



EFEITOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS, PARTÍCULAS DE MEMBRANA E MEIO CONDICIONADO EM MACRÓFAGOS DE CULTURA PRIMÁRIA E DE LINHAGEM

Dienifer Hermann Sirena^{1,3} e Ana Helena da Rosa Paz^{2,3}

¹Graduada em Ciências Biológicas (UFRGS); ²Professora Adjunta do Depto de Ciências Morfológicas (ICBS-UFRGS); ³Centro de Terapia Gênica (HCPA)
dieni.ccp@gmail.com

INTRODUÇÃO

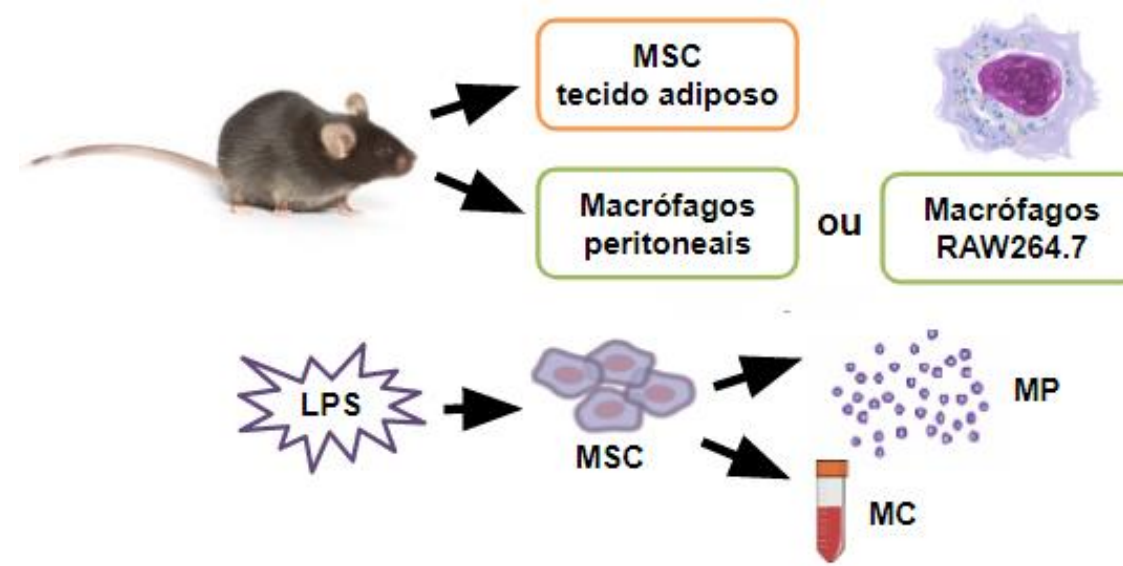
As células estromais mesenquimais (MSCs) são consideradas uma terapia promissora para o tratamento de desordens imunológicas e regeneração tecidual. Acredita-se que induzem a polarização de macrófagos pró-inflamatórios (M1) com morfologia arredondada para um fenótipo anti-inflamatório (M2) caracteristicamente com projeções.

Entretanto, há indicativos de que sua utilização pode apresentar riscos devido ao tamanho, ocorrendo aprisionamento nos microcapilares pulmonares. Nesse sentido, desenvolveu-se partículas de membrana a partir de MSCs lisadas visando uma nova estratégia terapêutica.

