



Evento	Salão UFRGS 2018: SIC - XXX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2018
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Isolamento e caracterização de exossomos excretados por ADSCs
Autor	DEBORAH DA CRUZ SCHAFHAUSER
Orientador	FATIMA THERESINHA COSTA RODRIGUES GUMA

Isolamento e caracterização de exossomos excretados por ADSCs

Deborah da Cruz Schafhauser, Fátima Costa Rodrigues Guma
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução: As células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSCs) 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. Exossomos são partículas que contêm moléculas bioativas que fazem parte da rede de comunicação célula-a-célula. Seu conteúdo depende da célula de origem e pode ser influenciado por um estresse fisiológico, como infecção. O estado de hipóxia consequente de isquemia focal cerebral provoca uma condição neurodegenerativa severa que, dependendo da área acometida, pode impedir uma variedade de funções cognitivas e motoras. Pesquisas utilizando exossomos liberados por células tronco têm apresentado resultados positivos para a regeneração tecidual em situações de isquemia. Um protocolo eficiente de isolamento dos exossomos assim como sua caracterização é o objetivo desse trabalho. **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. Para o isolamento dos exossomos, as culturas foram mantidas por 48h em meio DMEM sem soro, para evitar contaminação da amostra com exossomos provenientes do SFB. Antes da coleta do meio, as culturas foram submetidas a choques mecânicos (batidas) para facilitar a liberação dos exossomos. A pureza, a concentração (por conteúdo proteico) e as características das populações (tamanho x número e potencial zeta) da fração exossomal foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET), método de Lowry modificado e pelo aparelho Zetasizer -zs90, respectivamente. Ensaio para lipidômica estão sendo realizados por cromatografia em camada delgada (TLC), sendo o conteúdo lipídico obtido pela partição de Folch. 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. **Resultados:** A melhor confluência para o isolamento foi a de 80% que corresponde a aproximadamente 4×10^5 células em 25 cm². O protocolo de isolamento de exossomos estabelece centrifugações seriadas do sobrenadante: primeiro a 400 xg por 5 minutos para retirada de células, então 2000 xg por 10 minutos para retirada de debris celulares e a 10.000 xg por 30 minutos a fim de retirar vesículas apoptóticas e organelas. Só então o sobrenadante é submetido a duas ultracentrifugações de 104.000 xg por 2 horas, nas quais se obtém pellets de exossomos. Os pellets são ressuspensos em PBS (Phosphate buffered saline powder, pH 7.4). A análise por MET confirmou a pureza e eficácia do método de isolamento, assim como os outros métodos mostraram o tamanho médio dos exossomos em 100 nm, condizente com os dados da literatura. Também foi observado que 6×10^7 células secretam, em 48h, 1µg/µl de proteína exossomal. Os ensaios de lipidômica realizados até o momento mostraram que os principais lípidos encontrados nos exossomos foram o colesterol e a fosfatidilcolina. No momento estamos realizando experimentos para determinar uma quantidade de amostra, para submeter a partição, que possibilite uma clara visualização de todos os componentes da lipídicos presentes.