



P23. CULTURAS CELULARES DE FIBROBLASTOS: FENÓTIPO E ESTUDO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Sónia Fonseca¹, Fátima Leite², Rosa Sousa², Ana Helena Santos¹, Catarina Lau¹, Maria do Anjos Teixeira¹, Maria Luís Queirós¹, Marlene Santos¹, Marta Gonçalves¹, Beatriz Porto², Margarida Lima¹

1. Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto. 2. Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

Introdução

A anemia de Fanconi (AF) é uma doença recessiva que se caracteriza por falência medular e anomalias congénitas variáveis. As células dos doentes com AF apresentam demora da fase G2 do ciclo celular, instabilidade cromossómica espontânea e hipersensibilidade para quebras cromossómicas induzidas por agentes clastogénicos, como o diepoxibutano (DEB), em resultado de mutações em genes relacionados com a reparação do ADN. As culturas celulares de fibroblastos, devido à sua longevidade, são de extrema importância para a investigação da doença.

Objectivos

a) Optimizar as culturas celulares de fibroblastos; b) caracterizar o perfil fenotípico dos fibroblastos por citometria de fluxo (CF); c) estudar a influência de diferentes concentrações do DEB sobre o ciclo celular dos fibroblastos.

Material

Foram estudadas culturas celulares de fibroblastos normais da pele, na ausência (culturas espontâneas) e na presença de diferentes concentrações de DEB.

Métodos

Estabelecimento de linhas celulares de fibroblastos em meio Ham completo. Após 15 dias de cultura adição de 0.1µg/ml, 0.01µg/ml e 0.005µg/ml de DEB a 3 sub-culturas independentes (4^a sub-cultura não tratada). Ao fim de 48h tripsinização para observação por CF. Marcação directa de membrana com anticorpos monoclonais específicos para diferentes antígenos (CD3, CD9, CD10, CD13, CD20, CD29, CD45, CD49b, CD49e, CD55), conjugados com diferentes fluorocromos. Aquisição em citómetro de fluxo FACS-Calibur e análise no programa Paint-a-Gate. Estudo do ciclo celular com marcação dupla de antígenos de membrana (CD29) e ADN (Kit DNA-Prep®). Aquisição em citómetro de fluxo EPICS-XL e análise do ciclo celular no programa Multicycle software (Phoenix Flow System).

Resultados

Verificou-se crescimento dos fibroblastos em cultura, na ausência e na presença de diferentes concentrações de DEB. Os fibroblastos exprimiam CD29, CD13, CD55 e CD10 na membrana, mas não CD3, CD20 e CD45. O estudo do ciclo celular evidenciou uma acumulação de células nas fases S e G2/M, nas culturas com DEB, comparativamente com as espontâneas.

Conclusões

O protocolo utilizado permitiu obter fibroblastos em cultura, caracterizar o seu perfil fenotípico e estudar o efeito do DEB no seu ciclo celular. Usando este modelo, esperamos no futuro investigar os mecanismos subjacentes à instabilidade cromossómica espontânea das células dos doentes com AF e à sua hipersensibilidade ao DEB, bem como avaliar o efeito protector de alguns fármacos.