

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA**

Microscopia Confocal *in vivo*: estabelecimento da técnica de *time lapse* para a análise da captação de vesículas extracelulares liberadas por células tronco mesenquimais em cultura de células

Graduando: Diego Amaral Muszinski

Orientadora: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Coorientadora: Francieli Rohden

Porto Alegre, 2018

Locais de realização do projeto:

1 - Centro de Microscopia e Microanálise (CMM), UFRGS.

2 - Laboratório 21 do Departamento de Bioquímica, UFRGS.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
AGRADECIMENTOS	6
INTRODUÇÃO	7
<i>TIME LAPSE</i>	7
MICROSCÓPIO CONFOCAL.....	9
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	12
VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)	13
JUSTIFICATIVA	16
OBJETIVO	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
CÉLULAS	18
PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRA CELULARES.....	19
IMAGEM ESTÁTICA (<i>in vitro</i>)	19
IMAGENS DA CÉLULA <i>IN VIVO</i> (<i>time lapse</i>)	20
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

RESUMO

Introdução: durante décadas, a única solução para estudar o comportamento de certos componentes celulares, foi pelo isolamento por fracionamento e purificação. Ou ainda através da fixação da célula num momento fisiológico completo, para poder aplicar diferentes técnicas de estudo. No entanto, dessa forma não é possível observar de forma direta, como os componentes celulares interagem entre si, ou a interação célula-a-células. Atualmente é possível o estudo da “célula viva”, e isso está para revolucionar e alterar os conceitos clássicos da biologia celular a uma grande velocidade. Objetivo: o objetivo deste estudo foi estabelecer as condições ideais para o estudo da captação e internalização de vesículas extracelulares por diferentes linhagens celulares utilizando técnicas de microscopia confocal em tempo real (*time lapse*). Método: utilizamos a técnica *time lapse* através da microscopia confocal para analisar as interações de células com vesículas extracelulares coletadas de células-tronco mesenquimais. Resultados: após fazermos imagens estáticas (*in vitro*) comprovamos que as vesículas extracelulares são internalizadas e, a partir de então, estabelecemos as técnicas e parâmetros para observar esse movimento. A partir de 2 h de incubação com as VEs verificou-se a presença das mesmas na região perinuclear. Através de microscopia *time lapse (in vivo)* observamos que a captação das VEs é muito rápida e ocorre nos primeiros minutos de incubação. Conclusão: neste estudo mostramos que para a visualização de células *in vivo* é importante determinar as condições ideais de incubação, estabelecendo o tempo de exposição e a intensidade do laser, assim como a frequência da captura das imagens para minimizar ao máximo o dano celular e o desaparecimento da fluorescência. Com base nesse estudo podemos estabelecer os parâmetros para analisar as células em tempo real.

Palavras-chave: *time lapse*, confocal, células-tronco mesenquimais, vesículas extracelulares, *in vivo*.

ABSTRACT

Introduction: for decades, the only solution to study the behavior of certain cellular components was by fractionation isolation and purification. Or even by fixing the cell at a complete physiological moment, in order to be able to apply different techniques of study. However, in this way it is not possible to directly observe how the cellular components interact with each other, or the cell-to-cell interaction. It is now possible to study the "living cell", and this is to revolutionize and change the classical concepts of cell biology at a great speed. Objective: The purpose of this study was to establish the ideal conditions for the study of the uptake and internalization of extracellular vesicles by different cell lines using real time confocal microscopy techniques (time lapse). Method: We used the time lapse technique through confocal microscopy to analyze the interactions of cells with extracellular vesicles collected from mesenchymal stem cells. Results: After making static images (in vitro) we verified that the extracellular vesicles are internalized and, from then on, we established the techniques and parameters to observe this movement. After 2 h of incubation with the VEs the presence of the same ones in the perinuclear region was verified. Through time lapse microscopy (in vivo) we observed that the uptake of VEs is very fast and occurs within the first few minutes of incubation. Conclusion: In this study we showed that for the visualization of cells in vivo it is important to determine the ideal conditions of incubation, establishing the exposure time and laser intensity, as well as the frequency of image capture to minimize cell damage and disappearance of fluorescence. Based on this study we can establish the parameters to analyze the cells in real time.

Keywords: time lapse, confocal, mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, in vivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Fátima Guma, que teve muita paciência em me orientar nesse trabalho, e também a professora Francieli Rohden, que além de coorientadora, me acompanhou em todos os experimentos. Obrigado por idealizarem este projeto e me ajudarem a desenvolvê-lo. Agradeço também, aos técnicos e colegas do Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS e aos colegas do laboratório 21 do departamento de bioquímica da UFRGS.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Clair, e aos meus irmãos, que me incentivaram e apoiaram em todo o momento durante a graduação.

Agradeço a namorada Deborah, pelo companheirismo, ajuda nos estudos e realização dos trabalhos.

Agradeço aos professores, que sempre estiveram dispostos a ajudar e contribuir para um melhor aprendizado. Agradeço também a UFRGS por ter me dado as ferramentas que me permitiram chegar hoje ao final desse ciclo de maneira satisfatória.

Agradeço aos amigos, pela compreensão das ausências.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e fizeram parte dessa etapa decisiva em minha vida. Muito obrigado.

INTRODUÇÃO

TIME LAPSE

Microscopia *time lapse* é usada para se obter um melhor entendimento das funções biológicas através do estudo de dinâmica celular. São imagens gravadas em sequência e visualizadas em alta velocidade para reproduzir um acelerado processo microscópico. Essa técnica pode ser aplicada em qualquer objeto microscópico. Porém, materiais biológicos devem ser observados em um meio artificial. Dependendo da cultura celular, diferentes tipos de técnicas podem ser aplicados para as diferentes características celulares (CHANDLER & ROBERSON, 2009).

Os intervalos de tempo entre a captura de imagens podem ser configurados na câmera ou através de um *software* integrando microscopia e câmera. O processamento de imagem de eventos muito rápido demanda uma câmera de resolução temporal alta para capturar os detalhes (taxas de captura de 100 quadros/segundo ou mais), e uma sensibilidade alta para capturar um sinal suficiente em um intervalo muito curto de tempo. Detectores refrigerados limitam o ruído de fundo, de maneira que sinais fracos, como uma fluorescência de baixo nível, possam ser capturados com maior facilidade. No entanto, o processamento de imagem rápido em alta resolução pode ser limitado pelas capacidades de aquisição de dados. O processamento de imagem *time lapse* pode ser comprometido por alterações mínimas na instalação do microscópio (flutuações de temperatura, vibrações), que afetam o foco. No processamento de imagem de células vivas, fatores como o ambiente das células no microscópio (temperatura, pH, umidades), fotodegradação causada pela iluminação e fototoxicidade podem reduzir a qualidade da imagem, por causa dos danos causados à célula. A motilidade e a protuberância da célula também podem afetar o foco, um problema que pode ser resolvido ao capturar várias séries de imagens no plano Z usando técnicas confocais (PAWLEY, 2006).

O processamento de imagem *time lapse* pode ser aplicado a qualquer técnica de microscopia para capturar eventos dinâmicos. Ele é usado amplamente para capturar eventos biológicos na escala macroscópica e para eventos dinâmicos em

células vivas. Ele também é usado em ambientes industriais para estudar materiais, por exemplo em eventos de cristalização, teste de fadiga e erosão (INOUE, 2013).

Assim como, pode ser executado em qualquer sistema de microscopia que for capaz de acomodar uma câmera de processamento digital de imagem com uma capacidade de *time lapse*. Os parâmetros dessa técnica são um recurso de muitas câmeras digitais projetadas para a microscopia e de todos os sistemas confocais de processamento de imagem (INOUE, 2013).

