

Isolamento e caracterização de exossomos excretados por ADSCs

Deborah da Cruz Schafhauser

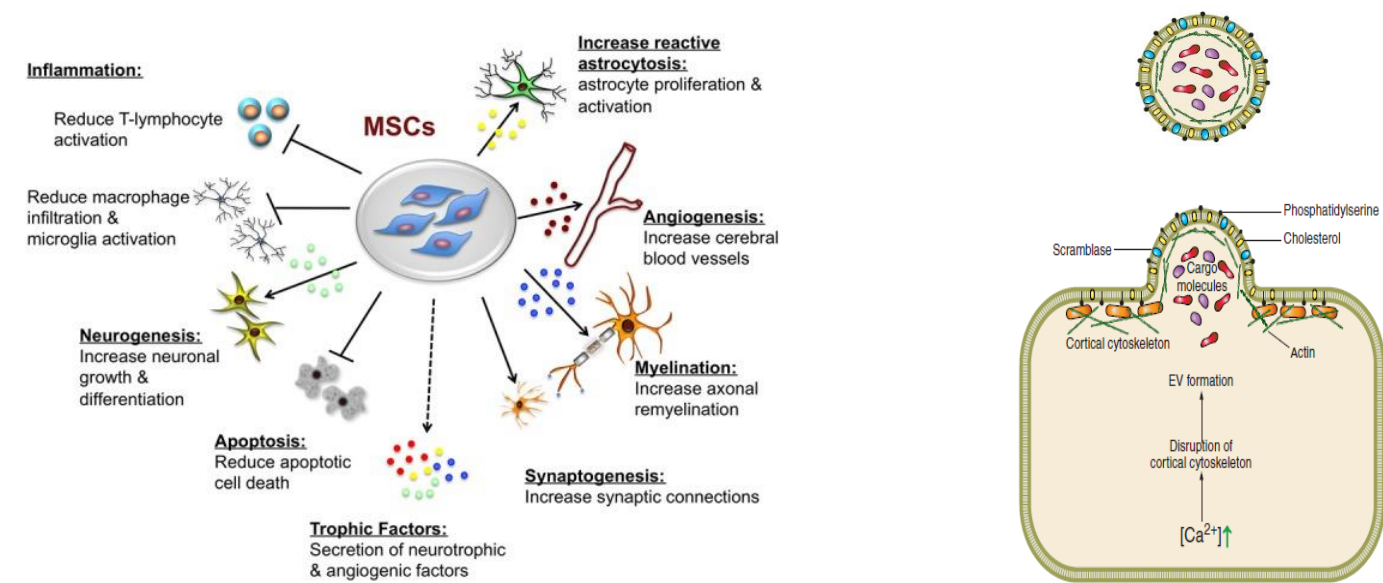
Introdução

Células mesenquimais adipo-derivadas – ADSC possuem característica multipotente e têm sido o foco de grande interesse na medicina regenerativa.

Os estudos com terapia de regeneração tecidual a base de ADSCs têm apresentado resultados promissores, no entanto, alguns casos apontam reações adversas como possíveis respostas imunológicas contra as ADSCs enxertadas.

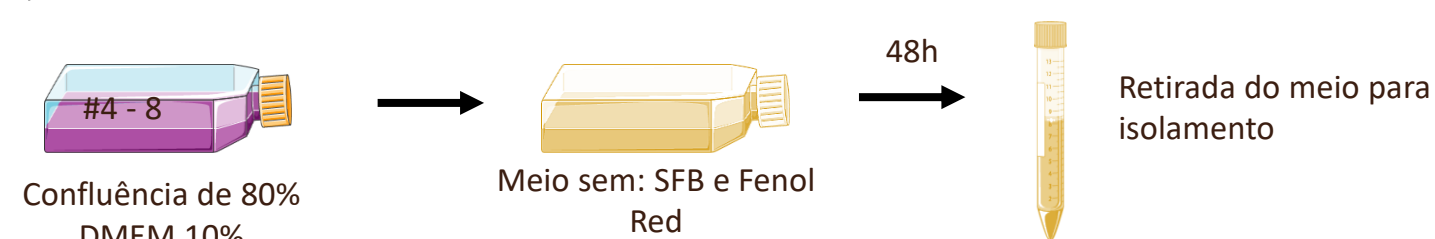
Uma estratégia atrativa para obtenção de resultados similares é a utilização de exossomos derivados dessas células, quais já tem apresentado resultados significativos na recuperação de tecidos isquêmicos, em especial, regiões cerebrais com danos derivados de hipóxia.

