

AValiação DO EFEITO DO MEIO CONDICIONADO E DE PARTÍCULAS DE MEMBRANA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE A POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

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

¹Graduanda 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-tronco mesenquimais (MSCs) têm sido amplamente estudadas, pois são consideradas uma terapia promissora para o tratamento de distúrbios imunológicos e regeneração tecidual. Acredita-se que essas células induzem a polarização de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório (M2).

Sua utilização como terapia celular pode apresentar riscos devido ao seu tamanho (>20µm), ocorrendo seu aprisionamento nos microcapilares pulmonares. Portanto, desenvolveu-se partículas de membrana a partir de MSCs lisadas como uma nova estratégia terapêutica.

OBJETIVOS

Avaliação dos efeitos do meio condicionado, das partículas de membrana e das MSCs na polarização de macrófagos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para os experimentos foram utilizadas MSCs do tecido adiposo epididimal e macrófagos peritoneais coletados de camundongos C57BL/6 machos, de acordo com o diagrama ilustrado na figura 1.



Figura 1: Esquema representando as etapas de coleta, cultivo e expansão de MSCs do tecido adiposo epididimal e macrófagos peritoneais de camundongos. As MSCs foram estimuladas com LPS, seu meio condicionado coletado e as partículas de membrana foram geradas por lise celular e ultracentrifugação e seu tamanho medido por *Nanoparticle Tracking Analysis*. Os grupos experimentais foram: **MØ** (controle total); **LPS** (macrófagos + LPS, ambiente pró-inflamatório); **IL-4** (macrófagos + IL-4, ambiente anti-inflamatório); **CC** (macrófagos + MSCs); **MC** (macrófagos + meio condicionado) e **P** (macrófagos + partículas de membrana).

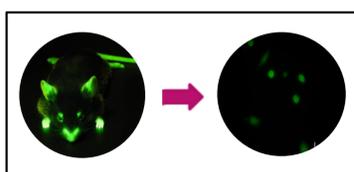


Figura 2: Foram coletados macrófagos peritoneais de camundongos GFP⁺ para posterior avaliação morfológica dos diferentes grupos experimentais.

A fim de verificar a polarização dos macrófagos, as culturas foram avaliadas para o marcador de perfil anti-inflamatório de macrófagos CD206 por citometria de fluxo com a utilização do parâmetro MFI (média de intensidade de fluorescência). Além disso, determinou-se a atividade de arginase com análise da concentração de ureia em espectrofotômetro.

RESULTADOS

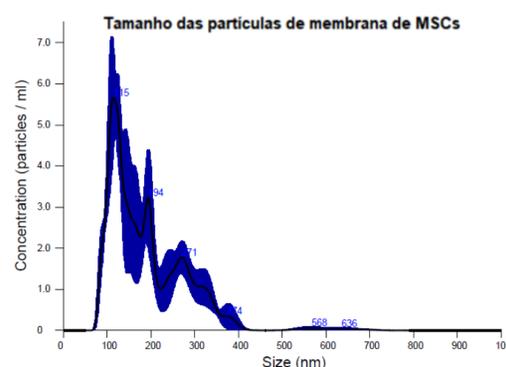


Figura 3: As partículas geradas revelaram um tamanho médio de 114 nm e concentração média de 6,24±08 por ml. Desta forma, em média, as partículas de membrana são cerca de 160 vezes menores do que uma célula-tronco mesenquimal íntegra.