Para aprimorar a visualização as células devem ser devidamente marcadas anteriormente. Mas, infelizmente, a maioria dos processos de marcação destrói as células. O desenvolvimento de métodos de marcação menos destrutivos e métodos sem marcação (onde seja possível visualizar células sem nenhum tipo de marcador), levou a que fossem observadas cada vez mais células vivas (PAWLEY, 2006).

Antes da introdução da microscopia de contraste de fase era muito difícil observar células vivas. Como as células são translúcidas se deve marcar as células para poder vê-las. Com a microscopia de contraste de fase foi possível observar as células em detalhes sem nenhum tipo de marcação. Essa técnica se tornou bem popular na microscopia *time lapse* (PAWLEY, 2006).

A microscopia de contraste não tem a capacidade de observar proteínas específicas ou outras estruturas que compõem o complexo maquinário das células. Marcadores fluorescentes sintéticos e orgânicos foram desenvolvidos, fazendo essas estruturas serem observadas através da microscopia de fluorescência. Porém, marcadores fluorescentes são foto tóxicos, invasivos e perdem a cor quando observados por um longo período de tempo. Por isso, técnicas não invasivas de contraste são usadas frequentemente como um complemento nas aplicações de imagem de células vivas em microscopia de fluorescência (PAWLEY, 2006).

A microscopia DIC (*Differential interference contrast*) baseia-se na interferência entre luz polarizada e é o método preferido para visualizar detalhes extremamente pequenos e objetos espessos. O contraste é gerado por diferenças entre o índice de refração do objeto e seu meio circundante. Em imagens DIC, os objetos parecem fazer sombra em um lado. A “sombra” representa principalmente uma diferença no índice de refração de um espécime em vez de sua topografia. A microscopia DIC define facilmente o contorno de grandes organelas, tais como o núcleo e os vacúolos. Além de ter uma aparência de “relevo”, uma imagem DIC é

uma fina *secção óptica*, ou camada, através do objeto. Assim, detalhes internos em amostras espessas podem ser observados em uma série dessas secções ópticas, e a estrutura tridimensional do objeto pode ser reconstruída pela combinação das imagens DIC individuais (LODISH et al, 2015).

MICROSCÓPIO CONFOCAL

Um microscópio Confocal é um tipo de microscópio ótico que se usa para observar preparados fluorescentes ou com propriedades reflexivas da luz com a qual a resolução das imagens obtidas é incrementada pela rejeição da luz de fora do plano de enfoque. Isto se faz mediante uma pequena abertura chamada comumente de “pinhole” situado em um plano conjugado da imagem e que se encontra antes do detector. A natureza de focar em diferentes planos do microscópio confocal o torna adequado para a obtenção de imagens em 3D (PAWLEY, 2006).

O microscópio Confocal *Laser Scanning Biological Microscope FV1000 Fluoview* da marca Olympus (Figura 1), é um microscópio de alta resolução que utiliza laser diodo de alta precisão e estabilidade que excita amostras fluorescentes em comprimentos de ondas específicos (405nm, 473nm, 559nm e 635nm), ele também possui o modo de observação DIC. Esse aparelho permite a estimulação simultânea de diferentes lasers para a observação de reações celulares. Sua alta performance para obter imagens rapidamente permite minimizar os danos aos organismos vivos e, ao mesmo tempo, capturar um grande número de informações relacionadas ao experimento. Imagens com células vivas são amplamente aprimoradas pela captura de difusão ou transferência de moléculas marcadas com fluorescência, ou ainda uma célula marcada especificamente com uma cor apropriada. Esse microscópio possui um acessório que reproduz as condições ideais de desenvolvimento das células a serem observadas (Figura 2). Com capacidade para manter a atmosfera e a temperatura usual para quaisquer organismos vivos (OLYMPUS).



Figura 1: Microscópio Confocal Olympus FluoView FV1000 pertencente ao CMM (acervo do autor).

Apesar do funcionamento do microscópio confocal ser semelhante ao do microscópio de campo amplo, a microscopia confocal possibilita aumentar o contraste da imagem. A técnica de microscopia confocal utiliza uma combinação de recursos de microscopia óptica aliada a princípios de computação, aquisição de sinal e processamento de dados. Aliado a um feixe laser para varrer a amostra. Transladando o ponto focal, produzido pela objetiva, mantendo a profundidade de foco é possível iluminar toda a superfície em estudo, ponto a ponto. A luz refletida na amostra retorna pelo mesmo caminho óptico até passar pela abertura circular. A luz proveniente do plano focal da imagem é detectada e os sinais gerados são processados com a finalidade de se construir uma imagem virtual da superfície varrida pelo laser (OLIVEIRA, 2012).

Através da Microscopia de Óptica de Fluorescência é possível visualizar moléculas específicas que fluorescem na presença de radiação excitante. A técnica pode ser usada para determinar a quantidade, distribuição e dinâmica de macromoléculas específicas em células, possibilitando o estudo de diversos mecanismos celulares. Geralmente, as amostras não são auto-fluorescentes e o uso

de corantes chamados fluoróforos (ou fluorocromos) é necessário para torná-las fluorescentes. Os fluoróforos são moléculas que absorvem fótons com energia de determinado espectro de excitação e re-emitem fótons com energia em determinado espectro de emissão (ou de fluorescência). Para realizar imagens de fluorescência deve-se saber selecionar corretamente o(s) fluoróforo(s), os filtros e iluminação adequada, além de avaliar corretamente a qualidade dos sinais de fluorescência. Deve-se também tentar evitar a fotodegradação, interrompendo a iluminação para a amostra nos momentos em que ela não está sendo observada (MURPHY, 2001).

O aparelho da Olympus ainda possui uma série de funcionalidades e diversas maneiras de aquisições de imagens. Para determinar a localização exata e a natureza das interações entre espécies moleculares específicas das células vivas, e poder, assim, observar se essas interações são em um mesmo compartimento subcelular (colocalização), existem algumas ferramentas a serem utilizadas, dentre elas o *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) e o *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP).