Exossomos são partículas que contém moléculas bioativas que fazem parte da rede de comunicação célula-célula. Seu conteúdo depende da célula de origem e pode ser influenciado por um estresse fisiológico, como infecção.



Metodologia

A linhagem humana primária de hAMSCs obtida do banco POIETICS -Adipose-DerivedStemCells foi mantida em cultura com meio DMEM e 10% de soro fetal bovino (SFB) a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.



Antes da coleta do meio, as culturas foram submetidas a choques mecânicos (batidas) para facilitar a liberação dos exossomos.

Análises:	Pureza:	Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET)
	Tamanho e Intensidade:	Zetasizer-zs90
	Concentração :	Método de Lowry modificado
	Conteúdo Lipídico:	Cromatografia em camada delgada (TLC), dois sistemas
	Conteúdo Proteico :	Cromatografia seguida de Espectrometria de massas
	mRNA e miRNA:	Sequenciamento (NGS) – qualitativo; ou Microarranjo – comparativo às células

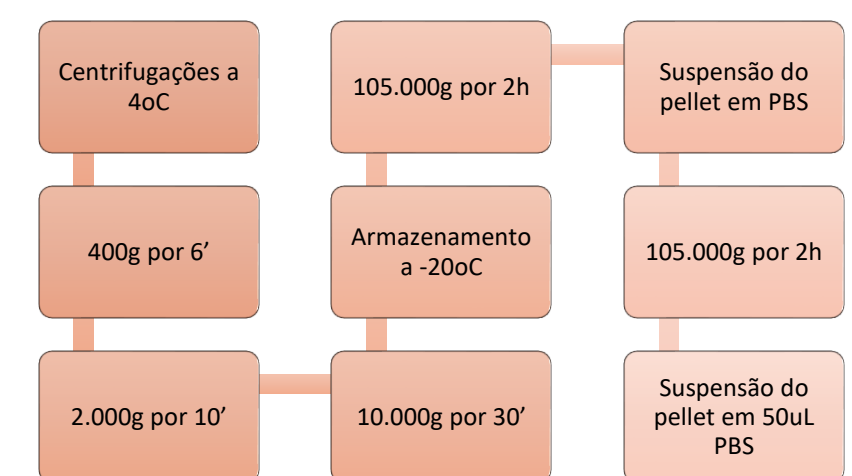
Para investigar a presença de fosfolípidos e lípidos neutros foram usados sistemas de solventes contendo: clorofórmio, acetona, metanol, ácido acético e água (10:4:3:2:1) e hexano, éter etílico e ácido acético glacial (90:10:1), respectivamente. O tempo para saturação da cuba foi padronizado em 5 minutos.

Objetivo

Estabelecer um protocolo eficiente de isolamento dos exossomos e realizar a sua caracterização.

Resultados

➤ Isolamento dos exossomos:



➤ Pureza: Análise por MET confirmou a pureza e eficácia do método. Em grid de cobre com filme de carbono, contrastado com acetato de uranila.