OBJETIVOS

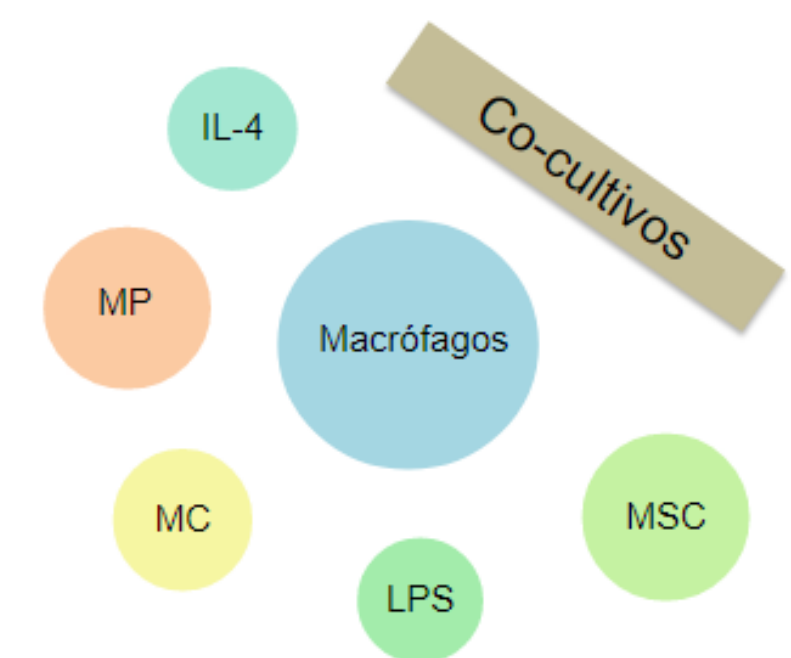
Avaliar os efeitos do meio condicionado, das partículas de membrana e das MSCs na polarização de macrófagos primários e de linhagem.

MATERIAIS E MÉTODOS



MSCs isoladas foram estimuladas com LPS, seu meio condicionado (MC) foi coletado, partículas de membrana (MP) foram geradas e depois medidas por Nanoparticle Tracking Analysis.

Os macrófagos, primários e de linhagem, foram co-cultivados por 24 horas em diferentes grupos: MØ (não estimulados); LPS (pró-inflamatório); IL4 (anti-inflamatório); CC (com MSCs); MC (com meio condicionado) e MP (com partículas de membrana), visando verificar sua polarização, morfologia, perfil anti-inflamatório e atividade de arginase.



RESULTADOS

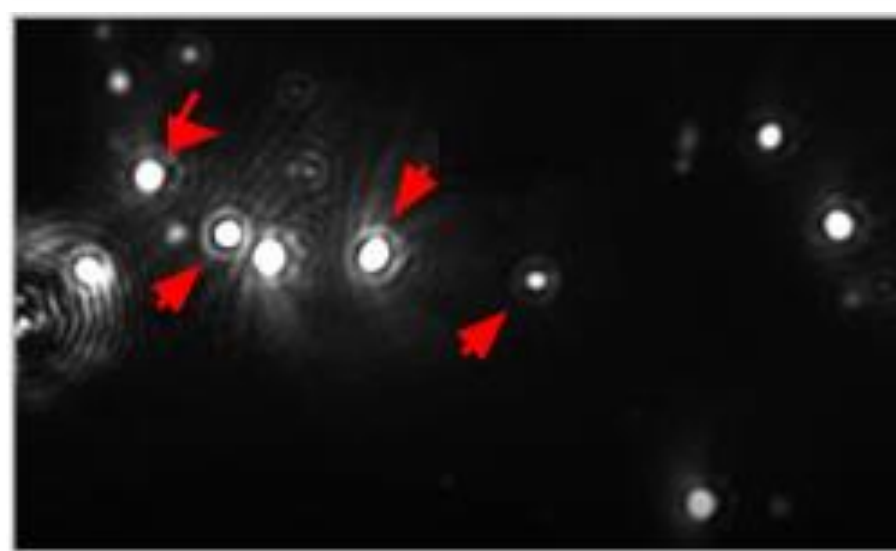


Figura 1: Imagem obtida através da câmera do equipamento Malvern NanoSight NS300® para obtenção do tamanho e contagem das partículas a partir das suas propriedades de espalhamento de luz e movimentos brownianos. → indicam as MP.

