

Artigo/Article

## Otimização da técnica de citometria de fluxo para análise do fator tissular em monócitos de sangue periférico

### *Flow cytometric assay optimization for peripheral blood monocyte tissue factor analysis*

Lauro M. Vieira<sup>1</sup>  
Luci M. Sant'Ana Dusse<sup>2</sup>  
Olindo A. Martins Filho<sup>3</sup>  
Maria G. Carvalho<sup>2</sup>

A citometria de fluxo permite a análise individual de células quando há expressão de moléculas de membrana, produtos citoplasmáticos e nucleares. Quando se utiliza a marcação prévia das células com anticorpos monoclonais é possível estudar constituintes de membrana característicos de uma determinada linhagem celular. Assim, esta metodologia tem sido largamente utilizada, principalmente na área de onco-hematologia e dos transplantes de medula óssea. A possibilidade de se utilizarem dois ou mais anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos diferentes permite o estudo em uma determinada população celular de substâncias pró-coagulantes produzidas por células envolvidas nos mecanismos da hemostasia, abrindo-se a possibilidade de aplicação desta metodologia em áreas de estudo da fisiopatologia relacionada aos estados de hipercoagulabilidade. Os monócitos estão altamente envolvidos nos processos fisiopatológicos envolvendo a formação de trombo e placas ateromatosas, e o Fator Tissular (FT) consiste no principal ativador fisiológico do sistema de coagulação sanguínea. Monócitos estimulados ou não por lipopolissacárides de *Escherichia coli* expressam FT em condições fisiológicas normais. Neste trabalho buscou-se otimizar as condições de determinação da expressão de FT em monócitos por citometria de fluxo, a partir de metodologia já descrita, em duas populações de indivíduos saudáveis, com faixas etárias diferentes, no sentido de se estabelecerem os níveis de expressão de FT. Para a análise dos resultados foram utilizadas duas metodologias que definem o percentual de células expressando FT. Dos resultados obtidos, pode-se concluir que não há diferença significativa na expressão de FT de monócitos em função da idade e que os dois métodos de análise utilizados não diferem entre si. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(3):141-147.

**Palavras-chave:** Fator tissular; monócitos; citometria de fluxo; coagulação.

<sup>1</sup>Mestre - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

<sup>2</sup>Doutora - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

<sup>3</sup>Doutor - Laboratório de Doença de Chagas - Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz, Belo Horizonte-MG.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.  
Laboratório de Doença de Chagas - Centro de Pesquisas René Rachou - Fiocruz.

**Correspondência para:** Lauro Mello Vieira  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG  
Av. Olegário Maciel 2360  
30180-112 - Belo Horizonte-MG  
Fone: (31) 3339-7647 - Fax: (31) 3339-7644 - E-mail: lauro@farmacia.ufmg.br

## Introdução

O fator tissular (FT) é considerado o principal ativador fisiológico do sistema da coagulação sangüínea, agindo através da ativação do fator VII. O complexo bimolecular FT/VIIa, por proteólise limitada, ativa os fatores X e IX da coagulação a fatores Xa e IXa, iniciando o processo que culmina com a formação da fibrina.<sup>1</sup> Vários trabalhos têm demonstrado o aumento da concentração plasmática de FT livre em situações clínicas decorrentes de estados de hipercoagulabilidade.<sup>2,3</sup>

Monócitos de sangue periférico são células com alta capacidade de migração para o espaço extravascular. Além de serem capazes de carrear moléculas de LDL parcialmente oxidadas em seu citoplasma, estas células apresentam como glicoproteína de transmembrana, quantidades detectáveis de FT. Isto faz com que os monócitos estejam altamente comprometidos nos fenômenos que envolvem a formação de placas ateroscleróticas e trombos intravasculares nas situações clínicas que culminam com trombose arterial ou tromboses venosas.<sup>4,5</sup>

Uma expressão aumentada de FT *in vivo* é a principal causa de risco em doenças trombóticas, como a formação de trombos após ruptura de placa aterosclerótica, levando a infarto do miocárdio e coagulação intravascular associada com câncer e choque séptico.<sup>6</sup>

A citometria de fluxo permite a análise individual de um número significativo de células, e em um tempo relativamente curto.<sup>7</sup> A marcação prévia de células com anticorpos monoclonais fluorescentes permite a análise de um tipo celular com uma determinada característica física e/ou química mesmo em amostras heterogêneas de células. Isto tem possibilitado o emprego desta metodologia em várias áreas da hematologia, notadamente na onco-hematologia, na caracterização de marcadores relacionados a processos leucêmicos, em condições de diagnóstico, prognóstico e monitoração terapêutica, nos transplantes de medula óssea, principalmente na avaliação do conteúdo de células tronco e outras áreas.

