

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

Laura Maria Mota do Rio Bamar¹; Danielle Devequi Gomes Nunes²; Milena Botelho Pereira Soares²

¹ Graduanda em Engenharia Química; Iniciação científica – CNPq; laura.mariamrb@gmail.com;

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; milena.soares@fieb.org.br

RESUMO

As vesículas extracelulares são uma população heterogênea de vesículas derivadas de células com forma esférica e delimitadas por fosfolípidios. Sabe-se que vesículas derivadas de células-tronco mesenquimais carregam características da sua célula parental, tais como: capacidade de migração, habilidade de reparação dos tecidos danificados e a capacidade de imunomodulação. Estas propriedades conferem às vesículas um grande potencial terapêutico que pode ser utilizado para o tratamento de doenças crônicas relevantes. Dessa forma, o presente projeto tem como objetivo isolar e caracterizar vesículas extracelulares oriundas de células tronco mesenquimais modificadas geneticamente para superexpressar a Flagelina, avaliando preliminarmente o seu potencial de ativação do sistema imune. Nos resultados encontrados, foi possível isolar vesículas extracelulares e caracterizá-las quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersão, quanto a morfologia e indução de uma citocina importante para ativação do sistema imune.

PALAVRAS-CHAVE: células-tronco mesenquimais, vesículas extracelulares, microvesículas.

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células-tronco adultas encontradas em diferentes tecidos, incluindo a medula óssea, gordura, sangue do cordão umbilical e placenta. As CTMs possuem capacidade de auto renovação, além de possuírem propriedades imunomoduladoras, reduzindo inflamações e ajudando na reparação de tecidos danificados e ativação do sistema imune.¹ Estudos visam aprimorar as propriedades terapêuticas das CTMs por meio de modificação genética a fim de aumentar a produção de proteínas e fatores específicos, tais como citocinas que sejam capazes de estimular o sistema imune como, por exemplo, a superexpressão da proteína flagelina (flag-s). A flagelina, por exemplo, é uma proteína que compõe o flagelo bacteriano e pode ativar o sistema imunológico do hospedeiro, podendo desencadear uma resposta imune adaptativa.² As CTMs secretam mediadores bioativos, como as vesículas extracelulares (VEs), que possuem efeitos imunossupressores, anti-apoptóticos, anti-inflamatórios, angiogênicos e anti-fibróticos.³ As VEs são pequenas estruturas membranosas secretadas por muitos tipos de células, incluindo células-tronco mesenquimais, células cancerosas e células imunológicas, carregadoras de DNA, vários tipos de RNA, proteínas, lipídios e metabólitos. Existem dois tipos principais de VEs: exossomas e microvesículas, estas reproduzem as mesmas características e função biológica que sua célula mãe, no entanto, apresentam propriedades únicas, como seu tamanho pequeno, baixa imunogenicidade, atuando como transportadores de moléculas, com diversas propriedades terapêuticas.^{4,5}

Diante do exposto, o presente projeto tem como o objetivo isolar e caracterizar vesículas extracelulares oriundas de células-tronco mesenquimais, geneticamente modificadas super expressando a proteína flagelina, a fim de entender o seu potencial de modulação de resposta do sistema imune

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo celular e isolamento das vesículas extracelulares

As células-tronco mesenquimais utilizadas neste projeto foram anteriormente modificadas geneticamente para superexpressão de flag-s (VEs-flag-s) e fazem parte do banco de células disponíveis do laboratório. As células foram cultivadas *in vitro* utilizando o meio DMEM High Glucose. Após três dias de coleta do sobrenadante, o mesmo foi inicialmente centrifugado duas vezes em centrífuga de bancada e por último foi realizada a ultracentrifugação a 100.000 x g por 1 hora e 20 minutos a 4°C (Ultracentrífuga Himac CP 80wx – Hitach). Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de vesículas foi ressuspenso com 100 uL de solução de salina tamponada com fosfato (PBS), onde, a cada 100 uL o pellet era agitado em vórtex a fim de proporcionar a máxima recuperação das vesículas, que foram armazenadas no freezer a 80°C.