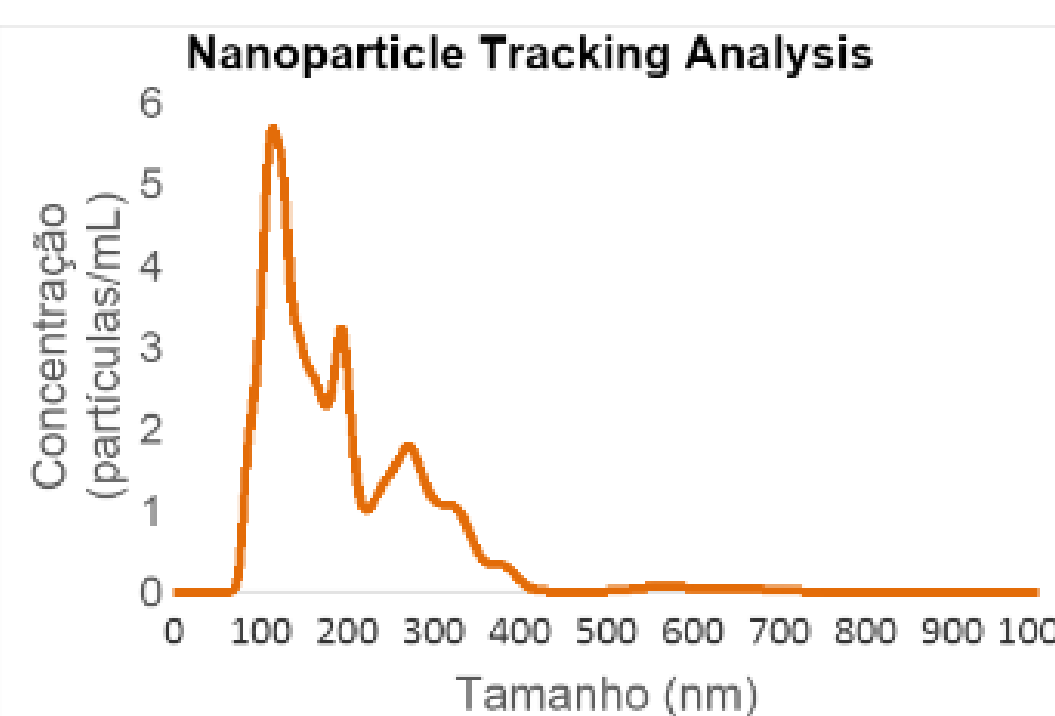
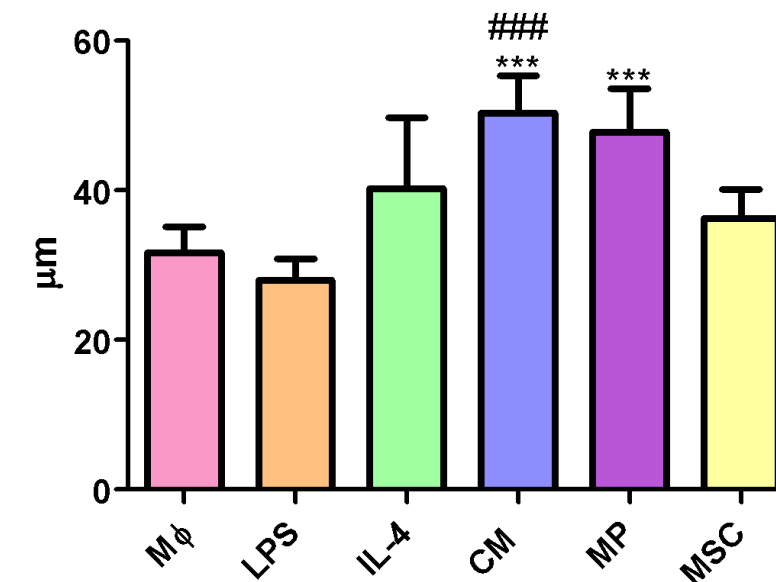


Figura 2: As partículas geradas revelaram um tamanho médio de 114 nm e concentração média de 6,24±08 por ml. Desta forma, em média, as partículas de membrana são cerca de 160 vezes menores do que uma célula-tronco mesenquimal íntegra.