Estudos na área de investigação de condições de hipercoagulabilidade podem se valer desta metodologia no sentido de estabelecer níveis de substâncias com caráter pró-coagulante ou anti-coagulante envolvidos na fisiopatologia dos processos trombóticos.

Neste trabalho, buscou-se otimizar uma técnica para a determinação da expressão de FT em monócitos, a partir de amostras de sangue total, estimuladas ou não com endotoxina de *Escherichia coli* (LPS), em indivíduos sadios, em duas faixas etárias diferentes, no sentido de se estabelecerem os níveis basais e após estimulação nestas duas populações.

Desta maneira, conhecendo-se os aspectos fisiológicos deste marcador pode-se vislumbrar a perspectiva de se definir, em pacientes com maior expressão de FT em monócitos, prognóstico sobre o risco potencial trombótico.

A análise da expressão de FT em monócitos foi realizada comparando-se dois métodos de quantificação: a porcentagem de células monocíticas positivas para FT, analisadas por histograma, e a porcentagem de células positivas, analisadas por estatística de quadrante.

## Casuística e métodos

A população utilizada no presente trabalho foi constituída de quarenta indivíduos voluntários, divididos em duas faixas etárias (de 20 a 39 e de 40 a 67 anos de idade), que não apresentavam fatores de risco para trombose como: hipertensão, diabetes, tabagismo ou obesidade e não faziam uso de qualquer tipo de medicamento, notadamente ácido acetilsalicílico (AAS), antiagregantes plaquetários, anticoagulantes, contraceptivos orais, hormônios, anti-hipertensivos e diuréticos. Estes indivíduos não apresentavam história prévia nem evidência de trombose de membros inferiores, avaliada pelo duplex scan.

Este trabalho mereceu parecer favorável da Comissão de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. As amostras foram coletadas após os indivíduos serem esclarecidos dos objetivos do presente trabalho e assinarem o termo de consentimento pós-informado.

## Amostra

De cada paciente foi colhida uma amostra de 5 ml de sangue venoso utilizando-se tubos e agulhas do sistema Vacutainer (Becton-Dickinson-Mountain View, CA,USA), contendo citrato de sódio como anticoagulante. As amostras foram processadas até um tempo máximo de uma hora após a coleta.

## Reagentes

Solução salina tamponada pH 7,2 (PBS): Dissolver 2,65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,36 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 8,18 g de NaCl em 1.000 ml de água destilada.

Solução de lise: Solução de Brand Facs Lysing Solution (Becton-Dickinson-Mountain View, CA-USA) diluída a 1/10, com água destilada, antes do uso.

Solução estabilizadora: Paraformaldeído a 10 g/l em cacodilato de sódio a 10,2 g/l e NaCl a 6,63 g/l. O pH da solução foi acertado para 7,2.

Anticorpo monoclonal murino anti-CD14 (marcador de monócito) humano marcado com ficoeritrina: Anti-CD14<sup>PE</sup> humano, mouse (Leu-M3) (Becton-Dickinson-Mountain View, CA, USA).

Anticorpo monoclonal murino antifator tissular humano marcado com isotiocianato de fluoresceína: Mab against human tissue factor FITC conjugated (American Diagnostica Inc., Greenwich, CT, USA).

IgG1 de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína: IgG1 mouse FITC conjugated (Becton-Dickinson-Mountain View, CA, USA).

Lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS): Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

## Métodos

### 1. Determinação da expressão de FT em monócitos de sangue periférico

Utilizando-se a citometria de fluxo, foi determinada a expressão de FT em monócitos a partir de amostras de sangue periférico, através da marcação simultânea destas células com dois anticorpos monoclonais: um anticorpo anti-CD14 humano marcado com ficoeritrina (PE) e outro antifator tissular humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

A otimização da metodologia para a determinação da expressão de FT foi baseada na técnica descrita por Amirkhosravi,<sup>8</sup> com modificações. As principais modificações consistiram na mudança no tempo de incubação da amostra com LPS a 37°C, que foi de quatro horas, no volume de anti-CD14<sup>PE</sup> adicionado (4 µl/0,1 ml de amostra), na solução de lise (Brand Facs Lysing Solution) e na solução estabilizadora (paraformaldeído/cacodilato).

