliferação e diferenciação de funções efetoras, análises fenotípicas por citometria de fluxo, ou ensaios de interação entre células do sistema imune (por exemplo, apresentação antigênica) ou entre elas e células-alvo (por exemplo, citotoxicidade). Para qualquer destas abordagens, tendo em vista traduzir um estado operante no momento em que se extrai o órgão ou o fluido do animal em estudo, é muito importante que a morte dos animais e a extração e processamento dos órgãos seja feita de forma rápida e cuidadosa para maior preservação das amostras. Alguns cuidados especiais:

- usar materiais cirúrgicos adequados, principalmente no que tange à retirada de linfonodos muito pequenos, ou timo atrofiado;

- evitar presença de sangue (hemólise, uso de gradiente de Ficoll);
- usar homogeneizadores de tecidos de forma apropriada;
- usar soluções salinas adequadas: (1) salina fosfatada tamponada (PBS) com soro bovino fetal 2 a 5% ou (2) solução salina balanceada: BSS ou Hanks, com soro bovino fetal 2 a 5%.

Material

- câmara de anestesia com clorofórmio ou éter (vidro com tampa larga, e algodão no fundo)
- álcool a 70%
- placa de cortiça (para a fixação do animal)
- placa de Petri com solução salina para as lavagens
- pipetas Pasteur para troca da salina de lavagem
- recipientes de descarte de líquidos e de carcaças com as devidas soluções desinfetantes
- tesoura de ponta afiada
- pinças anatômica, dente de rato e de relojoeiro
- sistema de homogeneização: (a) êmbolos de seringa para maceramento, (b) tela (peneira) de arame ou náilon, (c) lâminas de bordas esmerilhadas, ou (d) homogeneizador de tecido
- cuba de gelo para os tubos
- tubos de 15 ml para centrífuga, previamente rotulados com o material a receber
- solução salina tamponada sem soro, em banho de gelo (PBS ou BSS)
- solução salina com 2 a 5% de soro fetal bovino (PBS-SFB ou BSS-SFB) em banho de gelo
- câmara de Neubauer para contagem de células
- solução de azul Tripan 0,2 a 0,4% para avaliação de viabilidade celular
- tubos de microcentrífuga para diluições
- micropipetas de 200 e 20 ml
- seringas de 1, 5 e 10 ml com as respectivas agulhas
- ponteiras de micropipetas
- contador
- heparina

Procedimento

- anestésiar o animal;
- fazer punção cardíaca para coleta de sangue em seringa heparinizada para obtenção de células mononucleares sangüíneas e plasma (manter no gelo até o processamento);
- abrir a pele do abdômen sem ruptura do peritônio;
- injetar 4 a 6 ml de solução salina ou meio de cultura sem soro (seringa de 10 ml) na cavidade peritoneal para lavagem e coleta das células (manter no gelo até o processamento);
- abrir a parte ventral do animal para exposição e retirada dos linfonodos subcutâneos (inguinais, braquiais, axilares, etc.), do peritônio para exposição dos órgãos de interesse (baço e linfonodos mesentéricos), e do tórax para retirada do timo e linfonodos dessa região, caso haja interesse;
- coletar os órgãos e depositá-los em placas de Petri com salina gelada (a pesagem do baço é essencial);
- lavar em salina gelada;
- homogeneizar para ruptura das cápsulas e liberação das células linfóides;
- coletar as células com pipetas Pasteur e transferir para tubos cônicos de 15 ml. No caso de células do baço, lisar as hemáceas;
- lavar 2-3 x em salina (volume oito a dez vezes maior do que o da suspensão) com centrifugações sucessivas
- ressuspender em solução adequada (meio de cultura ou BSS), contagem de rendimento e viabilidade celular (diluição 1:1 com azul tripan 0,4%).

O rendimento de células esperado para camundongos normais, variando na dependência da linhagem de camundongos utilizada, é o seguinte: células peritoneais = 1 a 3×10^6 , timo = 100 a 300×10^6 , linfonodos mesentéricos = 50 a 100×10^6 , baço = 50 a 150×10^6 . A determinação da celularidade é essencial para uma determinação posterior de números absolutos de subpopulações fenotípicas (B, T, CD4, CD8).

Obs 1: o procedimento para *timo* e *linfonodos* são os descritos acima. O *baço*, pela alta quantidade de eritrócitos, deve ser submetido à hemólise com soluções hemolíticas adequadas à base de: (1) NH_4Cl , devendo por isto passar por extensa lavagem, devido à toxicidade deste componente para as outras células na suspensão, (2) choque hipotônico por 10 segundos, ou (3) separação celular por gradiente de Ficoll.

