



OTIMIZAÇÃO DE UM MÉTODO DE ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES A PARTIR DO SANGUE

Júlia dos Santos Barcellos

Orientador: Prof. Dr. Tiago Degani Veit
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INTRODUÇÃO

Vesículas extracelulares (VEs) possuem uma função importante na comunicação celular e podem ser determinantes para vários processos biológicos. Diversas células do corpo liberam VEs no espaço extracelular, carregando diversos tipos de biomoléculas como proteínas, lipídios e RNAs. VEs liberadas durante processos patológicos carregam várias moléculas que podem ser exploradas como biomarcadores. O isolamento de vesículas extracelulares a partir de fluidos biológicos é, portanto, de extrema importância para compreender sua função como fonte de biomarcadores de doenças. O isolamento das VEs a partir do sangue constitui-se em um grande desafio por tratar-se de um material biológico complexo, com vários contaminantes em potencial, como proteínas solúveis e diversos tipos de material particulado, tais como as lipoproteínas e agregados proteicos, o que pode atrapalhar a descoberta de biomarcadores associados às VEs. Diversos métodos já foram descritos para o isolamento de VEs a partir do plasma sanguíneo, incluindo ultracentrifugação, cromatografia de exclusão de tamanho e métodos baseados em imunoafinidade.

OBJETIVO

Otimizar e validar um protocolo de isolamento de vesículas extracelulares a partir do plasma e compará-lo quantitativamente e qualitativamente com métodos já estabelecidos, bem como e aprimorar técnicas para armazenamento de biomarcadores para futuras análises fisiológicas e patológicas.

METODOLOGIA

As VEs foram isoladas a partir do plasma sanguíneo usando-se um protocolo combinado - ultracentrifugação com gradiente de densidade (UC-GD) seguida de cromatografia de exclusão de tamanho (CET) - ou um protocolo de um único passo usando-se CET. Para a UC-DG, 5 mL de plasma foram colocados no topo de um gradiente com 50, 30 e 10 % ou 6% de iodixanol e submetidas a 110.000 g por 2,5h. Para a CET, 1 mL de plasma ou da nuvem de Evs coletada após a UC-DG (Figura 1 - esquerda) foram eluídos em uma coluna de 10 mL de Sepharose CL-2B usando-se PBS como eluente e 15 frações de 0,5 mL foram coletadas. A concentração de proteínas totais e quantidade de partículas das frações foram avaliadas pelos métodos de microBCA e NTA, respectivamente.

RESULTADOS

Em ambos os protocolos, a maioria das partículas isoladas concentrou-se nas frações 8, 9 e 10. O pico de partículas isoladas por CET foi observado na fração 10 ao passo que o pico de partículas observadas usando-se o método combinado foi na fração 9. Ambos os protocolos empregados para isolar as VEs a partir do plasma resultaram em isolados com baixo conteúdo proteico (frações positivas variaram de <2ug/mL até 20 ug/mL), separando eficientemente as VEs da maioria das proteínas plasmáticas. O emprego do protocolo de isolamento por CET resultou em um número muito maior de partículas (~20-40x maior) do que o protocolo combinado de UC-GD e CET (Figura 1 - direita). Isso é explicável pelo alto número de lipoproteínas plasmáticas contaminantes (principalmente quilomicrons e VLDL) que se são copurificadas com as VEs por apresentarem aproximadamente o mesmo tamanho das primeiras e, conforme a literatura, encontrarem-se em quantidade muito maior em relação às VEs.