Foram feitas cinco preparações para cada indivíduo:

T1 – Tubo controle para a expressão de FT basal: a uma amostra de 0,1 ml de sangue total, em citrato de sódio, foram adicionados 10 µl de IgG1 de camundongo marcado com fluoresceína (IgG1<sup>FITC</sup> mouse) e 4 µl de anticorpo anti-CD14 humano marcado com ficoeritrina (anti-CD14<sup>PE</sup>).

T2 – Tubo para a determinação de FT basal: a uma amostra de 0,1 ml de sangue total, em citrato de sódio, foram adicionados 10 µl de anticorpo antifator tissular humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (anti-FT<sup>FITC</sup>) e 4 µl de anti-CD14<sup>PE</sup>.

T3 – Tubo controle para a determinação da expressão de FT após incubação: uma amostra de 1,0 ml do sangue total, em citrato de sódio, foi incubada a 37°C por quatro horas. Após este tempo, foram adicionados a uma alíquota de 0,1 ml, 10 µl de IgG1<sup>FITC</sup> e 4 µl de anti-CD14<sup>PE</sup>.

T4 – Tubo para determinação da expressão de FT após incubação: uma amostra de 1,0 ml do sangue total, em citrato de sódio, foi incubada a 37°C por quatro horas. Após este tempo foram adicionados a uma alíquota de 0,1 ml da amostra, 10 µl de anti-FT<sup>FITC</sup> e 4 µl de anti-CD14<sup>PE</sup>.

T5 – Tubo para a determinação da expressão de FT após incubação com LPS: a uma amostra de 1,0 ml do sangue total, em citrato de sódio, foi adicionado LPS numa concentração final de 10 µg/ml. A mistura foi incubada a 37°C por quatro horas. Após este tempo foram adicionados a 0,1 ml da amostra, 10 µl de anti-FT<sup>FITC</sup> e 4 µl de anti-CD14<sup>PE</sup>.

Os tubos preparados imediatamente (T1 e T2) e as misturas preparadas após incubação de quatro horas a 37°C (tubos T3, T4 e T5) foram incubados a 4°C por trinta minutos, ao abrigo da luz. Após este tempo foram adicionados a cada tubo 2,0 ml de solução de lise, sob agitação, por 15 segundos. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por dez minutos. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 1.200 G por sete minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado por três vezes com solução de PBS. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspensão com 0,4 ml de solução estabilizadora e a amostra foi mantida a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento de ser lida.

### 2. Leitura e análise da expressão de FT em monócitos de sangue periférico

A determinação da expressão de FT em monócitos de sangue periférico foi feita em citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson- Mountain

View, CA, USA), utilizando-se o "software" Cell Quest versão 3.3 (Becton-Dickinson-Mountain View, CA, USA) para aquisição e análise. O sistema foi calibrado para a avaliação de 3 mil células em cada determinação. A população de monócitos foi identificada pela fluorescência emitida pela ficoeritrina em 488 nm e o FT, expresso em monócitos, pela fluorescência emitida pelo isotiocianato de fluoresceína em 525 nm. O tubo controle para a expressão de FT basal (T1) foi utilizado para se determinar a posição do marcador (M1), excluindo-se um percentual em torno de 98% de células apresentando fluorescência inespecífica (IgG1 FITC).

A análise da expressão de FT em monócitos foi feita através de dois parâmetros: a determinação da porcentagem de células monocíticas expressando FT, através da análise do histograma e a determinação da porcentagem através da estatística de quadrante.

### 3. Parâmetros para definição da expressão de FT

Quatro parâmetros foram determinados através das análises dos percentuais de fluorescência pelo histograma e pela estatística de quadrante, para cada indivíduo: a expressão de FT basal, a expressão de FT induzida pela incubação a 37°C, a expressão de FT estimulada por LPS e a determinação do FT total.