Obs 2: O *sangue* deve ser obtido em anticoagulante (heparina, EDTA, etc.) por punção cardíaca, retroorbital ou femural, seguida de separação de células mononucleares por gradiente de densidade.

Obs 3: Após a remoção dos órgãos todo o procedimento deve ser realizado em banho de gelo.

Obs 4: As *células do peritônio* devem ser obtidas injetando-se meio de cultura gelado na cavidade peritoneal; após massageamento do peritônio cheio de líquido proceder à retirada com seringa ou pipetas tipo Pasteur. Depois da lavagem da suspensão celular com nova solução de meio adequado, as células ficam em condições de trabalho para imunofenotipagem ou para ensaios funcionais.

16.2 Preparo e Caracterização de Esfregaços Celulares por Citocentrifugação

A centrífuga de células (Cytospin) permite o preparo de esfregaços das suspensões celulares para uma análise morfológica ou imunocitoquímica. Ela é desenhada para preparar uma monocamada de células numa área definida, para posterior processamento. É útil para o estudo de suspensões cuja densidade, com número insuficiente para análise por citometria, ou para gerar amostras para análise microscópica de suspensões utilizadas em outras metodologias. Compõe-se de um suporte para lâmina com um funil plástico que concentra as células ali depositadas num cilindro que drena para uma única área da lâmina. Entre a lâmina e o suporte é colocado um molde espesso de papel de filtro perfurado exatamente no local de encontro com o cilindro que depositará as células na área pré-determinada. O número ideal de células a ser dispersadas no campo circular que forma a base do cilindro é de quinhentas células.

Material

- citocentrífuga e seus acessórios
- lâminas com borda esmerilhada, previamente identificadas a lápis; podem ser ou não previamente revestidas com gelatina, poli-*L*-lisina ou aminosilane
- suspensão de células a $1 \times 10^6/\text{ml}$ (células de 10 a 12 μm de diâmetro); pode ser numa densidade maior ou menor, a depender do tamanho das células
- para amostras de sangue, lisar as hemáceas, ou separar os leucócitos em gradiente de Ficoll. Para o preparo do esfregaço, que possa ser utilizado em citoquímica, a contagem de hemáceas deve ser menor que $5000/\mu\text{l}$ ($<5 \times 10^6/\text{ml}$)
- solução de albumina 30%
- fixador: etanol 70%+polietileno glicol 2% (fixador de Saccomano) ou paraformaldeído 4%
- micropipetas e ponteiras
- cubas de descarte para desinfecção de ponteiras, lâminas e filtros, e para desinfecção e lavagem dos suportes e presilhas

Procedimento

- limpar as lâminas com álcool e identificá-las;
- preparar os conjuntos de suporte/filtro/lâmina/preendedor;
- aplicar 25 µl de albumina 30% no fundo da câmara de amostra (apenas se não for ser feito processamento de imunofluorescência; a albumina interfere com o brilho);
- aplicar 25 µl da suspensão no cone do suporte (não no funil), sem deixar a pipeta tocar no papel de filtro;
- fechar corretamente o suporte e colocar na centrífuga;
- centrifugar por 3-4 min a 1.000 rpm (a velocidade e o tempo devem ser testados antes, pois normalmente podem ser ajustados ao tipo celular que se quer analisar; para células de baço usamos 5 min a 500 rpm);
- remover do suporte da centrífuga e submergir a lâmina no fixador;
- processar as células através do protocolo desejado (coloração por Giemsa ou outra, imunofluorescência direta ou indireta).

16.3 Preparo e Marcação (Fenotipagem) de Células para Citometria de Fluxo

A análise por citometria de fluxo convencional permite a aquisição e a análise de um mínimo de cinco parâmetros que podem ter grande valor para a pesquisa de aspectos da imunopatogenia da doença de Chagas. Os dois parâmetros morfológicos, o desvio frontal (*forward scatter*, FSC, menos de 2°) e o desvio lateral (*side scatter*, SSC, a 90°) da luz indicam, respectivamente, o tamanho celular, proporcional à área de corte transversal da célula e à “granulosidade” celular, ou melhor, o grau de diferença entre o índice de refração dos grânulos de uma célula em relação ao índice de refração do seu citoplasma. Neutrófilos e eosinófilos se distinguem de linfócitos, mas basófilos não, pois os grânulos têm índice de refração igual ao do citoplasma. Esses parâmetros indicam o percentual relativo dessas populações celulares, bem como os efeitos da ativação em termos de tamanho e granulosidade celular. Além desses parâmetros, a citometria permite facilmente a marcação com indicadores fenotípicos ou funcionais fluorescentes com até três cores (verde, laranja e vermelho). Aparelhos especiais, ou adaptações, podem ainda estender essas análises para até oito cores diferentes.