Alongamento celular



Alongamento celular

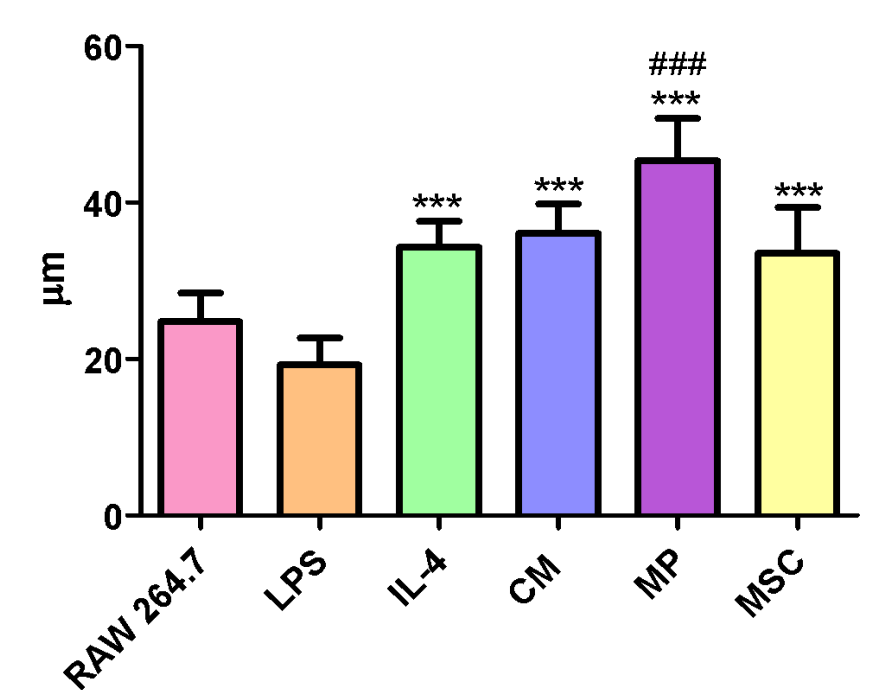


Figura 4: Morfologicamente, observou-se maior alongamento com projeções ($p < 0,05$) nos grupos IL4, MC e P de cultura primária, já em RAW 264.7 foram os grupos IL4, MC, CC e P. Entretanto, a área não apresentou diferenças em ambos métodos de cultura.