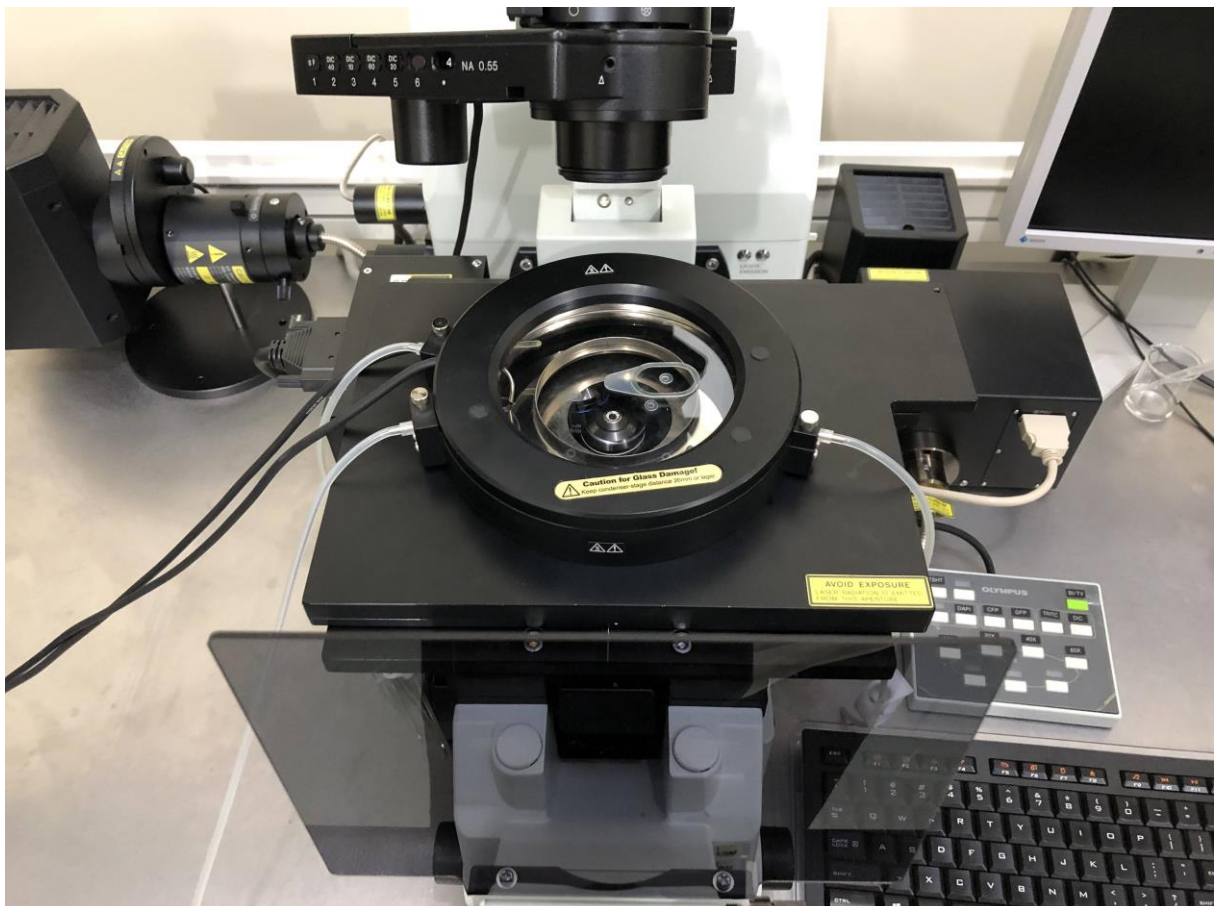


Figura 2: Aparato que mantém o ambiente ideal para o crescimento e desenvolvimento das células (acervo do autor).

FRET é um mecanismo de transferência de energia não radioativo entre duas espécies moleculares através do acoplamento entre os momentos dipolares que são gerados pela transição dos elétrons entre orbitais moleculares distintos. Esse mecanismo permite aumentar o limite de resolução do microscópio ótico que é de 250nm para entre 1 e 10nm. Para que ocorra FRET as espécies devem possuir superposição dos espectros de excitação de uma espécie e emissão da outra, seus dipolos de emissão e absorção devem estar orientados paralelamente e a distância entre as duas amostras deve ser menor de 10nm (OLYMPUS).

FRAP é a foto decomposição mediante a exposição ao laser e o monitoramento da recuperação da fluorescência. Este fotobranqueamento de um fluoróforo se deve a uma decomposição química da molécula induzida por radiação. A técnica de FRAP permite estimar a escala de tempo de difusão de uma proteína e também determinar a cinética envolvida nos mecanismos de transporte da proteína de interesse (OLYMPUS).

O desenvolvimento de microscópios cada vez mais avançados e de técnicas mais aprimoradas ampliam os limites da visão das células possibilitando, assim, observarmos com mais detalhes o comportamento das células e de como elas se comunicam em um meio artificial.

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *mesenchymal stem cell*) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea (MO), o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos. A MO constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais (MONTEIRO et al, 2009).

As MSC caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (PITTENGER et al., 1999). Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009).

Elas tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular.

Em condições adequadas de cultivo, as MSC exibem morfologia fibroblastoide, adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos (MENDELOW et al., 1980; PITTENGER et al., 1999; NARDI & MEIRELLES, 2006). Podem ser expandidas por mais de 40 gerações mantendo capacidade multipotente, embora reduzam as taxas de mitose e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico, nestas condições (DEANS & MOSELEY, 2000). As MSC expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (HUSS, 2000; BOBIS et al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (WAN et al., 2008; CAPLAN, 2009). Estudos tem mostrado que MSCs secretam moléculas bioativas, englobadas em microvesículas ou exossomos, que podem atuar com funções parácrinas ou endócrinas, agindo como mediadores que ativam direta ou indiretamente as células-alvo e/ou fazer com que as células vizinhas secretem agentes funcionalmente ativos (BERTINE MAH, SALDANHA-ARAUJO F, 2009).

VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

A terapia a base de MSCs tem se apresentado muito promissora, no entanto, ainda podem ocorrer algumas reações adversas, como possíveis reações imunológicas contra as MSCs enxertadas, bem como o desenvolvimento de tecido ectópico. Porém, pesquisas apontam para uma estratégia onde os benefícios da terapia com MSCs é aproveitado através de VEs derivadas dessas células (AKYUREKLI et al, 2015).

Foi recentemente demonstrado que VEs liberadas por MSCs, fazem parte de uma rede de comunicação célula-a-célula envolvida na regeneração dos tecidos (RATAJCZAK et al, 2006; CAMUSSI et al, 2006).

VEs são fragmentos liberados a partir da membrana plasmática de células viáveis ou danificadas, normais ou malignas, quando estas são submetidas a estados de ativação celular, os quais incluem crescimento e proliferação celulares,

ou ainda, ao processo de morte celular por apoptose. Essas estruturas vesiculares intactas são bastante heterogêneas em tamanho (seu diâmetro pode variar, sendo os exossomos de 0,03 a 0,1 μm e as microvesículas de 0,1 a 1 μm) e composição, sendo constituídas principalmente de diferentes lipídios e proteínas de membrana similares àqueles presentes na célula da qual se originam. Além disso, podem conter proteínas, RNA mensageiro (mRNA), micro RNA (miRNA), ou ainda, sequestrarem organelas inteiras como mitocôndrias (GYÖRGY et al, 2011).

Os exossomos são produzidos por uma via liso-endossômica. Isso envolve a invaginação da membrana plasmática para formar um endossomo intracelular, seguido por um brotamento para dentro do citoplasma para formar um endossomo multivesicular (MVE, do inglês *multivesicular endosome*) contendo múltiplas vesículas em seu interior (CHARRIN et al, 2014; KIM et al, 2015).

A formação de microvesículas ocorre diretamente na membrana plasmática através de um regulador de cálcio. Pouco é entendido sobre este processo, no entanto, há uma formação de microdomínios lipídicos quando a membrana é comprimida ou brotada (BAIG et al, 2013). As microvesículas formam uma população mais heterogênea de vesículas circulantes que carregam receptores e marcadores de superfície da célula parental. É provável que isso esteja relacionado ao seu papel na interação intercelular (PEREZ-HERNANDEZ et al, 2013).

As microvesículas brotam diretamente da membrana plasmática, enquanto os exossomos são representados por pequenas vesículas de tamanhos diferentes que são formadas por brotamento em endossomos iniciais e, por conseguinte, em MVEs. São, então, liberadas pela fusão dos MVEs com a membrana plasmática. Outros MVEs podem se fundir com lisossomos. O ponto de divergência entre esses tipos de MVEs é estabelecido nos endossomos iniciais, mas a existência de distintos endossomos iniciais que se alimentam nessas duas vias não pode ser excluída (Figura 3).