A determinação de FT basal foi obtida pela diferença das leituras dos tubos T2 e T1. A determinação da expressão de FT induzida pela incubação a 37°C foi obtida pela diferença entre os tubos T4 e T3. A expressão de FT induzida por LPS foi obtida através da diferença entre os valores obtidos para os tubos T5 e T4 e a expressão do FT total pela diferença entre as leituras dos tubos T5 e T3.

### 4. Análise estatística

Foi utilizado o teste de *t* (Student), após normalização dos dados (transformação logarítmica), para análise de significância entre os dois grupos de indivíduos de diferentes faixas etárias, em um nível de significância de 0,05. Utilizou-se o software Excel 2000 (Microsoft Corporation – USA).

## Resultados

### 1. Otimização da metodologia para a determinação do FT em monócitos

A incubação de amostras de sangue com LPS,

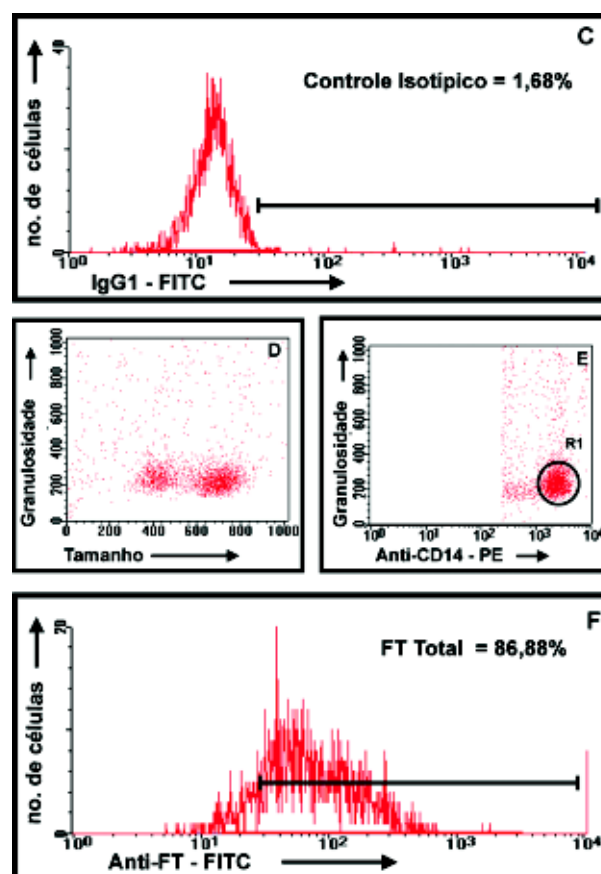


Fig. 1 – Análise por histograma da preparação controle isotípico para IgG1<sup>FITC</sup> de camundongo (T1) e FT total (T5), de um dos indivíduos analisados

em tempos variados, demonstrou que, em um tempo de incubação de quatro horas, ocorre expressão máxima de FT induzido por esta endotoxina. A incubação da amostra (0,1 ml de amostra de sangue total), com volumes variados de anti-CD14<sup>PE</sup> demonstrou que 4 µl deste reagente são suficientes para fornecer uma marcação adequada de monócitos. A solução de lise utilizada promoveu uma lise completa dos eritrócitos e, após lavagem das células e estabilização, forneceu um padrão de leitura com um nível reduzido de contaminação. A solução de paraformaldeído/cacodilato se mostrou adequada à estabilização do material, possibilitando uma leitura estável por um período de até 72 horas, após o término da preparação.

Na figura 1 é mostrado o resultado da análise pelo histograma para a preparação relativa ao tubo T1, de uma amostra de um dos indivíduos analisados (gráficos A, B e C).

O gráfico A é relativo à distribuição das células segundo os parâmetros granulosidade e o ta-