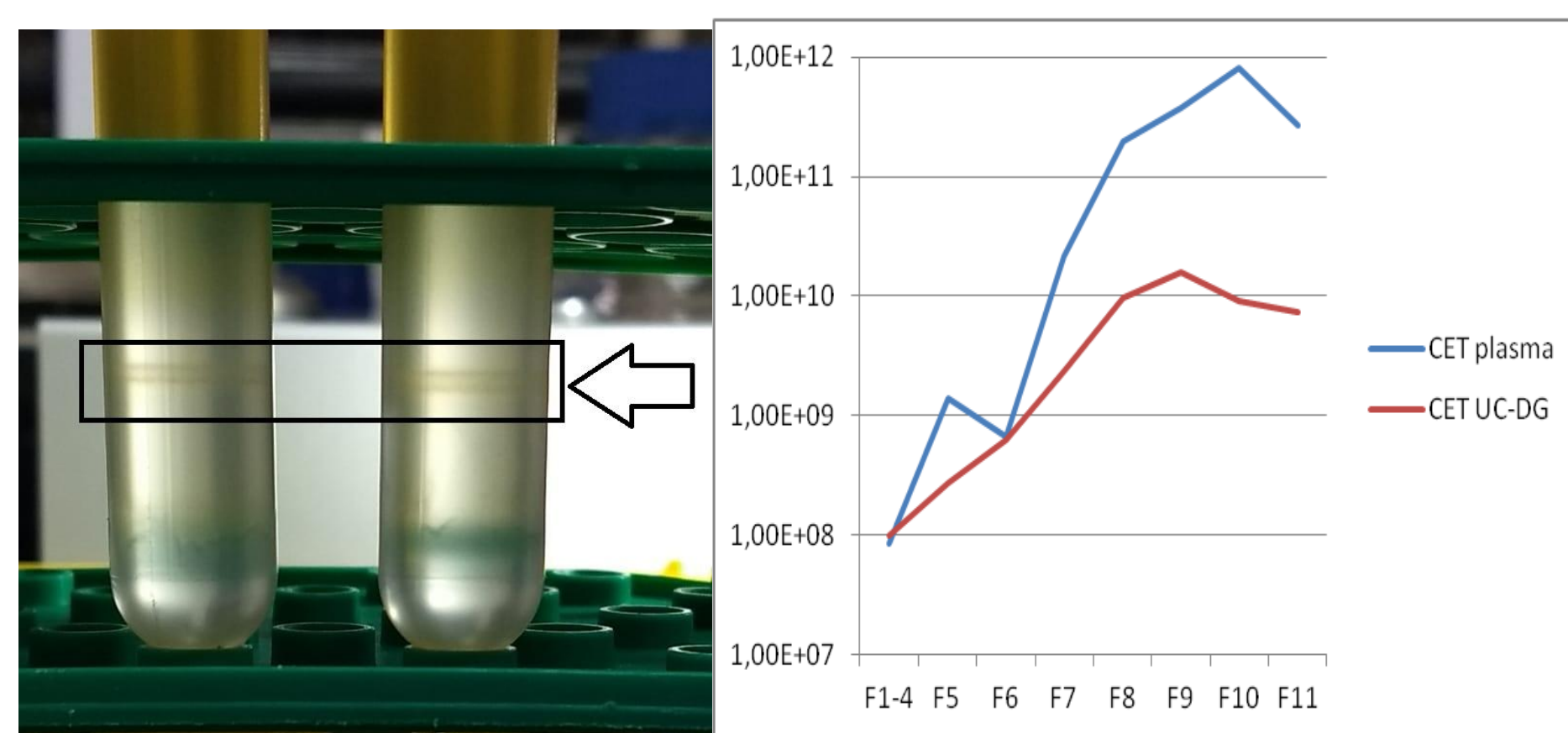


Figura 1. Gradiente de densidade após ultracentrifugação mostrando a nuvem de Ves (esquerda); gráfico mostrando a concentração de partículas nas frações coletadas na CET (direita).

CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que a técnica combinada de UC-DG e CET proporciona um isolado de VEs mais puro em relação ao protocolo de CET. Os próximos passos do estudo envolverão a avaliação de marcadores específicos de VEs como CD9, CD81 e CD63, bem como de potenciais contaminantes, como ApoA-1.