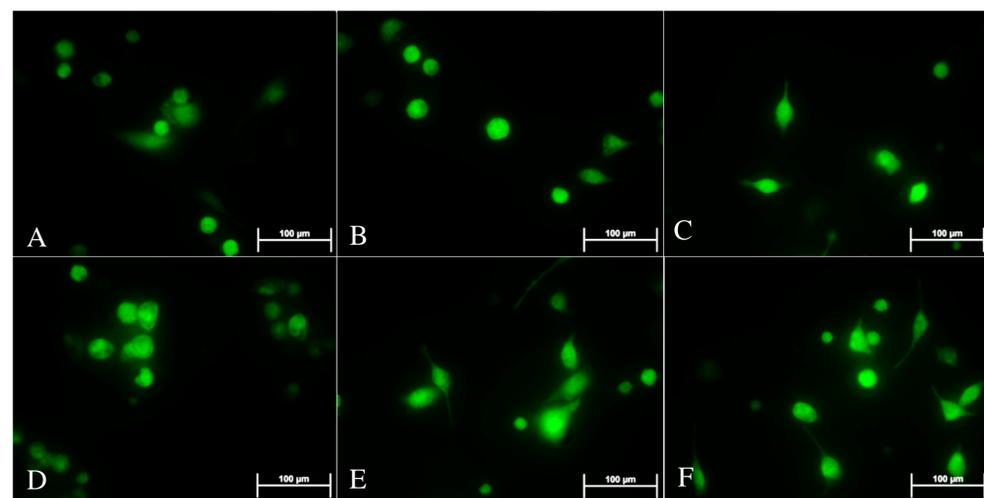


Figura 4: Morfologia dos macrófagos GFP⁺ dos diferentes grupos experimentais após 24h de cultivo. **A:** grupo MØ; **B:** LPS; **C:** IL-4; **D:** meio condicionado; **E:** MSCs e **F:** partículas de membrana. Pode-se observar diferentes morfologias, como: células arredondadas (característica de fenótipo M1) indicadas por asterisco (*) e células alongadas (fenótipo M2) indicadas por setas (→). Visualização em microscopia de fluorescência.

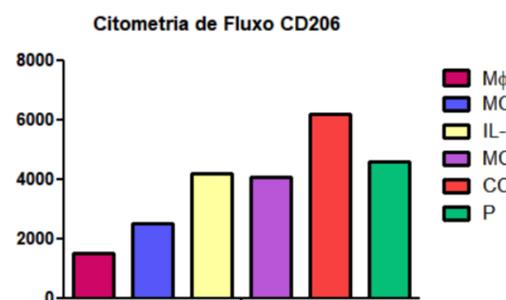


Figura 5: Gráfico dos valores médios de intensidade de fluorescência (MFI) para o marcador CD206, indicando que os efeitos do co-cultivo (com MSCs e MSC-P) são superiores em comparação ao IL-4, um conhecido indutor do perfil M2.

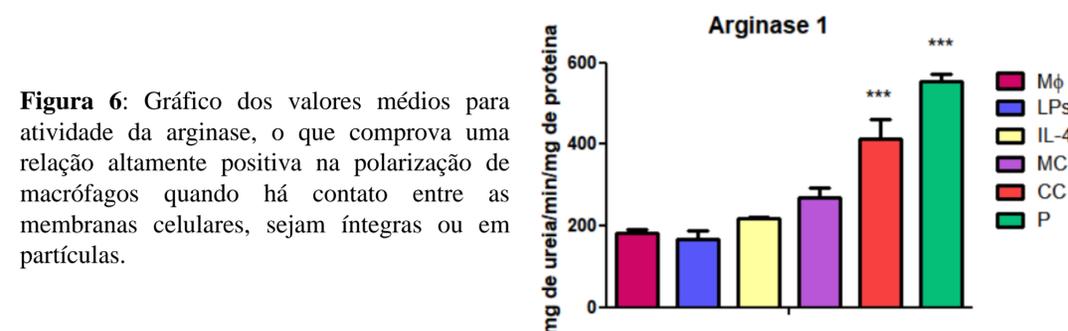


Figura 6: Gráfico dos valores médios para atividade da arginase, o que comprova uma relação altamente positiva na polarização de macrófagos quando há contato entre as membranas celulares, sejam íntegras ou em partículas.

CONCLUSÃO

Portanto, a partir dos dados expostos, pode-se inferir que o efeito na polarização de macrófagos para um fenótipo M2 está mais relacionado a uma interação célula-célula do que ao efeito do meio condicionado, o que demonstra a possível aplicação terapêutica das partículas de MSCs já que estas, por serem menores, possivelmente são mais seguras do que a terapia celular convencional, uma vez que evitam o aprisionamento nos microcapilares pulmonares.