



Poster 13. ISOLAMENTO MECÂNICO DAS CELULAS ENDOTELIAIS E SUA CARATERIZAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

Cláudia Torres^{1,2}, Rui Machado³, Margarida Lima^{2,4}

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Porto; ²Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto (UP), Porto; ³Serviço de Cirurgia Vascular, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto; ⁴Laboratório de Citometria de Fluxo, Serviço de Hematologia Clínica, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto.

Introdução: As células endoteliais (CE), apesar de revestirem em monocamada o interior de todos os vasos sanguíneos, desempenham inúmeras funções de extrema importância biológica. Por isso é importante identificar e caracterizar estas células recorrendo a diferentes técnicas para aumentar o conhecimento que temos delas. Os principais estudos realizados neste âmbito foram feitos recorrendo principalmente à imunohistoquímica, e recentemente existem alguns trabalhos usando a técnica de citometria de fluxo (CF), após isolar as CE por métodos enzimáticos. No entanto, sabe-se que tanto a imunohistoquímica como o método de isolamento enzimático, podem induzir artefatos nas células, influenciando as ligações anticorpo-antígeno. Com a intenção de ultrapassar estes obstáculos, minimizando possíveis alterações na expressão dos recetores das células que ocorrem por outras técnicas, foi desenvolvido um método mecânico de isolamento das CE e caracterizado o seu fenótipo por CF, estudada uma tríade de anticorpos monoclonais.

Objetivos: Isolar CE de veias safenas por método mecânico, identificá-las e caracterizá-las por CF.

Material e Métodos: Para a realização deste estudo, obtiveram-se segmentos de veias safenas de comprimento variável entre 1.5 a 4 cm de 10 doentes submetidos a cirurgia de varizes. As CE foram isoladas por método mecânico com ajuda de duas pinças de pontas serrilhadas, após se ter procedido ao corte longitudinal do segmento de veia disposta sobre uma placa de esferovite revestida com Parafilm®. Durante o processo de isolamento, a superfície interna do segmento de veia esteve sempre com solução tamponada de fosfato e 2% albumina de soro bovino (PBS+2% BSA), para evitar desidratação das células, e facilitar a sua transferência para um tubo de fundo cónico. Posteriormente as células removidas e suspensas em PBS+2% BSA foram marcadas com diferentes anticorpos: anti-CD45 (pan-leucocitário); anti-CD31 (PECAM, marcador de CE) e anti-CD146 (marcador CE) usando procedimento de marcação seguida de lise-sem-lavagem. As CE foram identificadas como sendo CD45(-)CD31(+)/CD146(+). Subsequentemente, com intenção de certificar a identificação das CE, foram usados mais 3 anticorpos reativos com outros antígenos expressos por estas células: anti-CD105 (Endoglin), anti-CD144 (VE-Caderina) e anti-CD309 (recetor do fator de crescimento do endotélio vascular 2, VEGFR-2).

Resultados: Foi possível isolar células de todos os segmentos de veias estudados e identificar uma população evidente de CE pela expressão de CD45(-)CD31(+)/CD146(+). Verificou-se que as CE identificadas por esta tríade de anticorpos também expressavam CD105, CD144 e CD309.

Conclusões: O método de isolamento mecânico descrito neste trabalho permite isolar uma população muito bem definida de CE. Usando este método de isolamento e de identificação das CE, poder-se-á fazer um vasto número de estudos como, por exemplo, a caracterização fenotípica detalhada das CE, com avaliação da expressão de marcadores de ativação e angiogénicos, entre outros, e estudos funcionais *ex-vivo*, com avaliação da resposta das CE a diferentes estímulos.

Contactos: Cláudia Torres, Aluna Doutoramento em Ciências Biomédicas, ICBAS/UP: torres.cb@gmail.com; Rui Machado, médico especialista de Cirurgia Vascular, CHP; Margarida Lima, médica especialista de Imunohemoterapia, CHP: mmc.lima@clix.pt