2.2 Caracterização das vesículas extracelulares.

Em seguida, as vesículas foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo protéico, utilizando o NanoDrop Lite (ThermoFisher). As vesículas também foram caracterizadas quanto ao seu tamanho, índice de polidispersão (PDI) e concentração utilizando os equipamentos NanoSight NS300 e o Zetasizer Nano ZS DLS (Malvern). As vesículas foram observadas pelo microscópio eletrônico de transmissão JEM-1230 JEOL, através da parceria SENAI CIMATEC e Fiocruz Bahia.

2.3 Atividade citotóxica e imunomoduladora.

A capacidade citotóxica das VEs-flag-s foi avaliada frente a macrófagos peritoneais a partir da técnica de colorimetria MTT. A avaliação da potencial atividade imunomoduladora foi realizada por ELISA Sanduíche para identificar a indução da citocina IL-6 em macrófagos peritoneais tratados com a VEs-flag-s.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As VEs derivadas das CTM geneticamente modificadas para a superexpressão da proteína flag-s (VEs-flag-s) apresentaram uma concentração de 1.58 mg/mL e um tamanho de 394 nm, com índice de polidispersão (PDI) de 0.3. O PDI avalia a heterogeneidade de uma amostra com base nos tamanhos, variando de 0 a 1.0. Diante destes resultados e corroborando com dados encontrados na literatura, estas VEs podem ser classificadas como microvesículas.⁶

Tabela 1. Concentração proteica e tamanho da vesícula extracelular.

Nanodrop Concentração protéica (mg/mL)	Zetasizer Tamanho da vesícula (d.nm)	Zetasizer Índice de polidispersão (PDI)
1.58	394	0.3

A viabilidade celular dos macrófagos peritoneais foi avaliada através do tratamento com a VEs-flag-s a fim de identificar potenciais efeitos citotóxicos frente a estas células. Conforme a Figura 1, foi possível observar que as vesículas não foram capazes de causar alterações celulares, inibindo o crescimento celular quando comparado aos controles positivo e negativo. Além disso, é possível observar que as VEs-flag-s foram capazes de induzir a expressão de IL-6 em macrófagos peritoneais quando comparada aos controles negativo (somente célula) e positivo (célula + LPS). A IL-6 é uma considerada uma citocina pró-inflamatória, produzida por células imunes (como os macrófagos), logo, a sua produção é indício de uma resposta imunológica estimulada pela vesícula.

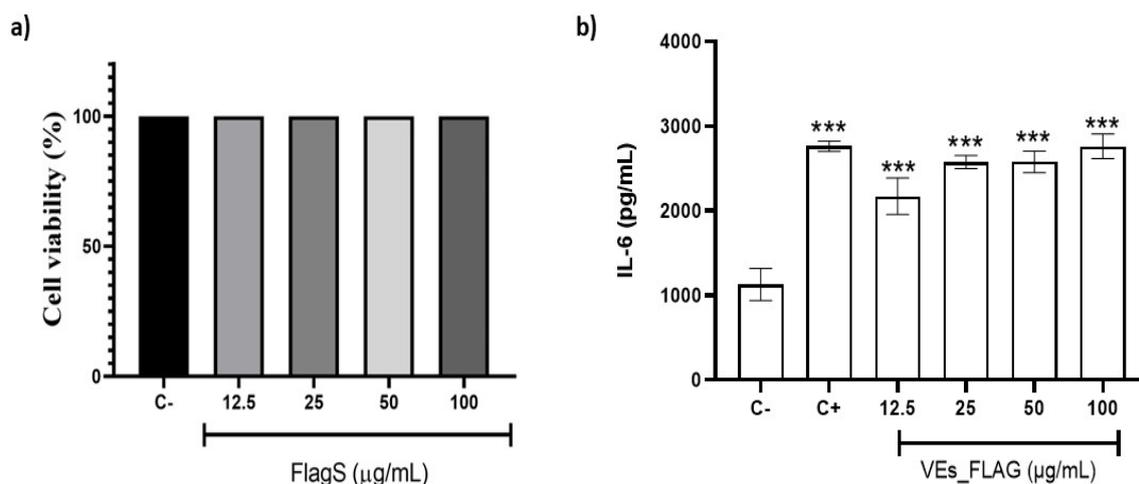


Figura 1. Atividade citotóxica e avaliação da expressão citocina pró-inflamatória; a) viabilidade celular de macrófagos peritoneais tratados com VEs-flag-s; b) Expressão de IL-6 em macrófagos peritoneais tratados com as VEs-flag-s.

