



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

Luiza Furlanetto Fraga¹
Thailine Avila dos Santos²
Daniel Carlos Garlipp³
Lindolfo da Silva Meirelles⁴

RESUMO

Os pericitos, células perivasculares, possivelmente originam células estromais mesenquimais, sendo ativados e mobilizados para o sangue durante lesão tecidual. Após analisar a presença de células positivas para CD271 no sangue periférico de participantes que sofreram lesão muscular, foi constatado que as mesmas aumentaram significativamente sua frequência se comparado com a análise feita com o anticorpo controle. Em uma das culturas estabelecidas, foi observada uma colônia de células mesenquimais que, quando expandida e analisada por citometria de fluxo, apresentou um perfil de moléculas de superfície tipicamente mesenquimal. Estes resultados permitem que o projeto de pesquisa continue, com o objetivo de utilizar mais marcadores dessas células, com mais amostras.

Palavras chave: célula estromal mesenquimal; lesão muscular; CD271; pericito.

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]. São conhecidas por possuírem potencial para tratamentos médicos em diversas patologias; essas células apresentam capacidade de secretar fatores bioativos, os quais contribuem para microambientes regenerativos locais [2], e suas culturas podem diferenciar-se em adipócitos, condrócitos e osteoblastos [3]. A molécula CD271 é um marcador de superfície de células que dão origem a cultura de células estromais mesenquimais e, baseado em conhecimentos científicos prévios, essa e diversas outras moléculas de superfície já foram utilizadas para o isolamento de MSCs da medula óssea [4]. Esse marcador, também conhecido como receptor do fator de crescimento do nervo de baixa

1 Aluna do curso de graduação Ciências Biológicas – Bolsista PROBIC/FAPERGS – luizafurlanetto_@hotmail.com

2 Aluna do curso de graduação Biomedicina – avila.thailines@gmail.com

3 Professor do curso de Educação Física – dengarlipp@gmail.com

4 Professor do PPG em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – lindolfomeirelles@gmail.com

afinidade (LNGFR), receptor do fator de crescimento do nervo (NGFR) ou receptor de neurotrofina (p75NTR), é pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral [5].

Anteriormente, foi proposto por nosso grupo que as células perivasculares, denominadas pericitos, originam as células estromais mesenquimais, e que esses pericitos passam a um estado ativado durante lesão tecidual [6]. Quando pericitos foram isolados de tecido adiposo humano por meio de um protocolo refinado, foi constatado que estes eram positivos para CD271 e CD34 [7]. Neste contexto, Iso et al. detectaram, no sangue de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio, células positivas para CD271 e CD34 [8]. As células detectadas por Iso et al. poderiam representar pericitos que foram mobilizados para o sangue após a lesão cardíaca.

É possível que pericitos sejam mobilizados para o sangue após determinados tipos de lesão tecidual. Lesão muscular induzida por exercício físico [9], por exemplo poderia representar um gatilho para a mobilização dessas células para o sangue, já que a lesão no músculo cardíaco está relacionada com a presença de células com marcadores de pericito no sangue.

Com este trabalho, nosso objetivo é analisar a frequência de células CD271⁺ no sangue periférico após lesão muscular induzida por exercício físico, e também tomar conhecimento do número de amostras necessárias para a determinação do tamanho amostral ideal, e tentar isolar essas células para cultivo, a fim de caracterizá-las.

METODOLOGIA

Os participantes da pesquisa foram convidados a fornecer uma amostra de 5 mL de sangue periférico, três dias após sessão intensa de exercício físico que resultou em dor e redução da força muscular. O sangue foi coletado em uma seringa de 5 mL heparinizada. No momento da coleta, os participantes concederam dados complementares, como: peso, altura, frequência semanal de exercícios físicos, o exercício físico que causou a LMIEF, posição anatômica afetada pela LMIEF, e data em que a LMIEF ocorreu. Para a obtenção de estimativa de um controle a nível basal das células CD271⁺ nesses participantes, eles foram convidados a fornecer uma nova amostra após terem passado duas semanas sem quaisquer sinais de LMIEF. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da ULBRA (CAAE: 60752016.0.0000.5349).