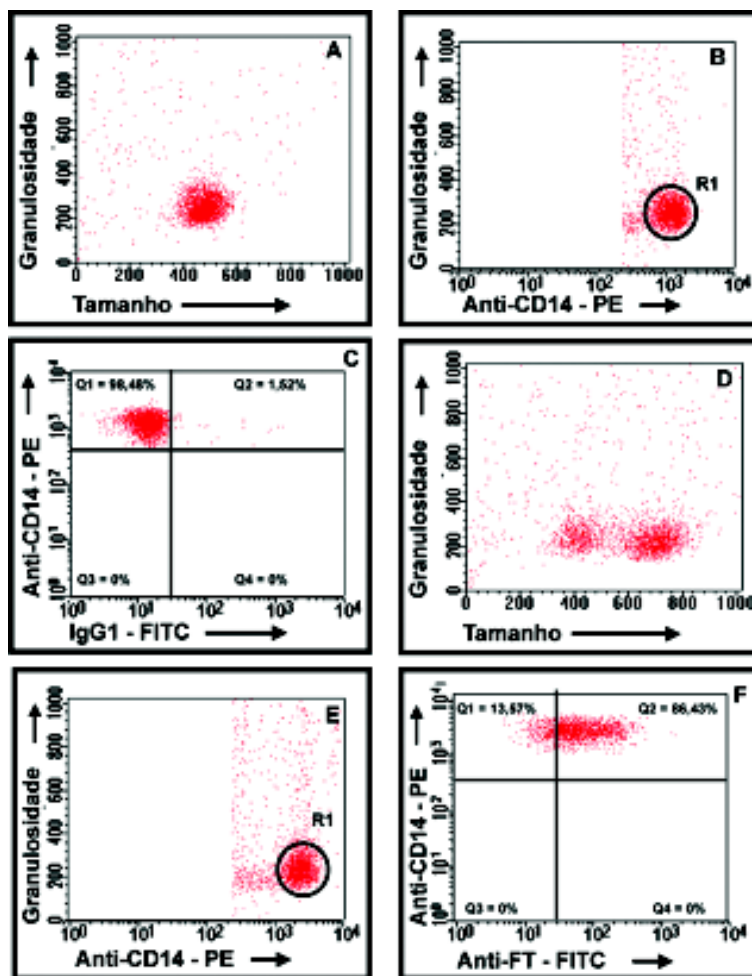


Fig. 2 - Análise por Estatística de Quadrante da preparação controle isotípico para IgG1<sup>FITC</sup> de camundongo (T1) e FT total (T5), do mesmo indivíduo analisado na figura anterior.

manho das células, em escala arbitrária de 0 a 1.000. As células com padrão correspondente a monócitos constituem-se em uma amostra bastante homogênea.

No gráfico B é mostrada a distribuição das células segundo os parâmetros granulocidade e marcação por anticorpo anti-CD14<sup>PE</sup>, distribuída em escala logarítmica arbitrária de 10<sup>0</sup> a 10<sup>4</sup>. A região R1 (gate) é utilizada para delimitar a população de monócitos a serem analisados pelo histograma. A distribuição das células delimitadas pelo "gate" é mostrada no histograma do gráfico C. O marcador é posicionado no sentido de se eliminar grande parte das células que apresentam marcação de baixa intensidade e inespecífica, para fluoresceína (98,32% das células). Com isto, 1,68% das células são consideradas positivas para marcação com IgG1<sup>FITC</sup> de camundongo (controle isotípico).

A análise da preparação relativa ao tubo T5 para o mesmo indivíduo é mostrada nos gráficos de D a F. No gráfico D, as células estão distribuídas segundo os parâmetros de granulocidade e tamanho. Observa-se que, após quatro horas de incubação a 37°C e estimulação com LPS, a população de células, anteriormente homogênea, se torna heterogênea, pelo aumento de tamanho de parte das células. No gráfico E, a população de monócitos é delimitada pelo "gate" (R1), para análise pelo histograma (gráfico F). A análise do histograma mostra um aumento do percentual de células marcadas com anticorpo anti-FT<sup>FITC</sup> ao longo do eixo, na escala de 10<sup>0</sup> a 10<sup>4</sup>. Com o marcador definido no gráfico C, a porcentagem de monócitos expressando FT é agora de 86,88%.

Na figura 2 observa-se o resultado da análise por estatística de quadrante. No gráfico C as células estão distribuídas segundo os parâmetros anti-CD14<sup>PE</sup> e IgG1<sup>FITC</sup>. Nestas condições, quatro quadrantes são definidos através das barras horizontal e vertical. A barra vertical define um percentual de 1,52% de células (Q2), que são consideradas positivas para fluorescência devido ao isotiocianato de fluoresceína. No quadrante Q1, 98,48% das células apresentam fluorescência inespecífica pela adsorção de IgG1<sup>FITC</sup> (controle isotípico). No gráfico F, com o marcador (barra vertical) na mesma posição definida no gráfico C, observa-se um aumento do percentual de monócitos expressando FT (Q2= 86,43%), enquanto 13,57% das células apresentam fluorescência considerada inespecífica (Q1).