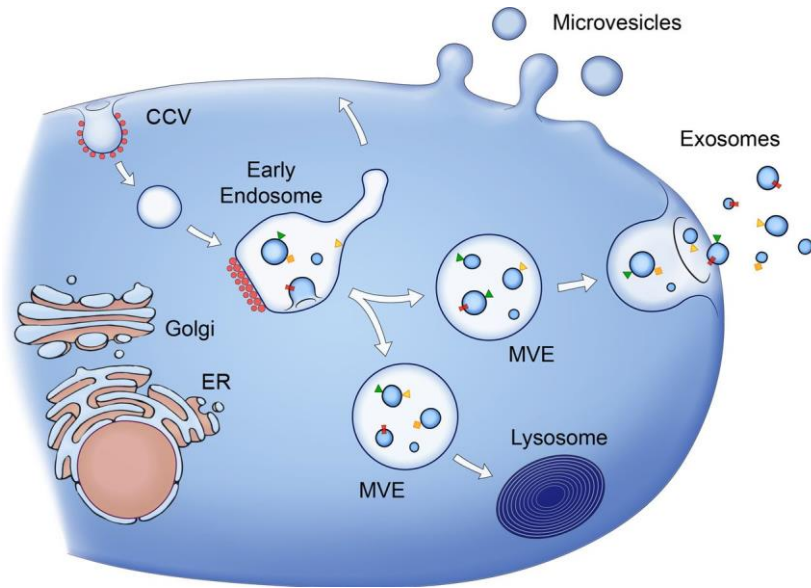


Figura 3: Vias de formação VEs: Manchas vermelhas simbolizam a clatrina associada a vesículas na membrana plasmática (vesículas revestidas de clatrina [CCV]) ou camadas de clatrina em endossomos. Proteínas associadas e transmembrana associadas à membrana nas vesículas são representadas como triângulos e retângulos, respectivamente. As setas representam as direções propostas de transporte de proteínas e lipídios entre organelas e entre MVEs e a membrana plasmática para secreção de exossomos (adaptado de RAPOSO & STOOBVOGEL, 2013).

Na comunicação intercelular, as VEs possuem papel fundamental no sistema de sinalização celular e são capazes de modificar a atividade das células alvo através de interações com receptores de membrana, transferência de proteínas, mRNA e miRNA. Esta sinalização é capaz de modular a angiogênese, proliferação celular e a regulação das reações imunológicas (CAMUSSI *et al*, 2010; LEE *et al*, 2013; CHEN, LI, CHEN, 2015).

JUSTIFICATIVA

Analisando os fatos acima mencionados, julgamos como de suma importância padronizar a técnica de *time lapse* para a análise da captação de VEs liberadas por células tronco mesenquimais por outros tipos celulares em cultura.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi estabelecer as condições ideais para o estudo da captação e internalização de vesículas extracelulares por diferentes linhagens celulares utilizando técnicas de microscopia confocal em tempo real (*time lapse*).

Específicos:

- Criar condições e tempo necessários para o crescimento e internalização de vesículas extracelulares nas células em estudo;
- Observar em experimento estático as células em diferentes tempos de crescimento;
- Elaborar um plano de observação das células em tempo real;
- Padronizar a técnica de microscopia confocal em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

CÉLULAS

Para a realização desse projeto utilizamos as linhagens celulares GRX e células do tipo glioma (C6). Essas células foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de estudos em diferenciação, proliferação e viabilidade celular, situado no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, coordenado pela professora Dra. Fátima Guma.

Em 1985, a linhagem celular contínua GRX, representante das células estreladas hepáticas, foi estabelecida a partir de lesões fibrogranulomatosas induzidas no fígado de camundongos por meio de infecção esquistossômica e suas características biológicas e bioquímicas foram determinadas. Ela se caracteriza por ser uma linhagem celular altamente prolífica que apresenta uma morfologia fibroblástica estrelada, poligonal ou alongada. Quando suas monocamadas são confluentes, as células agrupam-se em um padrão de crescimento bem delineado na forma de picos e vales (SANTOS et al, 2011).

A linhagem C6 foi desenvolvida por através da administração repetitiva de MNU (metilnitrosourea) em ratos Wistar-Furth adultos e compartilha várias características específicas do glioblastoma humano. Em termos genéticos a linhagem C6, assim como o GBM humano, apresenta altas taxas de mutação no gene supressor do tumor p16. A nível celular, apresenta necrose, polimorfismo nuclear e taxas de mitose elevadas. Em termos histopatológicos, apresenta características como invasão focal semelhante à infiltração padrão difusa observada no glioblastoma humano e expressão de marcadores histopatológicos como as proteínas S100B, e a vimentina (FARIAS, 2015).

PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRA CELULARES

As VEs foram obtidas de sobrenadante de culturas de células tronco adipo derivadas (do inglês: ADSCs - Adipose-derived Stem Cells) que foram obtidas do banco POIETICS. As ADSCs foram mantidas em cultura com meio DMEM, adicionado de 10% de soro fetal bovino a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. As células foram utilizadas entre as passagens 4 e 8. Quando as MSCs entrarem em confluência de 80%, o meio foi trocado e após 48 horas, este foi recolhido e acondicionado em tubos cônicos para o isolamento das VEs por ultracentrifugações.

Para o isolamento das VEs, os meios recolhidos foram centrifugados a 400x g durante 10 minutos seguido de 2000x g por mais 10 minutos e o sobrenadante mais uma vez foi centrifugado a 10.000x g por 30 minutos. Os sobrenadantes sem células foram ultra centrifugados a 120.000x g durante 120 minutos a 4° C, foram lavados com tampão salina (PBS), e então, submetidos a uma segunda ultracentrifugação nas mesmas condições. Depois de centrifugação adicional, as VEs foram então ressuspensas em 100µL de tampão PBS e congeladas a -20° C até sua utilização (LAVRENTIEVA et al, 2010). Ainda, antes de serem utilizadas nos experimentos, as VEs foram submetidas a marcação de superfície para que seja observada. Essa marcação foi feita pelo kit de ligação celular PKH26 (MINI26 Sigma) com emissão de fluorescência vermelha (amostra absorve a 559nm), seguindo o protocolo do fabricante, usado para marcar membranas celular de uma forma geral (TRINH et al, 2016).

IMAGEM ESTÁTICA (*in vitro*)

As células C6 foram plaqueadas sobre lamínulas. Para inibir o transporte intracelular elas foram incubadas por 15 minutos a 4°C. Depois foram incubadas por mais 15 minutos, também a 4°C, com as VEs marcadas previamente pelo kit de ligação celular PKH26 com fluorescência vermelha, seguindo o protocolo do fabricante. Ambas fixadas com paraformaldeído 4%. Em outras 3 culturas de células foi retirado o meio gelado e adicionado DMEM aquecido a 37°C juntamente com as

VEs coradas e incubados por 2, 18 e 24 horas, para então por último fixá-las e preparar as lâminas (Figura 4; IGLEISAS-BARTOLOMÉ et al, 2006). As células GRX também foram plaqueadas sobre lamínulas e passaram pelos mesmos passos que as células C6, porém, em tempos diferentes, de 20 minutos, 1, 2, 3 e 6 horas a 37°C.

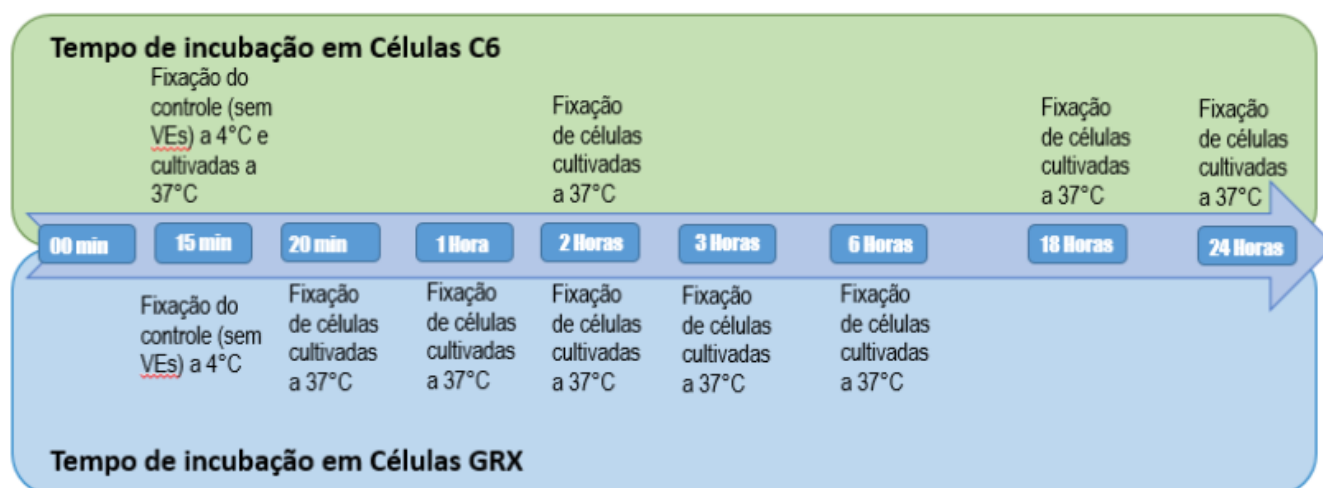


Figura 4: Linha do tempo de incubação das células. Representação dos diferentes tempos de incubação das células em meio de cultura. Todas as culturas passaram pela incubação de 15 minutos a 4°C e foram adicionadas VEs no tempo 0 minutos com exceção do grupo controle.