Citometria de Fluxo

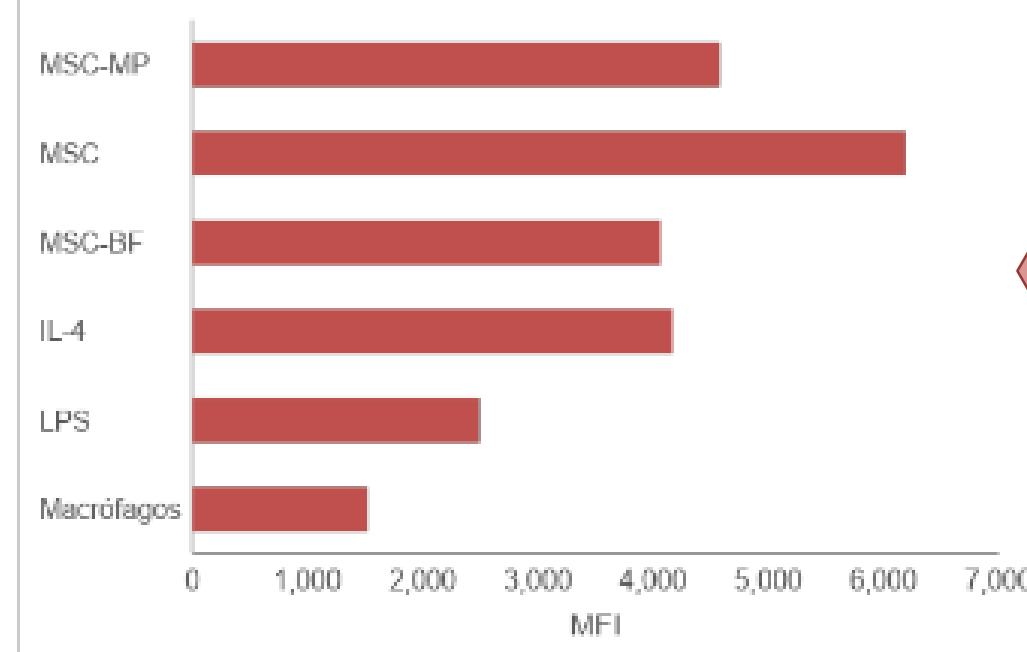


Figura 5: A expressão de CD206 apresentou os seguintes resultados de MFI: CC=6,195, P=4,582, MC=4,066 e IL-4=4.171, indicando que os efeitos da cultura celular são superiores ao comparar com IL-4, um conhecido indutor do perfil M2.