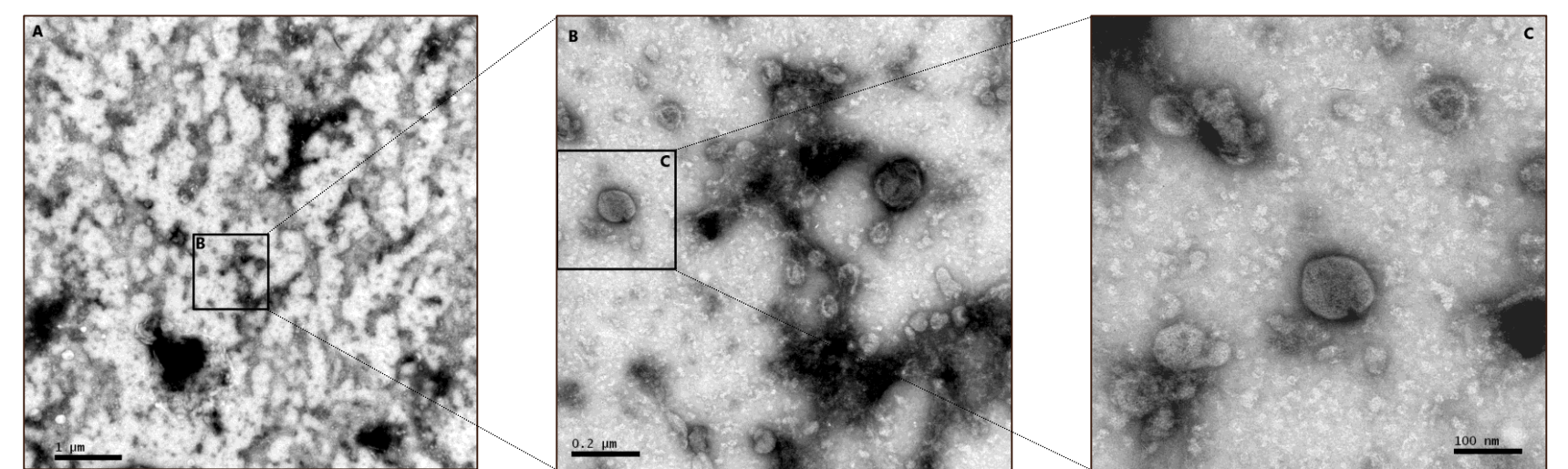


Fig. 1.: Microscopia de Transmissão, por exame direto, de microvesículas. Magnificações: A 20.000x; B 100.000x; C 200.000x.

➤ Tamanho e intensidade: Zetasizer - zs901; Medimos o tamanho médio dos exossomos na amostra e a intensidade que cada tamanho representa. Os exossomos tem, em media, 100 nm..

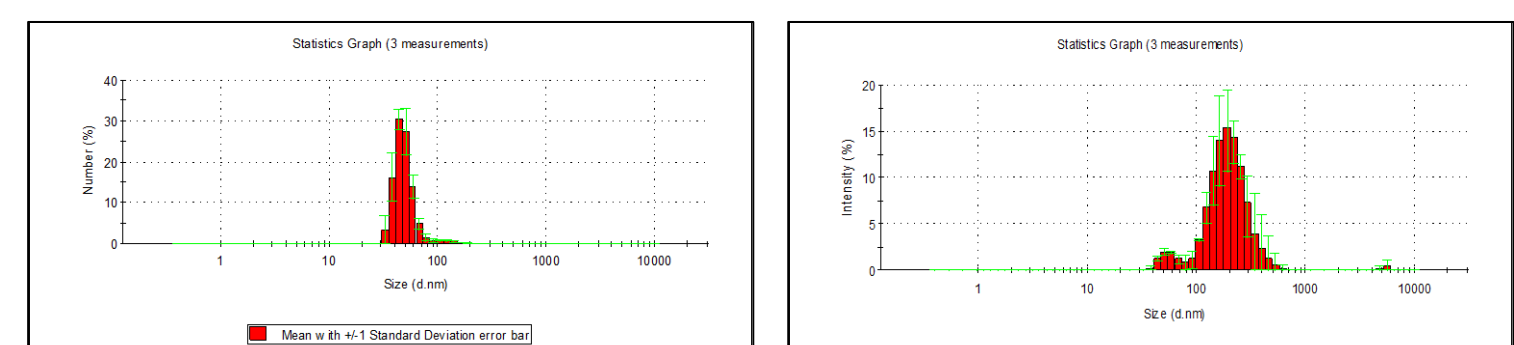


Fig.2: Análise por Zetasizer. Gráfico direito mostra o tamanho médio dos exossomos na amostra, o gráfico esquerdo mostra a intensidade da medida.

➤ Concentração: Método modificado de Lowry -> 6x10⁷ células secretam 1µg/µl de proteína (suspensão de exossomos) em 48h.

Conclusão

- ✓ O protocolo de isolamento dos exossomos, com o uso das centrifugações se mostrou efetivo.
- ✓ Foi possível caracterizar o tamanho e as populações de exossomos derivados de ADSCs.
- ✓ Os ensaios de lipidômica realizados até o momento mostraram que os principais lípidos encontrados nos exossomos foram o colesterol e a fosfatidilcolina. Ainda não foi obtido um volume de amostra que permita a visualização concreta dos resultados.
- ✓ Os próximos passos são a caracterização das proteínas e RNAs presentes nesses exossomos.