Entre as aplicações mais frequentes da citometria destacamos: (1) a análise de propriedades citoquímicas de células imunorrespondedoras (granulócitos, monócitos e linfócitos), tais como contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem e caracterização de subpopulações celulares, quimiotaxia, endocitose, degranulação e catabolismo em resposta a estímulos, grau de maturação e ativação de linfócitos B e T; (2) medidas de DNA para estudo de ciclo celular e detecção de morte, necrose e apoptose; (3) diferenciação celular em diferentes sistemas, com medidas de ciclo celular, de traçadores de mRNA, identificação de sítios receptores e perfis de glicosilação, antígenos marcadores e mudanças estruturais.

A análise de amostras em citometria de fluxo segue as seguintes etapas:

- preparação de uma suspensão aquosa de células isoladas do tecido ou cavidade de interesse;
- coloração específica do componente celular que se quer estudar com anticorpos conjugados a fluorocromos;
- medida no citômetro (aquisição de dados);
- análise quantitativa dos dados em computador;
- interpretação dos dados quantitativos em termos de relevância biológica ou médica.

Para a fenotipagem celular, anticorpos monoclonais (mAb) e policlonais desenvolvidos contra diferentes proteínas de membrana possibilitam a identificação de subpopulações celulares. Como cada classe de células expressa, até certo ponto, um repertório particular de moléculas de membrana, o uso de um painel de anticorpos mAb e a análise multiparamétrica por citometria de fluxo pode distinguir cada população. Por exemplo, usando-se mAb anti CD3, CD4 e CD45RA pode-

se definir o percentual relativo de linfócitos T *helper* (positivo para os três marcadores), linfócitos T citotóxicos (positivos para CD3 e CD45RA, negativo para CD4), linfócitos B (negativos para CD3 e CD4 e positivos para CD45RA), e monócitos (negativos para CD3 e positivos para CD4 e CD45RA).

Material

- centrífuga para os tubos ou microplacas
- solução de bloqueio
- anticorpos monoclonais marcados diretamente ou com os respectivos conjugados secundários fluorescentes dirigidos contra os marcadores fenotípicos desejados, como por exemplo: anti CD3-e, anti CD8, anti CD4, anti CD5, anti cadeia m, anti TCR, anti CD16/32 (clone 2.4G2)
- solução de lavagem (BSS-soro fetal bovino 5%)
- fixador: PFA 1%
- solução de passagem: PBS-FACS = PBS + 5% SBF + NaN_3 1 mg/ml (0,1 %).

Observações gerais

- a quantidade de células por amostra deve ser cinquenta a cem vezes maior do que o número de células que se pretende analisar: para 10^4 células analisadas, pode-se prever 10^6 células coradas (por amostra, comumente um estoque de cerca de $5\text{-}20 \times 10^6/\text{ml}$);
- podem ser usados microtubos, tubos de 13x75 mm ou placas de 96 poços fundo V, a depender da centrífuga disponível. As centrifugações em microcentrífuga não devem ultrapassar 1min e em centrífuga de tubos maiores devem ser de 3 a 5 min; para microtubos aspirar o sobrenadante ao invés de verter;
- marcar as células no gelo e no escuro;
- os anticorpos interagem com as células de três modos: ligação específica ao epitopo; ligação a receptores Fc (essa ligação é específica e saturável; imunoglobulinas isoladas se ligam a receptores de alta afinidade e imunoglobulinas agregadas por calor ou sob forma de complexo antígeno-anticorpo se ligam a receptores de baixa afinidade); ligação inespecífica (não saturável); por isso é indispensável a etapa de bloqueio;
- é importante corar células controle com um anticorpo não relacionado, e de mesmo isotipo, para testar a efetividade do bloqueio de receptor Fc;
- em média 1 μg de anticorpo por 10^6 células é suficiente, mas é recomendada uma titulação prévia para se avaliar a concentração ideal, pois pode haver superconjugação, agregação ou degradação. Neste casos o anticorpo tem baixa qualidade e pode gerar dados artefatuais;
- o uso de anticorpos secundários na forma F(ab')_2 elimina a ligação via Fc;
- as amostras devem ser guardadas sempre a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da leitura;
- sempre que possível utilizar controles positivos de marcação.