A marcação do núcleo foi feita com Hoetsch (corante que se liga ao sulco menor do DNA de cadeia dupla com uma preferência por sequências ricas em adenina e timina, são permeáveis às células e se ligam ao DNA em células vivas ou fixas [PORTUGAL & WARING, 1988]). As lamínulas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS e depois adicionado Hoetsch por 10 minutos. As lâminas foram montadas com meio DPX para observação em microscópio confocal. As imagens foram visualizadas em um Microscópio Olympus FV1000, equipado com lasers de 405, 473, 559 e 635 nanômetros e objetiva de imersão em óleo 63x e 1,35 de abertura numérica.

IMAGENS DA CÉLULA *IN VIVO* (time lapse)

Experimentos de *time lapse* foram realizados nas células GRX e células de glioma (C6). Essas culturas foram mantidas por 24 horas em *coverglass* (LabTek).

Após esse período as culturas foram incubadas com DMEM a 4° C durante 15 minutos. Após esse período de tempo, o meio foi removido e substituído com DMEM pré-aquecido fresco a 37°C com as VEs e a temperatura foi mantida até o final da experiência. As imagens confocais foram adquiridas no microscópio confocal FluoView™ FV1000 com lente objetiva de 63x e abertura numérica de 1,35 em óleo imersão.

RESULTADOS

A imagem 5 mostra somente as VEs coradas e fixadas em lâmina, além de comprovação do método de centrifugação essa imagem serviu de modelo para retirarmos o máximo de *background* (ruído de fundo) das amostras que viriam a ser analisadas posteriormente.

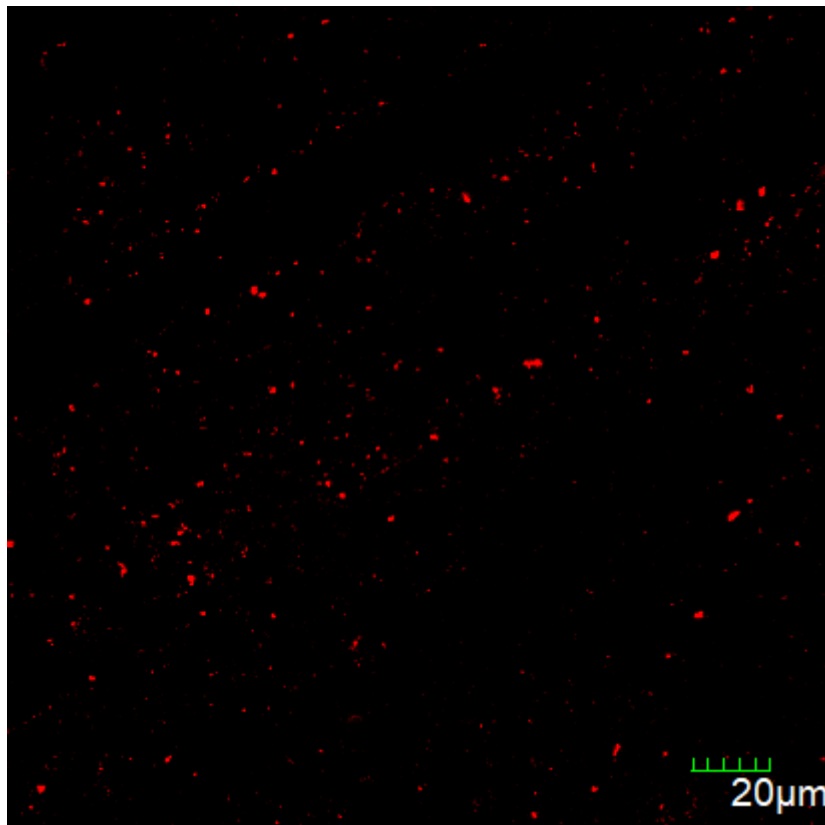


Figura 5: Imagem das VEs coradas e fixadas em lâmina.

É possível observar o acúmulo de vesículas em volta do núcleo das células C6, a partir de 2 horas (Figura 6). A projeção do plano Z comprova que as VEs estão no mesmo plano do núcleo (na cor azul, corado de Hoetsch) comprovando que elas foram internalizadas e estão no citoplasma (Figura 7).