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) numa concentração de 1 µg de anticorpo para cada 1.000.000 células. Outro tubo recebeu um anticorpo inespecífico do mesmo isotipo que o anticorpo anti-CD271 conjugado com FITC. 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 (BD Biosciences) localizado nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde. Um número mínimo de 50.000 eventos foi coletado. A frequência de células positivas para CD271 e a intensidade média de fluorescência dessas células foi determinada para comparação com aquela do tubo controle.

Para uma abordagem exploratória sobre a presença de células mesenquimais no sangue, amostras de sangue periférico dos participantes que apresentavam lesão muscular induzida por exercício físico foram incubadas com solução de lise de hemácias, lavadas e contadas. As células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM com 10% de soro fetal bovino, e incubadas a 37°C em ambiente umidificado com 5% de CO₂. Quando presentes, células com aspecto mesenquimal foram expandidas por meio de repiques após coleta com uma solução de tripsina e EDTA, conforme previamente descrito [7].

Para a imunofenotipagem de culturas derivadas de células CD271⁺, as células foram coletadas com tripsina e EDTA, lavadas e contadas. As células foram transferidas para tubos de citometria de fluxo (100.000 células em 100 µL de PBS), aos quais foram adicionados, individualmente, anticorpos que reconhecem os seguintes antígenos humanos: CD34, CD31, CD140, CD106, CD90, CD105, CD45, CD11b, CD79a, e NG2. Após uma incubação de 20 minutos, a temperatura ambiente no escuro, as suspensões celulares foram lavadas, ressuspensas em 300 µL de PBS, e lidas com um citômetro de fluxo Accuri C6, localizado nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, 5 indivíduos com lesão muscular induzida por exercício físico tiveram amostras de sangue analisadas. Destes, apenas dois forneceram uma amostra de sangue em período livre de lesão muscular. Por isso, comparamos as frequências de eventos

positivos nos tubos que receberam o anticorpo anti-CD271 com aquelas dos tubos que receberam um anticorpo controle. A Tabela 1 mostra essas frequências.

Tabela 1: Frequência de eventos positivos para sinal fluorescente em tubos que receberam um anticorpo anti-CD271 e em tubos que receberam um anticorpo controle

Participante da pesquisa	Frequência de eventos positivos (%) no tubo que recebeu um anticorpo controle	Frequência de eventos positivos (%) no tubo que recebeu um anticorpo anti-CD271
1	0,20	4,70
2	1,00	5,00
3	0,90	2,60
4	0,80	5,10
5	2,50	7,50

Com base nos dados da Tabela 1, procedemos com o cálculo do tamanho amostral para um teste t de Student não pareado. Para isso, a diferença entre as médias das duas colunas de frequências da Tabela 1 foi calculada, bem como os desvios padrão de cada uma das colunas. A diferença entre médias calculada foi de 3,9, e o desvio padrão mais alto (correspondente ao das frequências de células nos tubos teste) foi 1,740. Esses dados foram inseridos em uma calculadora estatística. Considerando-se um poder estatístico de 0,8 com um valor de alfa igual a 0,05, o número amostral requerido para um teste t não pareado encontrado foi 5. Após a confirmação da normalidade dos valores encontrados nas duas colunas de frequência da Tabela 1, eles foram comparados por meio de um teste t para amostras não pareadas. O teste acusou a presença de uma diferença significativa entre elas, com um valor de P menor que 0,01.

Até o presente momento, não foi realizado o isolamento de células com base no marcador CD271. Em vez disso, foram realizados experimentos nos quais células sanguíneas foram dispensadas em garrafas de cultura após lise de hemácias. Em uma única ocasião, em cinco tentativas, observou-se a formação de uma colônia de células mesenquimais. Quando essas células foram expandidas e submetidas a submetidas a citometria de fluxo, observou-se que elas apresentavam um perfil de moléculas de superfície tipicamente mesenquimal, conforme mostrado na Figura 1. Conforme esperado, as moléculas CD271 e CD34 não estavam presentes na superfície dessas células após o cultivo, uma vez que sua expressão é perdida em cultura [7]. Em contrapartida, o marcador de pericitos ativados (NG2), bem como outros marcadores de MSCs cultivadas (CD105 e CD90) foram detectados na superfície dessas células. Os marcadores de células hematopoiéticas CD11b e CD45 estavam ausentes, bem como o marcador de células endoteliais CD31.