Cuidados especiais

Usar os anticorpos na diluição apropriada, fazendo uma titulação prévia, antes de usar em qualquer experimento, com o seguinte procedimento:

- incubar células com diluições seriadas do anticorpo;
- obter seus histogramas de fluorescência superpostos com o histograma do tubo controle (isotipo não relacionado, tubo não marcado ou tubo incubado apenas com o conjugado, segundo o protocolo usado);
- ajustar o marcador para o limite de negativos e positivos usando o histograma do tubo controle;
- criar uma região correspondente às células positivas e outra às negativas;
- analisar a média da intensidade de fluorescência em cada região (negativa e positiva) para cada diluição do anticorpo sob teste;
- calcular a razão entre a fluorescência das células positivas e negativas (relação sinal/ruído).

A única concentração de anticorpo que corresponde à diluição apropriada a ser usada é aquela na qual a relação sinal/ruído é máxima. Nessa concentração a ligação inespecífica é mínima e a especificidade de ligação é máxima. Para encontrar essa concentração, o marcador para células positivas deve ser ajustado de modo a que mais de 99% das células coradas com o isotipo controle (o tubo controle em questão) estejam na faixa negativa.

Fenotipagem em uma cor

INDIRETA

Anticorpo primário seguido de um anticorpo secundário conjugado a fluorocromo

- colocar a quantidade adequada de células nos tubos (10^6 células em 50 μ l);
- adicionar 10 μ l da solução de bloqueio por 10 min (ver Material);
- após centrifugação, adicionar a quantidade apropriada do anticorpo primário e incubar por 15 min;
Obs: pode-se usar tempos de incubação maiores mas não é necessário porque o processo de ligação do anticorpo ao epitopo é rápido; para antígenos intracelulares pode ser necessário maior tempo.
- adicionar PBS, centrifugar as células a 400 g, decantar o sobrenadante (retirar o excesso de PBS sobre papel absorvente) e ressuspender as células no volume residual (isso consiste numa lavagem); seguem-se duas a três lavagens, ou pode ser feita uma única vez utilizando-se cinquenta a cem vezes o volume de tampão sobre o volume residual das células;
- se a lise de hemáceas for desejada, substituir o PBS por solução de lise na etapa 4, como a primeira lavagem;
- adicionar a quantidade apropriada do anticorpo secundário fluorescente, incubar 15 min e lavar;
- ressuspender as células em fixador ou se desejar analisar células vivas, no meio desejado;
- adquirir os dados no citômetro.

Anticorpo primário biotinizado seguido de avidina conjugada a fluorocromo

- aliquotar e bloquear (etapas 1 e 2 iguais);
- adicionar a quantidade apropriada de anticorpo primário biotinizado, incubar 15 min e lavar. Se a lise for necessária, substituir o PBS por solução de lise (como descrito no item anterior);
- adicionar a quantidade apropriada da avidina fluorescente, incubar 15 min e lavar;
- fixar e analisar (etapas 7 e 8 iguais).

DIRETA

Anticorpo primário conjugado a fluorocromo

- aliquotar e bloquear;
- adicionar o anticorpo fluorescente por 15 min e lavar e/ou lavar;
- lavar, fixar e analisar (etapas 6, 7 e 8).

Número mínimo de aliquotas para a fenotipagem a uma cor

Tubo	Reagente	Objetivo
1	Sem conjugado fluorescente PBS+bloqueio+lise	FSC/SSC e autofluorescência
2	Conjugado fluorescente do pico negativo	Ligação <i>background</i> para definir a posição
3	Isotipo primário não relacionado + conjugado fluorescente	Ligação específica do isotipo via Fc - controle negativo
4	Isotipo primário específico + conjugado fluorescente	Determinação das células positivas

Regras básicas para conjugação dos três procedimentos

- se usar o Método 1, ele deve ser sempre realizado primeiro;
- o anticorpo secundário deve ser bloqueado por IgG da mesma espécie do primeiro anticorpo, de modo a não se ligar a nenhum dos anticorpos primários subsequentes;
- as etapas de bloqueio e de controle com o isotipo não relacionado são essenciais para garantir a especificidade das ligações;
- se o isotipo controle se ligar a quaisquer das células coradas por uma combinação entre o primeiro e o segundo anticorpos, o bloqueio não foi efetivo e os dados serão artefatuais.

Em caso de utilização de sistema de relação, proceder a controle semelhante ao anterior e também a controle, omitindo-se o anticorpo primário.

Há necessidade de controles positivos de marcação com as células utilizadas no ensaio para calibração da fluorescência no citômetro de fluxo. Estes controles devem sempre ser feitos em paralelo ao ensaio, tomando-se o cuidado de utilizar em tais controles populações celulares que apresentem subpopulação negativa e positiva para os marcadores celulares utilizados (nunca utilizar populações completamente positivas nem populações duplamente positivas em caso de se utilizar dois marcadores simultâneos para controle da fluorescência).