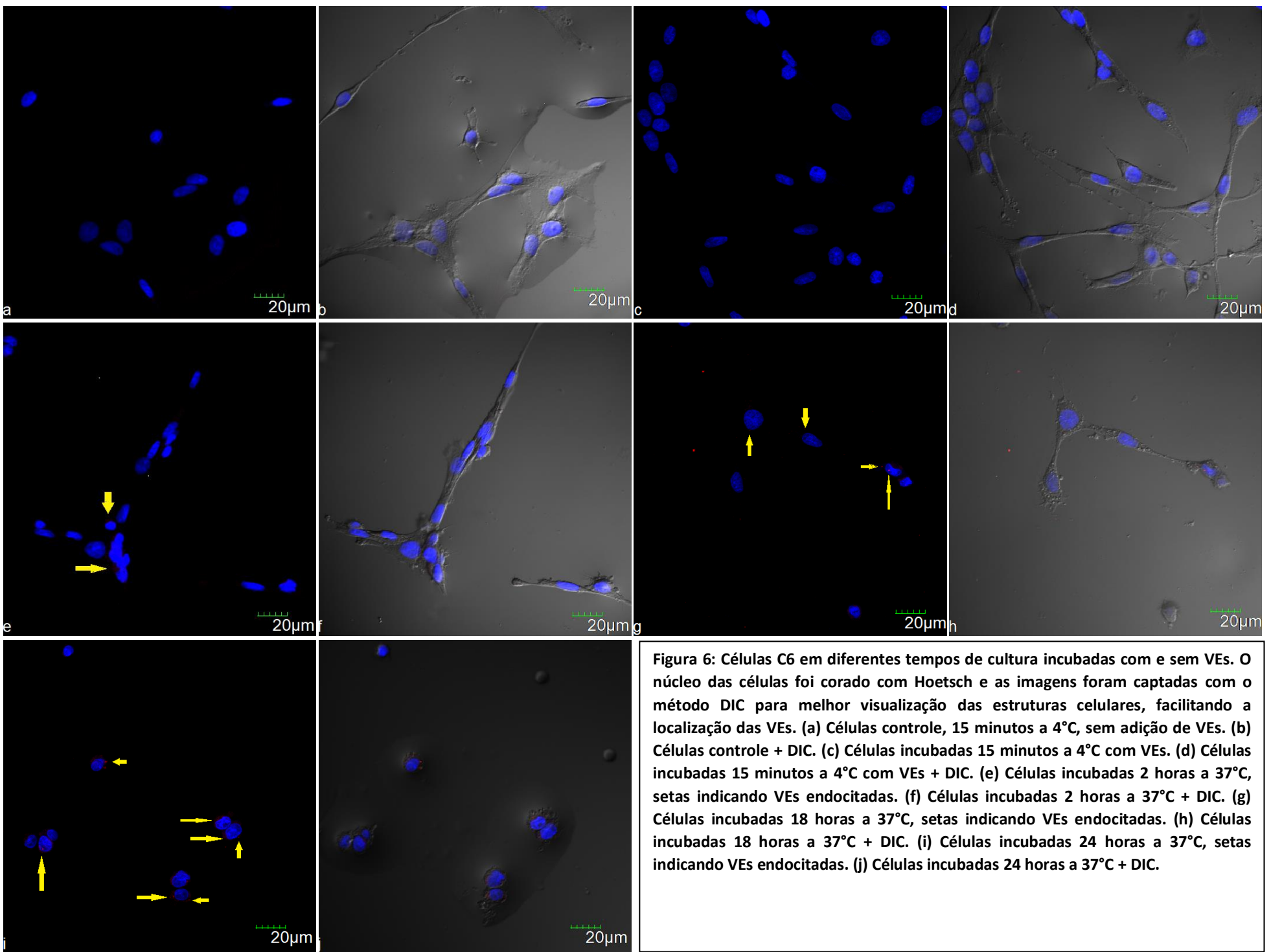


Figura 6: Células C6 em diferentes tempos de cultura incubadas com e sem VEs. O núcleo das células foi corado com Hoetsch e as imagens foram captadas com o método DIC para melhor visualização das estruturas celulares, facilitando a localização das VEs. (a) Células controle, 15 minutos a 4°C, sem adição de VEs. (b) Células controle + DIC. (c) Células incubadas 15 minutos a 4°C com VEs. (d) Células incubadas 15 minutos a 4°C com VEs + DIC. (e) Células incubadas 2 horas a 37°C, setas indicando VEs endocitadas. (f) Células incubadas 2 horas a 37°C + DIC. (g) Células incubadas 18 horas a 37°C, setas indicando VEs endocitadas. (h) Células incubadas 18 horas a 37°C + DIC. (i) Células incubadas 24 horas a 37°C, setas indicando VEs endocitadas. (j) Células incubadas 24 horas a 37°C + DIC.

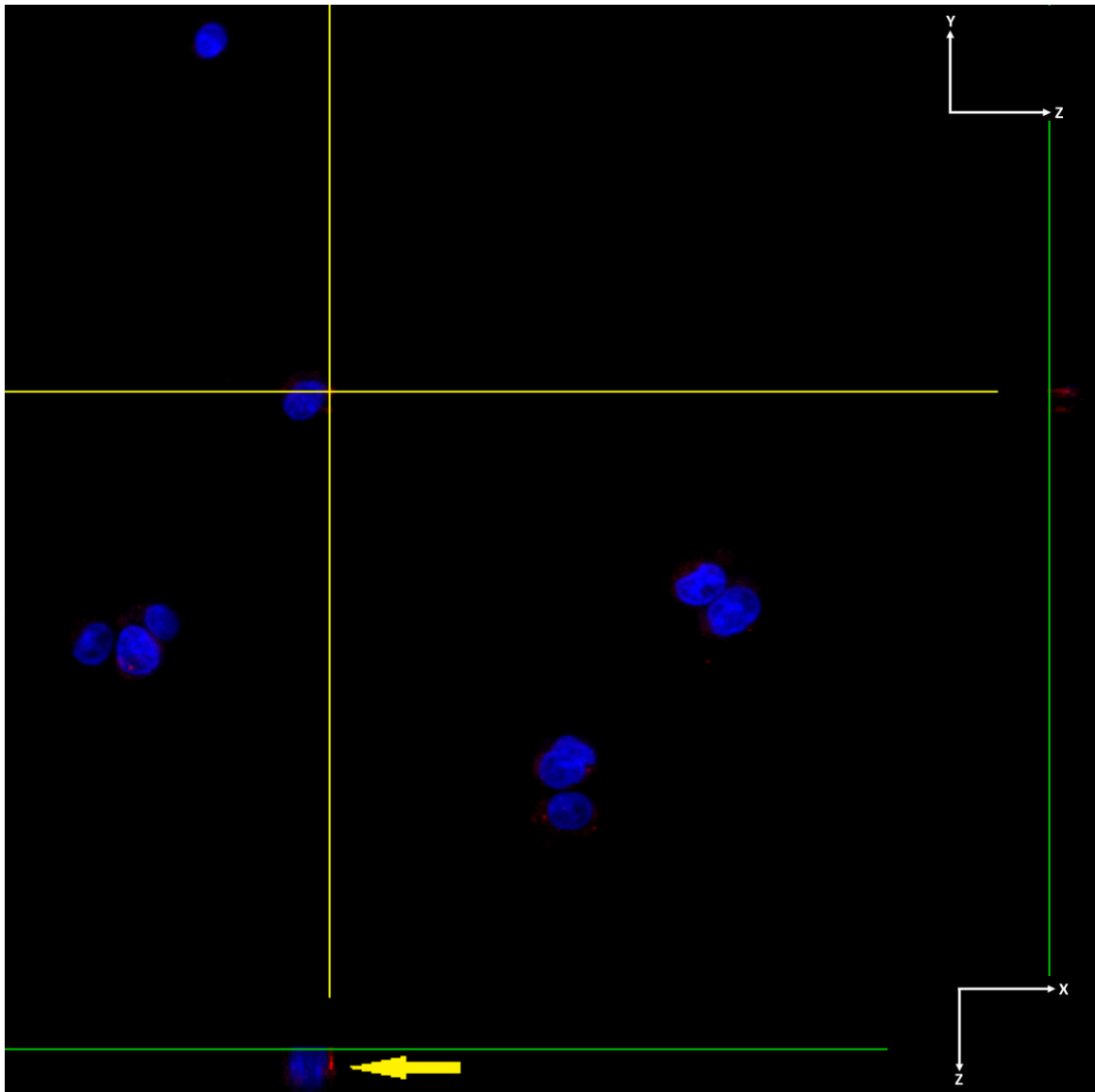


Figura 7: Projeção do eixo Z. Seta indicando a localização da VE no mesmo plano que o núcleo da amostra C6 24 horas em crescimento com VEs. No detalhe, abaixo (em relação ao plano X) e ao lado (em relação ao plano Y) na imagem, a representação do plano Z com 99 μ m de espessura mostrando a VE ao lado do núcleo celular.

Além disso, demonstramos que em outros tipos de células também há internalização das VEs. Observamos a internalização das VEs após 2 horas de incubação, por esse motivo testamos tempos diferentes (20 minutos a 4°C e 1, 2, 3 e 6 horas a 37°C) com a linhagem GRX (Figura 8).