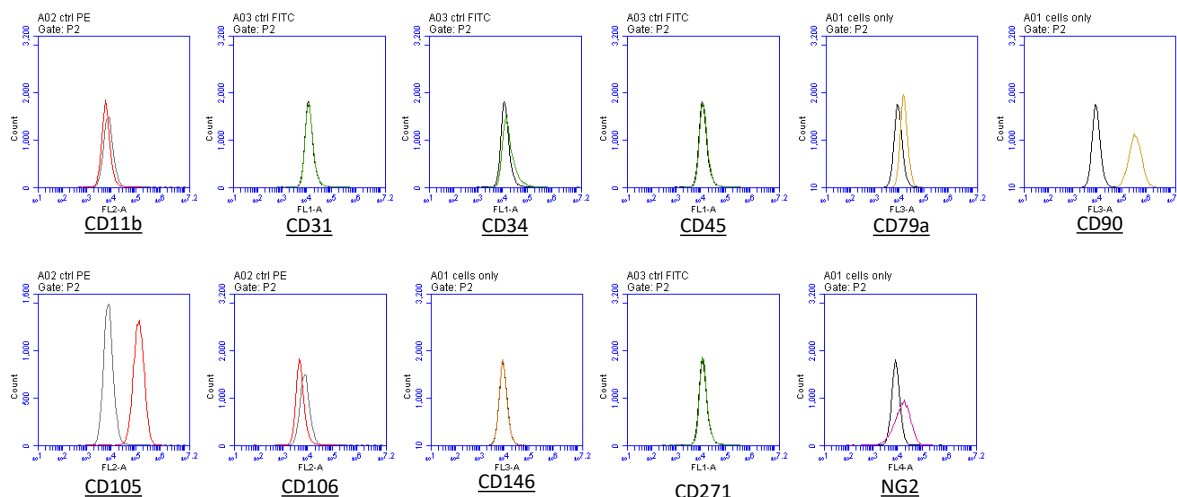


Figura 1: Perfil de expressão de moléculas de superfície de uma cultura de células mesenquimais estabelecida a partir de células sanguíneas de um indivíduo que apresentava lesão muscular induzida por exercício físico. Histogramas em preto representam a fluorescência basal dos tubos marcados com anticorpos isotípicos. Histogramas coloridos indicam o nível de fluorescência das moléculas indicadas abaixo dos respectivos histogramas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso grupo conclui que a possibilidade de pericitos originarem células estromais mesenquimais após lesão tecidual é significativa, e pretende continuar as análises em mais amostras, utilizando outros marcadores além do CD271 para sua identificação.

REFERÊNCIAS

1. CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
2. MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, v. 45, p. e54, 2013.
3. MACKAY, D.L. *et al.* Characterizing medullary and human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *J Cell Physiol*, v. 207, n.3, p. 722-728, 2006.
4. LI, H. *et al.* Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1370, n.1, p. 109-118, 2016.
5. LV, F.J. *et al.* Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 32, n. 6, p. 1408-1419, 2014.
6. 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.
7. DA SILVA MEIRELLES, L. *et al.* Cultured Human Adipose Tissue Perycites and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile. *Stem Cells Dev*, v. 24, n.23, p. 2822-2840, 2015.
8. ISO, Y. *et al.* Distinct mobilization of circulating CD271+ mesenchymal progenitors from hematopoietic progenitors during aging and after myocardial infarction. *Stem Cells Transl Med*, v. 1, n. 6, p. 462-468, 2012.
9. CLARKSON, P.M. *et al.* Exercise-induced muscle damage in humans. *Am J Phys Med Rehabil*, v.81, n.11, p. 52-69, 2002.