16.4 Ensaios de Ativação Celular e Citotoxicidade *In Vitro*

A morte celular é um processo fisiológico fundamental para vários sistemas biológicos como seleção negativa de linfócitos no timo, controle da resposta imunológica estabelecida, e outros. Vários são os mecanismos indutores de morte celular ou citotoxicidade. Macrófagos induzem morte celular basicamente via liberação de TNF e NO nos sítios inflamatórios, enquanto linfócitos T induzem morte celular via mecanismos mais específicos dependentes de interação receptor/ligante. Células T CD4⁺ induzem morte celular principalmente pela via dependente de Fas/Fas-L, enquanto linfócitos T CD8⁺ usam majoritariamente a via dependente de perforina e granzimas.

O desenvolvimento de procedimentos rápidos e eficientes para quantificar morte celular *in vitro* e estimular células do sistema imune, como células efectoras citolíticas, foi fundamental no estudo das relações intercelulares e atuação de moléculas citolíticas.

16.4.1 Purificação de subpopulações de esplenócitos

16.4.1.1. Separação por microesferas (beads) magnéticas

a) Coleta de baços

- coletar os baços e macerá-los em peneira fina ou em duas lâminas de vidro com superfície áspera;
- colocar o material em placa de Petri estéril e adicionar 5-10 ml de RPMI gelado sem soro;
- homogeneizar cuidadosamente com pipeta Pasteur;
- transferir as células para um tubo de 15 ml e deixar no gelo por 5 min;
- após decantar os fragmentos, coletar o sobrenadante;
- centrifugar a 250 g por 10 min, retirar todo o sobrenadante e agitar o sedimento;
- adicionar 3 ml de RPMI + 3 ml de NH₄Cl a 0,85%;
- centrifugar 1x;
- retirar o sobrenadante e adicionar 3 ml de NH₄Cl (não lisar as hemácias por choque hipotônico);
- centrifugar mais 1x;

- ressuspender as células em meio completo;
- contar as células viáveis em azul de Tripán.

b) Conjugação células/anticorpos – seleção negativa

- separar as células em tubos contendo $1-4 \times 10^7$ células em 3 ml de meio completo;
- usar todos os anticorpos na concentração final de 10 µg/ml - na ausência de azida;
- adicionar às células os anticorpos relativos às populações a depletar (1 ml volume final);
- homogeneizar e incubar por 30 min a 4°C.

Anticorpos usados para isolamento das células

Células T CD4 ⁺	Células T CD8 ⁺	Células B
α-CD8	α-CD4	α-CD8
α-CD45R	α-CD45R	α-CD4
α-MAC-1	α-MAC-1	α-MAC-1
α-la	α-la	-

c) Preparação das microesferas magnéticas

Obs: a preparação das esferas varia de acordo com o fabricante; portanto deve-se consultar o seu manual específico

- tomar o volume recomendado pelo fabricante de acordo com o número de células;
- adicionar 40 ml de solução de Hanks sem soro às microesferas para lavá-las;
- agitar bem e colocar no campo magnético;
- esperar as microesferas aderirem à parede do tubo e desprezar o meio;
- repetir o processo de lavagem mais duas vezes;
- ressuspender as microesferas em 3 ml de RPMI.

d) Purificação

- lavar 1x as células que foram incubadas com os anticorpos na geladeira;
- ressuspender em 3 ml de meio completo;
- juntar as células e as microesferas magnéticas - volume final de 6 ml contendo 5% de SFB;
- agitar o material e incubar por 30 min a temperatura ambiente; agitar 2x;
- colocar a mistura no separador magnético;
- aguardar até o líquido ficar translúcido;
- coletar o máximo de meio e colocar em tubos no gelo;
- adicionar mais 6 ml de meio e repetir o processo de purificação três vezes ao todo;
- centrifugar o material coletado e contar.

16.4.1.2. Separação em coluna de lã de náilon

a) Preparação da lã

- mergulhar a lã num becker de 1 litro, contendo salina, por 2 h a 37°C;
- lavar a lã 3x em água bidestilada a temperatura ambiente;
- deixar a lã por 5 dias em água destilada a 37°C, mudando a água todos os dias;
- deixá-la secar por 2-3 dias a 37°C;
- separar alíquotas de 0,7 g de lã e desfiá-la muito bem até começar a aderir nos dedos;
- colocar a lã em seringas vazias de 12 ml, preenchendo a seringa até pelo menos a metade;
- vedar e ensacar as colunas e autoclavá-las normalmente.