## 2. Determinação da expressão de FT basal

Os resultados das determinações da expressão de FT basal nas duas populações de faixas etárias diferentes mostrou que os níveis de FT basal são reduzidos. Comparando-se os dois métodos de análise pode-se observar que a análise pela estatística de quadrante forneceu os valores mais baixos e o menor desvio padrão em torno da média (Tabela 1). A análise de significância mostrou que não existe diferença significativa entre as duas popula-

**Tabela 1**  
Médias e desvios padrão das determinações em porcentagem de monócitos positivos para FT obtidas pelo histograma e pela estatística de quadrante nas duas populações de indivíduos saudáveis, de diferentes faixas etárias. O número de indivíduos de cada grupo é indicado na tabela (n)

Parâmetros	Histograma		Estatística de quadrante	
Faixa etária	29,9 ± 6,3 anos	48,8 ± 6,5 anos	29,9 ± 6,3 anos	48,8 ± 6,5 anos
FT basal	2,1 ± 2,2%	2,1 ± 2,7%	1,2 ± 1,0%	1,4 ± 1,2%
FT 370C	2,3 ± 2,5%	2,8 ± 3,8%	1,9 ± 1,7%	3,3 ± 4,3%
FT c/ LPS	25,1 ± 20,4%	26,2 ± 24,9%	20,6 ± 17,3%	25,0 ± 24,0%
FT total	27,4 ± 21,0%	29,1 ± 24,5%	22,5 ± 18,1%	27,6 ± 23,5%
n	21	19	21	19

**Tabela 2**  
Análise de significância entre as duas populações de indivíduos analisados pelo histograma e pela estatística de quadrante, através do test de t (Student), em um nível de significância de 0,05. Os resultados são expressos em logaritmo

Parâmetros	Histograma	Estatística de quadrante
FT basal	0,5047	0,0568
FT 370C	0,8212	-0,5865
FT c/ LPS	-0,1465	-0,6423
FT total	-0,2027	-0,67357
t crítico bi	2,0244	
gl	39	

ções e que o método de estatística de quadrante forneceu resultados mais homogêneos com um valor de *t* de 0,0568 para um valor de *t* crítico bimodal de 2,0244 (Tabela 2).

### 3. Determinação da expressão de FT após incubação a 37°C

A determinação da expressão de FT após incubação a 37°C forneceu os resultados médios apresentados na tabela 1. A análise por estatística de quadrante forneceu resultados em porcentagem média, inferiores na população de menor faixa etária e mais altos na população de maior faixa etária, quando comparado com os resultados obtidos pelo histograma. Entretanto, não há diferença significativa entre as duas populações (Tabela 2).

### 4. Determinação da expressão de FT após estimulação com LPS

Após incubação a 37°C, com LPS numa concentração final de 10 mg/mL, observa-se um aumento significativo da expressão de FT em monócitos, nas duas populações de indivíduos saudáveis. Quando se corrige a influência da temperatura, diminuindo-se o valor obtido pela indução pelo LPS por aquele obtido quando se submete uma amostra a 37°C, sem entretanto, adicionar-se LPS, os resultados demonstram que a análise da

porcentagem de células positivas foi menor quando avaliada por estatística de quadrante do que quando avaliada por histograma, na população de faixa etária menor (Tabela 1); entretanto, qualquer que seja o método utilizado, não há diferença significativa entre as duas populações (Tabela 2).

### 5. Determinação da expressão de FT total

Os resultados obtidos de expressão máxima de FT, pelo efeito da temperatura de 37°C e pela indução pelo LPS são mostrados na tabela 1. Pode-se observar que as análises pelo histograma e pela estatística de quadrante forneceram um valor médio discretamente inferior para o grupo de faixa etária mais baixa; entretanto, não existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de indivíduos (Tabela 2).

### Conclusões

As novas condições de análise introduzidas na metodologia utilizada como referência propiciaram uma otimização adequada, permitindo uma maior expressão de FT, pelo prolongamento do tempo de incubação e a obtenção de uma preparação estável e com pouca contaminação, como pode ser observado nas figuras 1 e 2.

