



INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS CD271+ NO SANGUE PERIFÉRICO APÓS LESÃO MUSCULAR INDUZIDA POR EXERCÍCIO FÍSICO

Luiza Furlanetto Fraga, Thailine Avila dos Santos, Daniel Carlos Garlipp
Prof. Dr. Lindolfo da Silva Meirelles
Universidade Luterana do Brasil

INTRODUÇÃO

As células estromais mesenquimais (MSCs) têm capacidade de diferenciação em várias linhagens do tipo mesodérmica (encontradas nas paredes dos vasos sanguíneos) e também não mesodérmicas, originando vários tecidos, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, entre outros [1]. A molécula CD271 é um marcador de superfície de células que dão origem a cultura de células estromais mesenquimais. Anteriormente, foi proposto por nosso grupo que as células perivasculares, denominadas pericitos, originam as MSCs, e que esses pericitos passam a um estado ativado e são mobilizados para o sangue durante e após lesão tecidual [2].

OBJETIVO

Analisar a presença e frequência de células CD271+ no sangue periférico após lesão muscular induzida por exercício físico.

METODOLOGIA

Os participantes da pesquisa forneceram uma amostra de 5 mL de sangue periférico, três dias após seção intensa de exercício físico que resultou em lesão muscular. As amostras de sangue foram incubadas com solução de lise de hemácias, e lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após essas lavagens, as células foram contadas, e dispensadas em tubos de citometria de fluxo (200.000 células em 100 µL por tubo). Um dos tubos recebeu um anticorpo anti-CD271 humano conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Outro tubo recebeu um anticorpo inespecífico do mesmo isotipo que o anticorpo anti-CD271 conjugado com FITC. Em outro momento, um anticorpo anti-CD34 foi incluído como um marcador de pericito adicional. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C, lavadas com PBS, e ressuspensas em 300 µL de PBS. As amostras foram lidas em um citômetro de fluxo Accuri C6.

RESULTADOS

Primeiramente, cinco indivíduos com lesão muscular induzida por exercício físico tiveram amostras de sangue analisadas. Comparamos as frequências de eventos positivos nos tubos que receberam o anticorpo anti-CD271 com aquelas dos tubos que receberam um anticorpo controle., conforme a Figura 1. Foram realizados experimentos nos quais células sanguíneas foram dispensadas em garrafas de cultura após lise de hemácias. Em uma única ocasião, observou-se a formação de uma colônia de células mesenquimais.

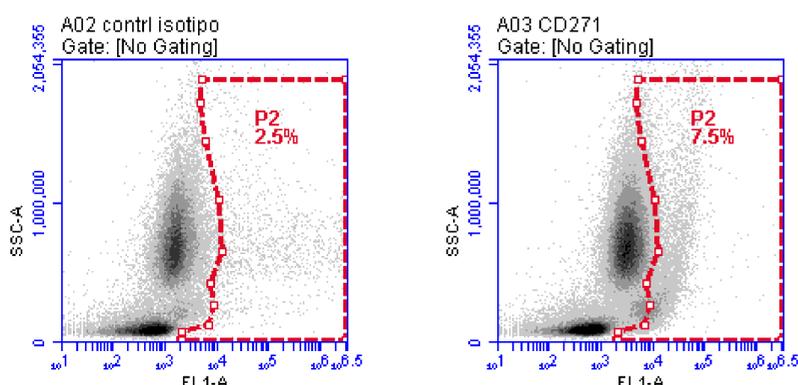


Figura 1: Análise do citômetro de fluxo. O primeiro quadro mostra os eventos positivos no tubo que recebeu um anticorpo controle (2,5%). O segundo quadro mostra os eventos positivos no tubo que recebeu um anticorpo anti-CD271 (7,5%).

Após estes resultados, analisamos a amostra do antes e depois da LMIEF de dois pacientes. Desta vez, utilizamos um tubo de coleta com EDTA ao invés de heparina. Também avaliamos a frequência de células positivas para CD34, outro marcador de pericitos não cultivados. Os histogramas podem ser visualizados nas Figuras 2 e 3.

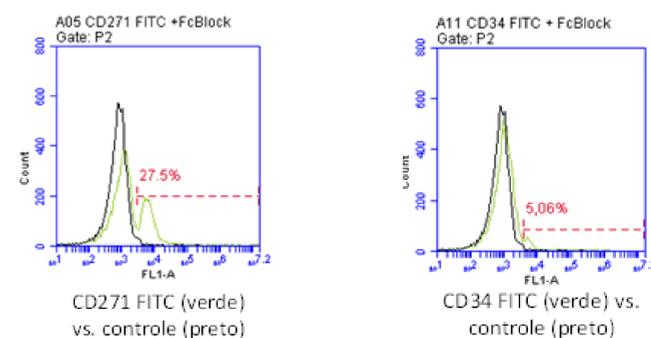


Figura 2: Análise do citômetro de fluxo de sangue de paciente antes de sofrer a LMIEF. Histogramas em preto representam a fluorescência basal dos tubos marcados com anticorpos isotípicos. Histogramas coloridos indicam o nível de fluorescência das moléculas indicadas abaixo dos respectivos histogramas.

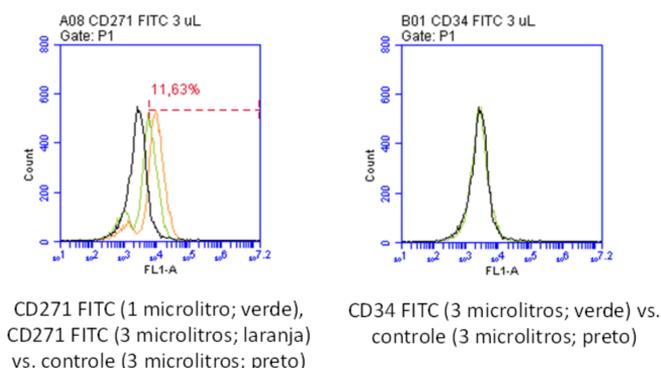


Figura 2: Análise do citômetro de fluxo de sangue de paciente três dias após sofrer LMIEF. Histogramas em preto representam a fluorescência basal dos tubos marcados com anticorpos isotípicos. Histogramas coloridos indicam o nível de fluorescência das moléculas indicadas abaixo dos respectivos histogramas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados indicam que células positivas para CD271 foram encontradas em proporções semelhantes no sangue antes e depois da LMIEF. Quando o marcador CD34 foi avaliado, constatou-se a presença de células fracamente positivas com tamanho e granulosidade correspondentes a monócitos antes da lesão, e células positivas para este marcador não foram detectadas após a lesão. Esses resultados são, aparentemente, contraditórios. A incapacidade de as células do sangue da ampla maioria dos participantes que sofreram LMIEF formarem colônias mesenquimais em cultura indica a possibilidade de as células positivas para CD271 encontradas não serem pericitos. As próximas perspectivas da linha de pesquisa serão avaliar outros marcadores de pericitos (por exemplo, CD140b e NG2) para verificar se a frequência de células positivas para esses marcadores é concordante com a frequência de células positivas para CD271 encontradas.

REFERÊNCIAS

- CAPLAN, AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the vivo identity of mesenchymal stem cells. Stem Cells, v. 26, n.9, p. 2287-2299, 2008.