b) Preparação da coluna

- colocar a coluna na posição vertical com a saída do líquido bloqueada;
- adicionar 20 ml de RPMI sem soro e apertar as laterais da lâ com pipeta Pasteur até molhá-la totalmente;
- desbloquear a saída de líquido e desprezar;
- repetir a adição de meio e desprezar;
- bloquear a saída de líquido;
- adicionar 20 ml de RPMI + 5% de SFB;
- drenar o excesso de meio e deixar a coluna a 37°C por 1 h antes de adicionar as células.

c) Adição de células

- aplicar na coluna um volume total de 2 ml de RPM + 5% de SFB contendo $1-3 \times 10^8$ células;
- embalar a coluna e deixá-la por 1 hora a 37°C.

d) Eluição das células não aderentes (população enriquecida em células T)

- lavar a coluna muito lentamente com meio aquecido contendo soro fetal bovino;
- coletar os primeiros 25 ml e centrifugar a 250xg por 10 min;
- contar as células viáveis por exclusão em azul de Tripán.

e) Eluição das células aderentes (população enriquecida em células B)

- depois de coletar as células não aderentes (item d), comprimir a lâ e coletar o meio restante;
- adicionar mais meio com soro e comprimi-la de novo;
- repetir o processo até que sejam coletados 25 ml;
- centrifugar o material a 250xg por 10 min e contar as células viáveis em azul de Tripán.

16.4.2 Ativação de linfócitos *in vitro*

Freqüentemente, utilizam-se três tipos de estímulos para ativação *in vitro*: lectinas (Con A ou PHA, 5 µg/ml), LPS (5 µg/ml), ou anticorpos monoclonais como por exemplo anti CD3 que são cultivados por tempos variados de 3 a 72 h. Ao longo desse período várias análises podem ser feitas: a medida de proliferação celular, as modificações morfológicas de tamanho e granulosidade, ou a expressão de antígenos característicos do processo de ativação.

16.4.2.1 Ativação por Con-A

- coletar as células de baço como descrito anteriormente;
- ajustar a concentração de células para $5-10 \times 10^7$ células por ml de meio completo;
- adicionar 4 µg de Con-A por ml de meio;
- se a ativação for executada em placa de 96 poços, utilizar 2×10^5 células/poço;
- agitar bem e incubar a 37°C por 12 h;
- coletar as células agitando suavemente com pipeta Pasteur - elas devem estar grumadas;
- centrifugar a 250xg por 10 min;
- contar as células viáveis em azul de Tripán.

16.4.2.2 Ativação por anti CD3

a) Imobilização de anti CD3

- colocar por poço (placa de 24 poços) uma concentração final de 5 µg de anti CD3 em um volume de 300 µl de meio, ou suspensão a 25% de sobrenadante do hibridoma 145-2C11;
- manter a 37°C por 4 h;
- lavar os pocinhos, muito cuidadosamente, 3x com RPMI sem soro e aquecido;
- colocar por último RPMI com soro.

b) Aplicação das células

- coletar as células de baço como descrito anteriormente;
- passar em coluna de lã de náilon ou em microesferas magnéticas, como descrito anteriormente;
- plaquear 3x10⁶ células por pocinho até completar pelo menos 1 ml final;
- incubar a 37°C por 12 h.

16.4.2.3 Células apresentadoras de Ag - doença de Chagas

Estimulação primária *in vivo*

- infectar camundongos singênicos C57BL/6 com *T. cruzi*

Estimulação secundária *in vitro*

Coleta de macrófagos

- sacrificar camundongos C57BL/6 normais;
- expor o peritônio e injetar 5 ml de RPMI gelado sem soro;
- agitar a cavidade abdominal do camundongo;
- coletar o meio e manter as seringas no gelo;
- avaliar a presença de bactérias no material ao microscópio;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspender o material em RPMI gelado contendo 5-10% de SFB e 1% de *L*-glutamina;
- contar a viabilidade em azul de Tripán.

a) Cultura e infecção de macrófagos

- plaquear 2-5x10⁶ macrófagos por garrafa de 25 cm²;
- deixá-los aderir por 1 h a 37°C;
- infectar a cultura com a mesma cepa de parasita que os camundongos foram infectados na proporção de dez parasitas por célula;
- incubar a cultura por 12 h a 37°C;
- lavar as garrafas pelo menos 5x com RPMI aquecido e sem soro, agitando suavemente a cultura;
- incubar as células por 24 h a 37°C em RPMI + 5-10% de SFB e 1% de *L*-glutamina;
- lavar as garrafas 2x em RPMI aquecido e sem soro;
- irradiar a cultura com 15.000 rad.

b) Co-cultura de macrófagos infectados *in vitro* com linfócitos de camundongos infectados *in vivo* (apresentação de antígeno)

- pelo menos dois meses após a infecção, sacrificar os camundongos infectados com *T. cruzi* e coletar os baços;
- adicionar 3-5x10⁷ esplenócitos por garrafa de macrófagos infectados irradiados;
- manter a co-cultura por cinco dias a 37°C.

c) Separação parcial de debris e células mortas

- coletar as células homogeneizando gentilmente com pipeta Pasteur;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspender o sedimento em 5 ml de RPMI sem soro;
- colocar 5 ml de SFB concentrado no fundo do tubo usando pipeta Pasteur; perceber a formação da segunda fase;
- centrifugar a 250xg por 10 min;
- coletar o sedimento (as células mortas e restos celulares ficarão na interface).