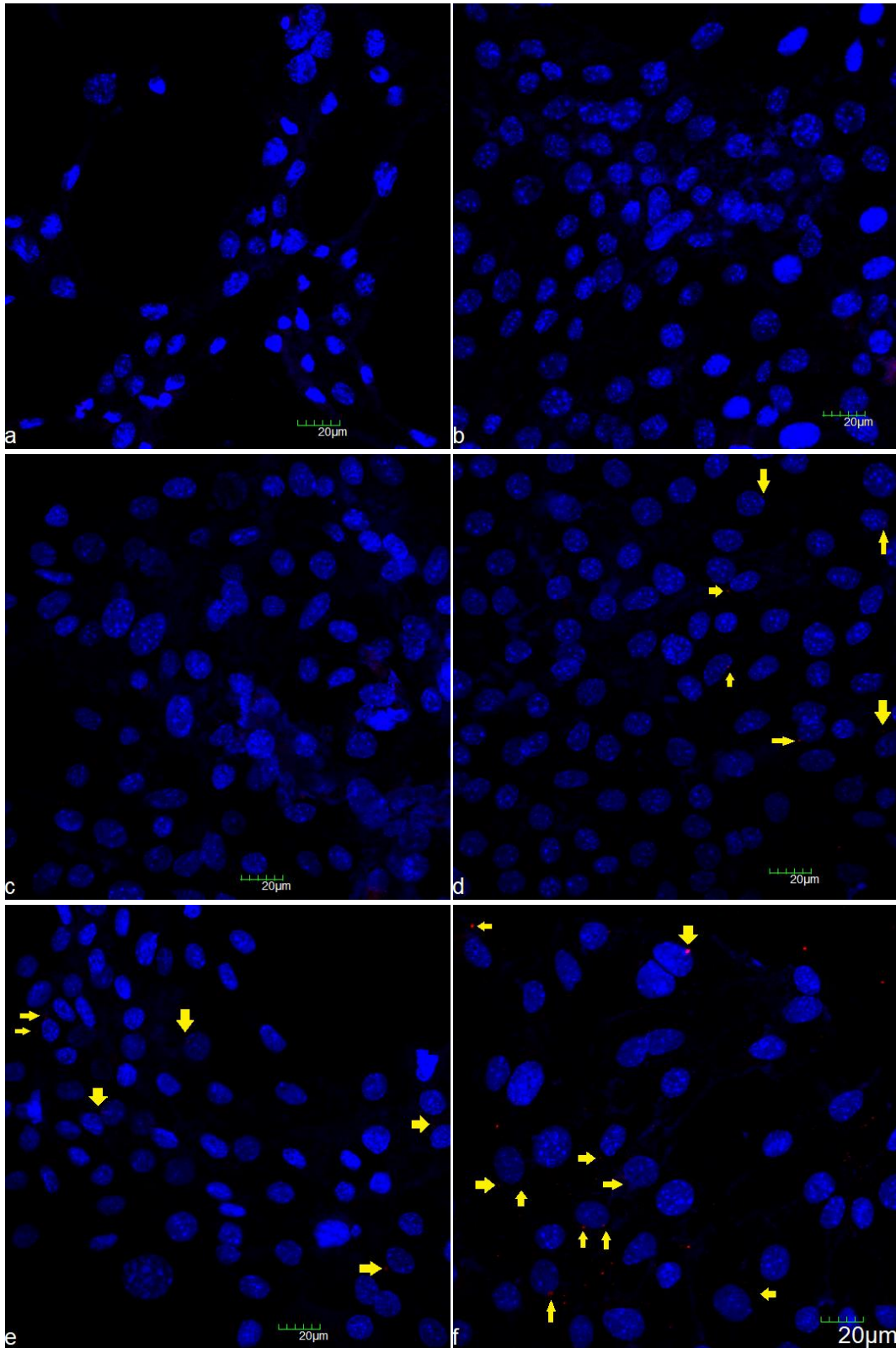


Figura 8: Células GRX em diferentes tempos de cultura incubadas com e sem VEs. O núcleo das células foi corado com Hoetsch e as imagens foram captadas com o método DIC para melhor visualização das estruturas celulares, facilitando a localização das VEs. (a) Células controle, 20min a 4°C, sem adição de VEs. (b) Células incubadas 20min a 4°C com VEs. (c) Células incubadas 1h a 37°C com VEs. (d) Células incubadas 2h a 37°C, setas indicando VEs endocitadas. (e) Células incubadas 3h a 37°C, setas indicando VEs endocitadas. (f) Células incubadas 6h a 37°C, setas indicando VEs endocitadas.

Na linhagem celular GRX, é possível observar que a partir de 2 horas existem algumas vesículas pontuais internalizadas e depois de 6 horas já há um número maior. Foi feita, então, uma projeção no plano Z das células GRX para melhor visualização da internalização (Figura 9), e as vesículas também aparecem no mesmo plano do núcleo.

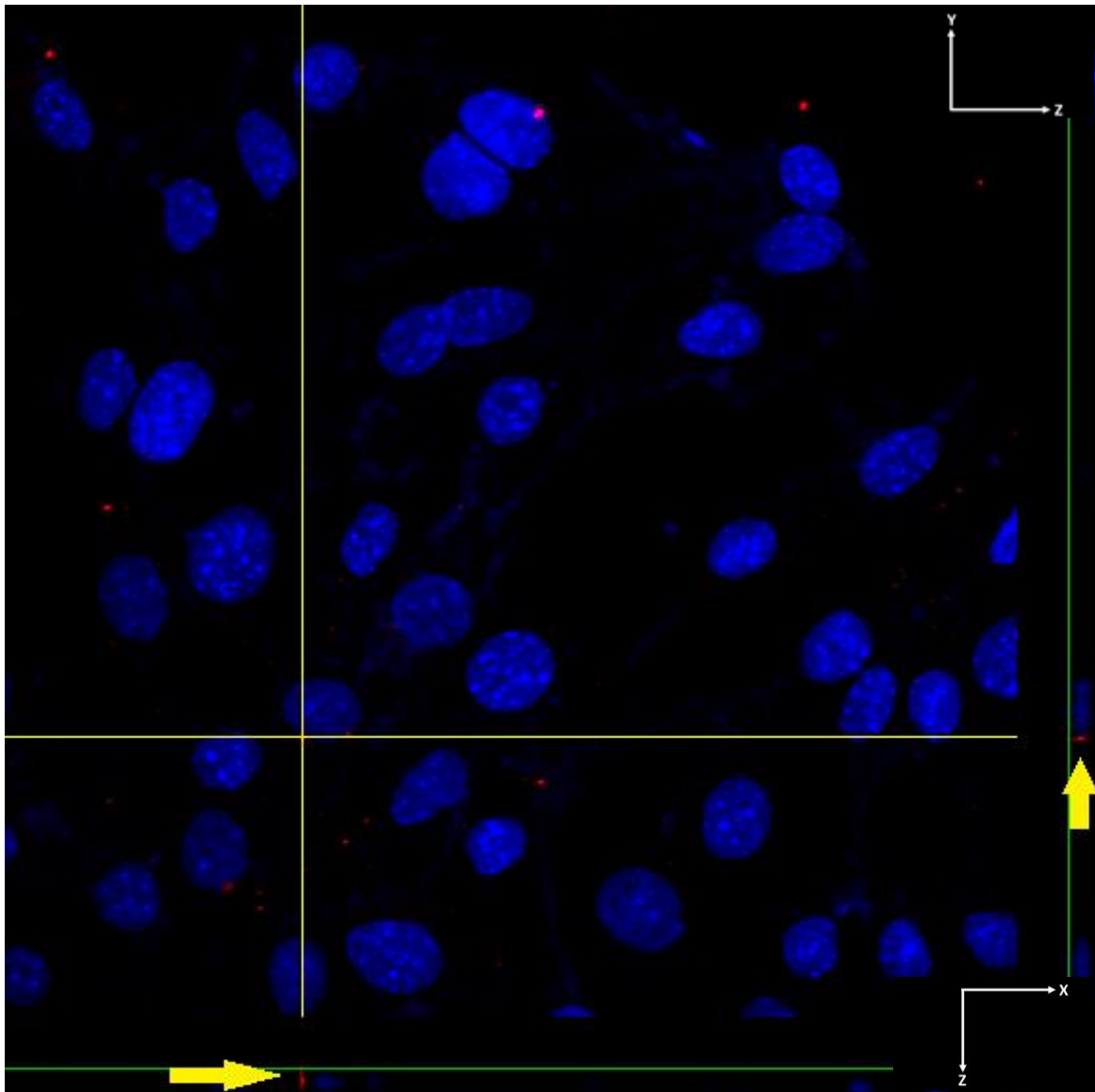


Figura 9: Projeção do eixo Z. Seta indicando a localização da VE no mesmo plano que o núcleo da amostra GRX 6 horas em crescimento com VEs. No detalhe abaixo (em relação a X), e lado direito (em relação a Y), na imagem a representação do plano Z com 59,4 μ m de espessura mostrando a VE ao lado do núcleo celular.