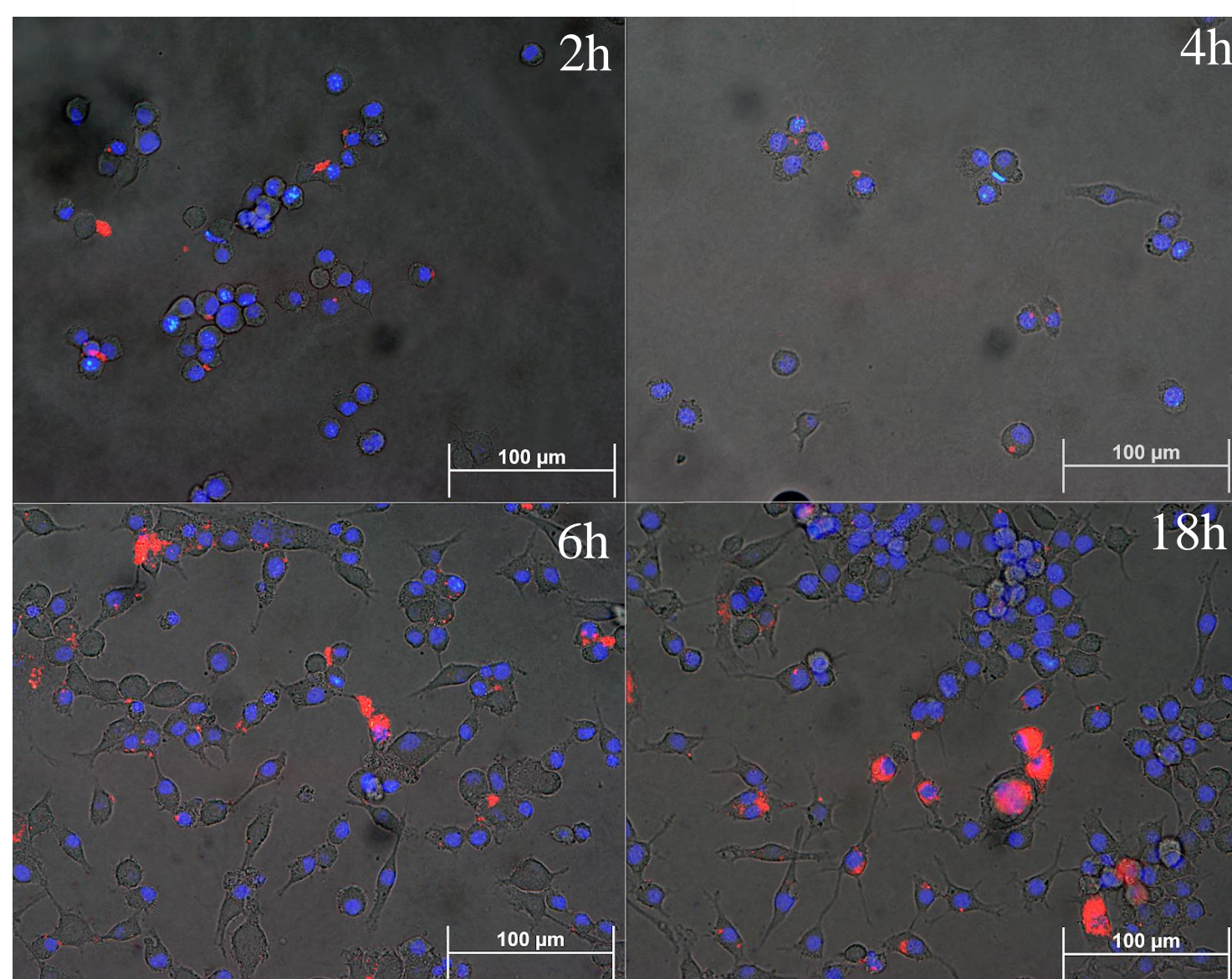
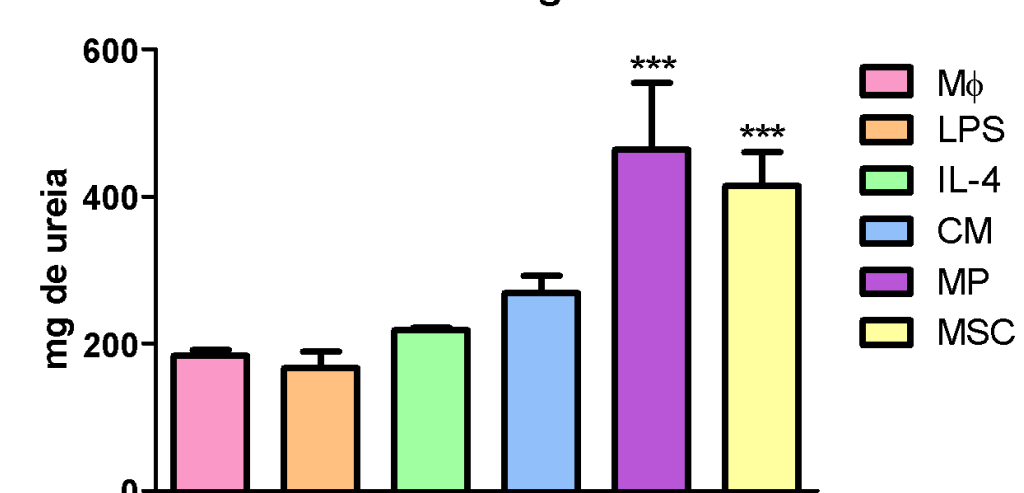


Figura 3: Com o ensaio de fagocitose, foi possível observar a internalização das MP (coradas com PKH26) pelos macrófagos RAW264.7 (núcleos corados com DAPI) a partir de 4h de co-cultivo, bem como sua mudança morfológica mais alongada, indicativo de perfil M2. Aumento de 40x.

Figura 6: As médias para atividade da arginase correspondem a 183,33 (MØ), 166,67 (LPS), 217,95 (IL-4), 269,03 (MC), 414,28 (CC) e 553,56 (P), o que comprova uma relação altamente positiva na polarização de macrófagos quando há contato entre as membranas celulares, sejam íntegras ou em partículas.

Atividade de Arginase



CONCLUSÃO

Foi possível verificar a polarização dos macrófagos e sua alteração morfológica nos diferentes tratamentos. As partículas de membrana de MSC mostraram efeito imunomodulador de macrófagos, fenômeno possivelmente associado a fagocitose. Nesse sentido surge a possível aplicação terapêutica das partículas de MSCs já que estas cumprem o papel de polarização para um perfil M2 e aparentam ser mais seguras do que a terapia celular convencional.