16.5.3 Ativação de linfócitos *in vivo*

16.5.3.1 Reação enxerto x hospedeiro

a) Camundongos

- camundongos C3H/He (H-2^k) de 3-4 semanas de idade como doadores de timócitos
- camundongos C57BL/6 (H-2^b) de 7-8 meses de idade como animais recipientes

b) Coleta de timos

- retirar os timos dos animais C3H/He e colocá-los em RPMI + 10 mM de HEPES gelado sem SFB;
- macerá-los usando duas lâminas de microscópio com superfície áspera;
- coletar as células em placa de Petri;
- homogeneizar cuidadosamente o material com pipeta Pasteur e transferir para tubos de 15ml;
- deixar os fragmentos de tecido decantarem por 5 min no gelo;
- coletar o sobrenadante;
- centrifugar a 250xg por 10 min;
- contar as células viáveis em azul de Tripan;
- ajustar a concentração para 1×10^9 células viáveis/ml.

c) Obtenção de linfócitos alogênicos ativados

- injetar 100 μ l de timócitos (1×10^8) por via intravenosa em camundongos C57BL/6 irradiados (800 rad);
- sacrificar os animais recipientes cinco dias após a injeção (acompanhar a mortalidade dos camundongos nesse período) e usar como células efectoras contra alvos de C57BL/6;
- coletar os esplenócitos como descrito anteriormente;
- os baços devem estar bem pequenos com pontos de proliferação celular.

16.5.3.2 Reação hospedeiro x enxerto

Sensibilização primária *in vivo*

a) Injeção de células alogênicas

- tomar uma cultura de EL-4 (C57BL/6 – H-2^b) com pelo menos 95% de viabilidade;
- lavar as células 3x em RPMI sem soro;
- incubar a cultura por 4 h a 37°C em RPMI sem soro, trocando 2x o meio, para reduzir a quantidade de proteínas do soro;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspender em PBS + 0,02% de EDTA;
- contar as células viáveis em azul de Tripan;
- ajustar a concentração para 1×10^8 células/ml;
- injetar 100 μ l de células por via intraperitoneal em camundongos Balb/C (H-2^d).

Sensibilização secundária *in vitro*

b) Obtenção de linfócitos sensibilizados

- coletar o baço dos animais 10-20 dias após sensibilização primária *in vivo* (ver 16.4.1.1a);
- ajustar a concentração para $2,5 \times 10^6$ células por ml de meio completo;
- aplicar 2 ml de células por pocinho de placa de 24 poços;
- deixar as células na geladeira por no máximo 1 h.

c) Irradiação de células sensibilizadoras

- tomar uma cultura de células EL-4 com pelo menos 95% de viabilidade;
- lavar 3x a cultura em PBS + 0,02% de EDTA;
- contar as células viáveis em azul de Tripán;
- ajustar a concentração para 3×10^7 células/ml;
- irradiar a cultura com 5.000 rad;
- adicionar 100 μ l de células EL-4 à metade dos pocinhos contendo linfócitos (item a) – células efectoras e células efectoras controle;
- manter a co-cultura a 37°C por 4-5 dias; verificar a viabilidade diariamente.

16.5.4 Marcação de células alvo com ^{51}Cr

Método

- tomar uma cultura de células-alvo com pelo menos 95% de viabilidade;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspendê-las em 5 ml de RPMI + 5 % de SFB;
- contar as células viáveis em azul de Tripán;
- ajustar a concentração para 1×10^6 células/ml de meio de marcação;
- incubar as por 1h a 37°C;
- lavar 2x em RPMI + 5% de SFB;
- incubar por 30 min a 37°C;
- lavar 2x em RPMI + 5% de SFB;
- tomar uma alíquota de 1×10^4 células para leitura em contador gama - a contagem deve ser de pelo menos 10.000 cpm;
- ajustar o número de células-alvo para mais ou menos este nível de contagem.

