

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS DE CÉLULAS PRECURSORAS NEURONAIS HUMANAS LIBERADOS *IN VITRO*.

Priscila Elias Ferreira Stricker
priscilaeferreira@gmail.com
Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

RESUMO:

Introdução: As células-tronco mesenquimais (CTMs) possuem capacidade de auto renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares, e devido a estas características a sua aplicação para fins terapêuticos está sendo cada vez mais considerada. Além de se diferenciarem em grupos celulares relacionados a camada germinativa mesoderme, estas células também são capazes de dar origem a células da endoderme e da ectoderme. Considerando que a ectoderme resulta, entre outras estruturas, nas estruturas relacionadas ao sistema nervoso, as CTMs, tendo comprovação de capacidade de diferenciação neuronal, tornam-se um potencial tipo celular para uso em terapias neurodegenerativas. Outra célula de interesse deste estudo são as precursoras neuronais derivadas das CTMs e no que tange a sua obtenção passa pela formação das neuroesferas, um aglomerado de células, que é uma importante etapa facilitadora para a sua obtenção e expansão. Além disso, o potencial terapêutico das CTMs já é demonstrado em estudos pré-clínicos e clínicos. Evidências recentes sugerem que, provavelmente, o efeito terapêutico do transplante de CT não é devido a célula em si, mas sim aos efeitos parácrinos que estas células têm capacidade de causar. Acredita-se que estes efeitos parácrinos são causados pelo o que a célula libera no meio extracelular. Entre outros componentes liberados, estão os exossomos, que são um tipo de microvesículas, de tamanho entre 40-100nm, que possuem em seu interior proteínas e materiais genéticos (RNA mensageiro/mRNA e micro RNA/miRNA), com funções imunomoduladoras e de comunicação células a célula. Os RNAs podem ter função terapêutica, já que são materiais genéticos não codificadores e possuem papel na regulação pós-transcricional do metabolismo celular. Além disto, esse conteúdo genético pode servir como material de diagnóstico de algumas doenças, pois ele se difere na caracterização de determinados quadros clínicos.

Objetivo: O objetivo deste estudo é caracterizar RNAs não codificantes (mais especificamente os miRNAs) contidos nos exossomos isolados a partir do meio de cultivo das CTMs-GW e das células precursoras neuronais humanas.

Métodos: Isolamento das CTMs oriundas da Geleia de Wharton através da técnica de explant, estas amostras foram caracterizadas de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular por imunofenotipagem e diferenciação *trilineage*. Além disso, as precursoras neuronais foram produzidas a partir destas amostras com a semeadura de CTMs-GW em membrana *NPTX*. Essas amostras já possuem resultados preliminares de imunocitoquímica para as proteínas BTUB3, GFAP e NESTINA. O isolamento dos exossomos foi realizado a partir das CTMs utilizando a metodologia de precipitação e para a sua identificação foi utilizado o auxílio da citometria de fluxo para a identificação dos marcadores específicos (CD63, CD81 e CD9) de exossomos. A extração dos miRNAs realizada utilizando um kit específico para extração deste tipo de RNA.

Resultados: As amostras de CTMs tiveram sua pluripotência comprovada com a diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos (diferenciação *trilineage*). E apresentaram positividade na citometria de fluxo para os marcadores CD73, Cd90 e CD105 (>95%) e negatividade para os marcadores hematopoiéticos CD45 e CD34 (<2%). As precursoras foram produzidas satisfatoriamente a partir da semeadura das CTMs em *NPTX*. Como resultado preliminar da imunocitoquímica temos positividade das precursoras neuronais e CTMs para as proteínas BTUB3, GFAP e NESTINA. A padronização da citometria fluxo teve como resultado exossomos positivos para CD63 (47,01%), CD81 (93,92%) e CD9 (86,36%). A extração dos miRNAs a partir dos exossomos teve rendimento de 20ng/μL a partir de um *input* de amostra de 200μL.

Conclusão: i) À despeito destes resultados serem preliminares, os exossomos liberados pelas células-tronco mesenquimais foram identificados e obtido amostra de miRNAs, embora com baixo rendimento. ii) Será necessária à expansão de maior número de células tanto de CTMs como de precursoras neuronais visando maior rendimento de miRNAs para posterior comparação de dados obtidos dos miRNAs deste estudo com os presentes em Bancos de Dados ou mesmo na investigação de suas funções por testes *in vitro* serão realizadas e assim, poder-se-á intencional futuros ensaios pré-clínicos e/ou clínicos terapêuticos para estes exossomos.

PALAVRAS-CHAVE: Células-tronco mesenquimais, exossomos, micro RNA.

REFERÊNCIAS:

HU, G.; DRESCHER, K. M.; CHEN, X. Exosomal miRNAs/ biological properties and therapeutic potential. **Frontiers in genetics**, v. 3, p. 56, 2012.

PITTENGER, M.F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

YU, B.; ZHANG, X.; LI, X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4142-4157, 2014.