A expressão de FT basal forneceu resultados bastante reduzidos nos dois métodos utilizados, sendo que a estatística de quadrante forneceu resultados mais homogêneos que a análise pelo histograma. O método de análise pela estatística de quadrante possibilita uma maior precisão no posicionamento do marcador, pelo observador,



pela distribuição das células em duas dimensões, segundo dois parâmetros de fluorescência.

A incubação a 37°C por quatro horas aumenta a expressão de FT na membrana dos monócitos, porém este aumento é pouco significativo na população de indivíduos saudáveis. Isto pode ser observado tanto quando a análise é feita pelo histograma quanto pela estatística de quadrante.

A estimulação pelo LPS após a incubação a 37°C fornece resultados bem mais elevados do que aqueles obtidos com amostras não estimuladas por esta endotoxina. Os resultados médios obtidos variam de dez a vinte vezes em relação ao valor de FT basal.

Quaisquer que sejam os parâmetros ou métodos de análise utilizados, os resultados demonstram que não há diferença significativa entre as duas populações de indivíduos estudados. Assim, a idade não parece ser um parâmetro importante no que diz respeito a expressão de FT basal ou estimulado por LPS. Não seria o FT em monócitos o parâmetro de risco capaz de explicar uma maior prevalência de risco trombótico em função da idade.

Dessa forma, estudos posteriores comparando os níveis de FT de monócitos entre uma população sadia e outra após episódio trombótico podem ser bastante promissores (ou elucidativos) no que diz respeito à contribuição do FT para desencadear o processo trombótico por si só, excluindo a idade como fator de risco.

#### Abstract

*The development of the flow cytometric assay using monoclonal antibodies labeled with different fluorescent substances enables the identification of a particular cell population even if it is present in heterogeneous cell samples. This technique has been applied to oncohematology and bone marrow transplantation studies. Two combined fluorescent monoclonal antibodies enable the study of a particular cell population in the expression of procoagulant substances produced by cells involved in homeostatic mechanisms. The application of this methodology creates the perspective of pathophysiologic studies related to hypercoagulability states. Considering that monocytes are highly involved in pathophysiologic mechanisms contributing to thrombus formation and atheromatous plaques and that Tissue Factor represents the principal physiologic activator of the clotting system, this study constitutes a potential tool for obtaining new insights of the role of monocytes in diseases associated to hypercoagulability states. The present*

*work aimed to establish the optimization of conditions for measuring the tissue factor expression in monocytes stimulated or not by lipopolysaccharides from Escherichia coli and analyzed by flow cytometric assay based on a previous methodology. Blood samples were collected from healthy subjects and divided in two age ranges. Studies on monocytes were carried out comparing two methods of analysis, which define the percentage of cells expressing tissue factor on their surface. From the results, it was concluded that there is no difference between the two age ranges related to the tissue factor expression in monocytes. In addition, there were no significant differences between the two assessed methods of analysis. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(3):141-147.*

**Key words:** Tissue factor; flow cytometry; coagulation.

#### Referências Bibliográficas

- Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001;86:66-74.
- Falciani M, Gori AM, Fedi S et al. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb Haemost* 1998;79:495-499.
- Santucci RA. Measurement of tissue factor activity in whole blood. *Thromb Haemost* 2000;83:445-454.
- Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuellar J, Murcia AM et al. Macrophages, smooth muscle cells and tissue factor in unstable angina; implications for cell mediated thrombogenicity in acute coronary syndromes. *Circulation* 1996;94:3.090-3.097.
- Semeraro N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. *Thromb Haemost* 1997;78:759-764.
- Rao LVM, Pennurthi UR. Tissue factor on cells. *Blood Coag Fibrinol* 1998;9:(suppl1):S27-S35.
- Jaroszeski MJ, Radcliff G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotech* 1999;II:37-53.
- Amirkhosravi A, Alexander M, May K, Francis DA et al. The importance of platelets in the expression of monocyte tissue factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay. *Thromb Haemost* 1996;75:87-95.

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

Recebido: 15/05/2003

Aceito após modificações: 25/02/2003

Recursos financeiros: Fapemig – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (CDS 1203/97) e CNPq – Conselho Nacional de Pesquisas