16.5.5 LDCC (*Lectin Dependent Cell Cytotoxicity*)

Método

- plaquear as células-alvo marcadas em placa de 96 poços com fundo em U ou V;
 - adicionar as células efectoras nas proporções desejadas em triplicata;
- Obs: as células-alvo e efectoras não precisam ser singênicas
- adicionar Con-A na concentração final de 5 μ g/poço;
 - o volume final por poço deve ser de 200 μ l;
 - agitar gentilmente com micropipeta;
 - incubar a placa por 15 min à temperatura ambiente;
 - centrifugar a 130 x por 5 min;
 - incubar a placa do ensaio de citotoxicidade por 5 h a 37°C;
 - centrifugar a placa a 250xg por 10 min;
 - coletar 100 μ l de cada poço;
 - fazer a leitura em contador gama.

Cálculo de citotoxicidade específica

$$\text{porcentagem de liberação específica} = \frac{\text{lib. experimental} - \text{lib. espontânea}}{\text{lib. máx. (100\%)} - \text{lib. espontânea}}$$

Referências Bibliográficas

- GOODING, L. R. & EDWARDS, C. B. H-2 antigen requirements in the *in vitro* induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 124:1258-1262, 1980.
- GOODING, L. R. Specificities of killing by cytotoxic lymphocytes generated *in vivo* and *in vitro* to syngeneic SV40 transformed cells. *Journal of Immunology*, 118:920-927, 1977.
- JULIUS, M. H.; SIMPSON, E. & HERZENBERG, L. A. A rapid method for isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 3:645-649, 1973.
- LECLARE, J. C.; PLATER, C. & FRIDMAN, W. H. role of the Fc receptors (FcR) of thymus-derived lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 8:543-554, 1977.
- PINCUS, J. H.; LINCOLN, P. & REISFELD, R. A. Separation of murine lymphoid cells using nylon wool columns. *Transplantation*, 18:544-549, 1974.
- STEWART, C. C. & STEWART, S. J. The use of directly and indirectly labeled monoclonal antibodies in flow cytometry. In: *Methods in Molecular Biology*, vol 45: Monoclonal antibody protocols, ch. 15. 1996. Totowa, NJ: W.C. Davis Humana Press Inc.

Anexo 16.1

Preparo de soluções especiais e tampões

PBS (Phosphate-buffered saline)	m M
NaCl	150
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	10
KH ₂ PO ₄	1
KCl	2
Ajustar para pH 7,4	

Solução de Alsever	m M
Glicose	115
NaCl	72
Citrato de sódio	30

BSS (Balanced Salt Solution)¹			
Componente	Concentração final	Solução A (10x) para 1.000 ml	Solução B (10x) para 1.000 ml
Glicose	5,5 mM	10,0 g	
NaCl	140 mM		80,0 g
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,6 g	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,5 mM	5,37 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 mM		1,86 g
KCl	5 mM		4,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,9 mM		2,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 mM		2,0 g
Vermelho de fenol	0,001%	0,1 g	

¹ Mishell & Duton (1967), *Journal of Experimental Medicine* 126: 423

- preparar separadamente as soluções estoques A e B (10 X concentradas), misturá-las 1:1 e diluí-las 5-10x, para ter BSS 2x ou 1x;
- filtrar através de membrana de 0,22 µm e estocar a temperatura ambiente ou a 2-6°C
- testar a esterilidade incubando por sete dias a 37°C. O pH da solução BSS 1x deve estar em torno de 7,2-7,4.

Meio de cultivo de linfócito	
Meio RPMI	± 85 ml
Tampão HEPES	10 mM
2-mercaptoetanol	5x10 ⁻⁵ M
Piruvato de sódio	1%
Amino ácidos não essenciais	1%
L-glutamina	1%
Soro fetal bovino	10%
Penicilina/estreptomicina	1%

Solução para Citometria de Fluxo¹	
Lavagens e diluições	PBS s/cálcio s/magnésio, c/ 0,1% azida sódica pH 7,2-7,4
Fixadora	paraformaldeído ou formaldeído ultrapuro ² 1 a 2%
Bloqueio	BSA 1% soro normal da espécie do Ac secundário (5 a 10%) fração IgG (melhor) desse soro (2 mg/ml)

¹ osmolaridade ajustada ao animal

² não usar formaldeído impuro ou glutaraldeído, pois aumentam a autofluorescência

Solução de lise de hemáceas	
Cloreto de amônio	1,652 g
Bicarbonato de potássio	0,2 g
EDTA	0,0074g
Completar para 200 ml com H ₂ O destilada	

- preparar no dia de uso para evitar que o CO₂ dissolvido na água combine para formar o carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃), que não lisa as hemáceas;
- pré-pesar os reagentes e estocá-los em pacotes para dissolver quando preciso.