Após, a realização dos experimentos *in vitro* foi realizada a análise das células *in vivo* onde é possível observar as vesículas interagindo com as células e as próprias células interagindo entre si. Nesse experimente foram feitas várias imagens

em sequência, e dessas imagens geramos vídeos onde podemos acompanhar em tempo real todas essas interações, vídeos estes que estão disponíveis nos seguintes links do you tube:

- https://youtu.be/bx2IDX7wY_0
- <https://youtu.be/tlY-fNu22wY>
- <https://youtu.be/IR8LQCdaYIA>
- <https://youtu.be/SotRXPg7PcA>

DISCUSSÃO

Após todas as imagens analisadas podemos concluir que é possível realizar imagens em tempo real de células em meios de cultura, porém há muitos parâmetros para serem ajustados. O aparato utilizado nos microscópios da Olympus para o crescimento da célula funcionou muito bem, porém outros fatores parecem ter afetado o crescimento das células, como a exposição a luz. Depois de algumas horas realizando o experimento as células que estavam diretamente expostas à luz entraram em apoptose e as que não estavam expostas, em um mesmo meio de cultura, continuavam em crescimento.

Aconselhamos diminuir ao máximo a exposição à luz diminuindo a intensidade do laser e aumentando o HV (*high voltage*), mecanismo relacionado ao sistema de detecção de fótons do sistema, quanto maior mais sinal de fluorescência é capaz de coletar da amostra. Também foi observado que as VEs marcadas estavam diminuindo sua fluorescência com o tempo (*photobleaching*) e com aumento do HV esse problema é solucionado.

Foi demonstrado que há sim um grande número de VEs que entram nas células, com isso, ainda é preciso estudar os mecanismos que levam as VEs a entrarem nas células. Já vimos que as VEs não se fundem na membrana, mas sim, são endocitadas pelas células para então se concentrarem em volta do núcleo. Muitas questões ainda devem ser respondidas como: As VEs são liberadas no núcleo? Que função exercem na célula como um todo? Qual o conteúdo dessas VEs?

O estudo demonstrou que é possível realizar experimentos *in vivo* e abre caminho para que muitas outras interações e análises de células em tempo real e em ambientes ideais para o seu crescimento venham a ser feitas elucidando cada vez mais o mundo microscópico e os mecanismos das células.

REFERÊNCIAS

AKYUREKLI C, et al. A Systematic Review of Preclinical Studies on the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles. *Stem Cell Rev and Rep* (2015) 11:150–160. Doi: 10.1007/s12015-014-9545-9.

BAIG S, LIM JY, FERNADIS AZ, WENK MR, KALE A, SU LL, et al. Lipidomic analysis of human placental syncytiotrophoblast microvesicles in adverse pregnancy outcomes. *Placenta*. 2013;34(5):436-42.

BERTINE MAH, SALDANHA-ARAÚJO F. Biologia e uso clínico das células-tronco mesenquimais: uma revisão concisa. *Investigação*, v. 9, n. 2/3 (2009) 105-110.

CAMUSSI G, DEREGIBUS MC, BRUNO S et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010; 78: 838–848.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*, v.217, p.318-324, 2009. Disponível em: <http://www.ugr.es/~inmuno/Novedades/parolini/Caplan,_2009.pdf>. Acesso em: 23 set. 2018. doi: 10.1002/path.2469.

CHANDLER DE, ROBERSON RW. *Bioimaging: Current Concepts In Light & Electron Microscopy*. Jones & Bartlett Publishers (2009).

CHARRIN S, JOUANNET S, BOUCHEIX C, RUBINSTEIN E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 17):3641-8.

CHEN J, LI C, CHEN L. The Role of Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells in Lung Diseases. *BioMed Research International* Volume 2015, ID 985814, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/985814>.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, v.28, p.875-884, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VP8-4164V5V-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1022227845&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221>. Acesso em: 23 set. 2018. doi: 10.1016/S0301-472X(00)00482-3.

FARIAS AA. Análise da marcação de células da linhagem C6 de glioma com as lectinas vegetais CpL, WGA e Con A. Universidade Federal da Bahia (2015).

GYÖRGY B, SZABÓ TG, PÁSZTÓI M, PÁL Z, MISJÁK P, ARADI B, LÁSZLÓ V, PÁLLINGER E, PAP E, KITTEL A, NAGY G, FALUS A, BUZAS EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011, Aug68(16): 2667-88.

HUSS E. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem. *Stem Cells*, v.18, n.1, p.1-9, 2000.

IGLESIAS-BARTOLOMÉ R, CRESPO PM, GOMEZ GA, DANIOTTI JL. The antibody to GD3 ganglioside, R24, is rapidly endocytosed and recycled to the plasma membrane via the endocytic recycling compartment. *FEBS Journal* 273 (2006) 1744-1758.

IM H, SHAO H, PARK YI, et al. (2014). Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor. *Nature Biotechnology*. doi: 10.1038/nbt.2886. Epub ahead of print April 20, 2014.

INOUE S. *Video Microscopy*. Springer Science & Business Media (2013).

KIM DK, LEE J, KIM SR, CHOI DS, YOON YJ, KIM JH, et al. EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015;31(6):933-9.

LAVRENTIEVA A, et al. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Communication and Signaling* 2010, 8:18.

LEE J-K, PARK S-R, JUNG B-K, JEON Y-K, LEE Y-S, et al. (2013) Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Suppress Angiogenesis by Down-Regulating

LODISH H, BERK A, KAISER CA, KRIEGER M, BRETSCHER A, PLOEGH H, AMON A. *Biologia Celular e Molecular - 7ed* (2015).

MENDELOW B.D. et al. Characterization of bone marrow stromal cells in suspension and monolayer cultures. *British Journal of Haematology*, v.46, p.15-22, 1980. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/120729704/PDFSTART>>. Acesso em: 23 set. 2018. doi: 10.1111/j.1365-2141.1980.00015.x.

MONTEIRO et al. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural* (2009). ISSN 0103-8478.

MURPHY DB. "Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging". John Wiley & Sons. (2001).

NARDI NB, MEIRELLES LS. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v.174, p.249-282 (2006).

OLIVEIRA ARF. Desenvolvimento de um microscópio confocal de varredura laser para caracterização topográfica de superfícies. Universidade Federal de Uberlândia (2012).

OLYMPUS Corporation. Laser Scanning Biological Microscope FV1000 Fluoview manual.

PAWLEY J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, third edition (2006).

PEREZ-HERNANDEZ D, GUTIERREZ-VAZQUEZ C, JORGE I, LOPEZ-MARTIN S, URSA A, SANCHEZ-MADRID F, et al. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J Biol Chem*. 2013;288(17):11649-61.

PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/284/5411/143>>. Acesso em: 23 set. 2018. doi: 10.1126/science.284.5411.143.

PORTUGAL J, WARING MJ (Feb 28, 1988). "Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study". *Biochimica et Biophysica Acta*. 949 (2): 158–68. doi:10.1016/0167-4781(88)90079-6.

RAPOSO G & STOOORVOGEL A. The Rockefeller University Press *J. Cell Biol.* Vol. 200 No. 4 (373–383). www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201211138. Published Online: 18 February, 2013.

RATAJCZAK J, MIEKUS K, KUCIA M; et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006; 20: 847–856.

SANTOS N, et al. Suscetibilidade de uma linhagem celular murina contínua (GRX) à infecção viral. *Rev Pan-Amaz Saude* 2011; 2(2):65-69. Disponível em: <http://revista.iec.pa.gov.br>. doi: 10.5123/S2176-62232011000200009.

TRINH NT, et al. Microvesicles enhance the mobility of human diabetic adipose tissue derived mesenchymal stem cells in vitro and improve wound healing in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473 (2016) 1111e1118.

VEGF Expression in Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 8(12): e84256. doi: 10.1371/journal.pone.0084256.

WAN, C.D et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, v.7, p.29-33, 2008.