Foi possível observar a morfologia das VEs-flag-s, a partir da microscopia eletrônica de transmissão (MET). Na Figura 2, é possível observar o formato arredondado das vesículas, envolto por uma membrana lipídica. Levando em consideração os resultados encontrados quanto à caracterização física e morfológica, conclui-se que foi possível isolar microvesículas oriundas de CTMs. As microvesículas são uma classe de vesículas extracelulares que são formadas a partir do brotamento da membrana plasmática das células. Elas

têm um diâmetro que varia de 100 nanômetros a 1 micrômetro e contêm uma mistura de lipídios, proteínas e material celular. Evidências crescentes também sugerem que as microvesículas podem desempenhar um papel importante em doenças, incluindo câncer, doenças autoimunes e doenças cardiovasculares.⁷

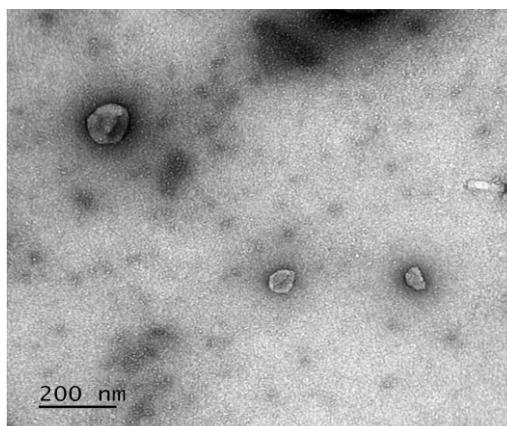


Figura 2. Caracterização morfológica de vesícula extracelular obtida por microscopia eletrônica de transmissão.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, pode-se concluir que as metodologias utilizadas foram capazes de isolar e caracterizar as vesículas extracelulares derivadas das células-tronco mesenquimais. Além disso, também foi possível observar que as VEs-flag-s induziram a produção de uma citocina importante para a ativação do sistema imune, assim como não apresentaram efeitos citotóxicos, visto que não houve inibição do crescimento celular nem alterações na estrutura do macrófago.

Apesar da vesícula ter induzido a produção de IL-6, há ainda muitos marcadores imunológicos que precisam ser avaliados a fim de averiguar o real potencial terapêutico e imunomodulador das vesículas extracelulares oriundas de células-tronco mesenquimais. Dessa forma, pesquisas ainda precisam ser conduzidas, avaliando outros perfis de citocinas importantes para o sistema imune, assim como sua aplicação em modelos de doenças crônicas, como o câncer.

Agradecimentos

Em agradecimento ao Programa Institucional de Bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) e CNPQ pelo financiamento; e também ao SENAI CIMATEC e Fiocruz Bahia pela infraestrutura disponibilizada.

5. REFERÊNCIAS

- ¹ DING, Dah-Ching; SHYU, Woei-Cherng; LIN, Shinn-Zong. **Mesenchymal Stem Cells**. 2011;
- ² MONARIS, Denize. **Avaliação do potencial coadjuvante da flagelina FliCi de Salmonella enterica sorovar Thyphimurium no desenvolvimento de uma vacina contra leptospirose**. 2011
- ³ HMADCHA, Abdelkrim; GAUTHIER, Benoit, et. al. **Therapeutic potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy**. 2020;
- ⁴ MINCIACCHI, Valentina; FREEMAN, Michael; DI VIZIO, Dolores. **Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes**. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2015.;
- ⁵ NOOR, Nur Azira Mohd; NURUL, Asma Abdullah; et. al. **Extracellular Vesicles from Mesenchymal Stem Cells as Potential Treatments for Osteoarthritis**. 2021;
- ⁶ MINCIACCHI, Valentina R.; FREEMAN, Michael R.; VIZIO, Dolores di. **Extracellular Vesicles in Cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes**. Seminars In Cell & Developmental Biology, [S.L.], v. 40, p. 41-51, abril 2015.
- ⁷ BEETLER, Danielle J.; FLORIO, Damian N. di; BRUNO, Katelyn A.; IKEZU, Tsuneya; MARCH, Keith L.; COOPER, Leslie T.; WOLFRAM, Joy; FAIRWEATHER, Delisa. **Extracellular vesicles as personalized medicine**. *Molecular Aspects Of Medicine*, [S.L.], v. 91, p. 101155, jun. 2023