



ULTRACENTRIFUGAÇÃO PARA O ISOLAMENTO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES ORIGINADAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS HUMANAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Palavras-Chave: Exossomo, Vesículas Extracelulares, Células Mesenquimais Estromais

Autores/as:

Beatriz Fantoni – Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP

Larissa Lopes Rodrigues – Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP

Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques – Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Células tronco mesenquimais estromais (MSCs) são células adultas indiferenciadas que possuem alta capacidade de renovação. As MSCs vem sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças, como lesões teciduais ou degenerativas, por conta do seu potencial de regeneração (Banerjee et al. 2020). Entretanto, a segurança da aplicação clínica do transplante de células ainda é controversa. Como alternativa mais segura ao uso de MSCs e com resultados similares, testes vêm sendo realizados com vesículas extracelulares (EVs) derivadas dessas células (Fu et al. 2019; Hu et al. 2019). EVs derivadas de MSCs isoladamente replicaram os efeitos terapêuticos das MSCs mas ainda não há consenso entre protocolos utilizados para a obtenção dessas vesículas (Zhang et al., 2020). Existem vários protocolos de isolamento na literatura, como por exemplo Ultracentrifugação, Ultrafiltração, Cromatografias, Kits de isolamento, entre outros, cada um com sua particularidade, vantagens e desvantagens (Konoshenko et al. 2018). O mais utilizado nos artigos é o método de ultracentrifugação, que consiste no isolamento de partículas através de centrifugações com altas velocidades. Nesse método as células são primeiramente cultivadas num meio condicionado por um determinado tempo para liberar suas vesículas. O meio com as vesículas é coletado e passa por duas etapas para o isolamento das vesículas. Primeiramente é realizada uma centrifugação com força menor para eliminar células mortas e fragmentos celulares e em seguida, a ultracentrifugação propriamente dita para a precipitação e enriquecimento das vesículas extracelulares (Chhoy et al. 2021). Depois são ressuspensas e armazenadas para futuros experimentos. Nesta revisão compilamos informações sobre o método mais utilizado nos últimos 5 anos para o isolamento de EVs oriundas de MSCs, a ultracentrifugação, com o objetivo de compreender a dinâmica dos protocolos e evidenciar os parâmetros mais utilizados.

METODOLOGIA:

A busca na literatura foi realizada na base de dados PubMed. O período selecionado foi de 2015 até a data da busca (28/04/2021). As palavras-chave utilizadas foram “Exosome”, “Extracellular Vesicles”, “Mesenchymal Stem Cell” e “Mesenchymal Stromal Cell”. Um primeiro filtro foi realizado tendo como critérios de inclusão artigos com protocolos de isolamento de EVs originadas de MSCs de humanos; e critérios de exclusão artigos que não utilizaram protocolos de isolamento; que isolaram EVs de outros tipos celulares ou MSC de não humanos, revisões de literatura; cartas; relatos de casos; erratas; comentários pessoais; resumos; cartas ao editor. Os artigos selecionados nesse primeiro filtro foram separados por métodos de isolamento. O método que teve maior quantidade de artigos foi escolhido para a coleta de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A busca foi realizada no período de 5 anos, esse tempo foi definido pela baixa quantidade de artigos publicados sobre o assunto antes do ano de 2015, tendo um aumento significativo a partir de 2019. Iniciamos a revisão com 8105 artigos, os duplicados foram excluídos, assim, começamos a revisão com um total de 2858, destes 838 artigos foram selecionados e separados por métodos de isolamento de EVs de MSCs de humanos. A ultracentrifugação (UC) foi o método mais recorrente (574 artigos). A partir daqui elaboramos critérios de inclusão e exclusão para a coleta de dados. Os critérios de inclusão foram artigos que forneciam o maior número de informações sobre o protocolo, e os de exclusão, os que não tinham informações detalhadas; que rodaram a uma rotação inferior a 100.000g, ou que forneciam a informação velocidade em rpm; resultando em 420 artigos. Foram coletados os seguintes dados: ano de publicação do artigo; dados relacionados a cultura celular (quantidade de células, meio de condicionamento, tempo de cultivo); dados relacionados a UC (1 ou 2 rodadas, tempo, rotação, tipo de rotor, uso de algum filtro, temperatura); e dados relacionados a amostra final (ressuspensão final, temperatura de armazenamento, rendimento médio das vesículas).

Observou-se que a ultracentrifugação (UC) para isolamento de EVs de MSC de humanos tem aumentado durante os últimos 5 anos, com um crescimento acentuado a partir do ano de 2019 (Figura 1).

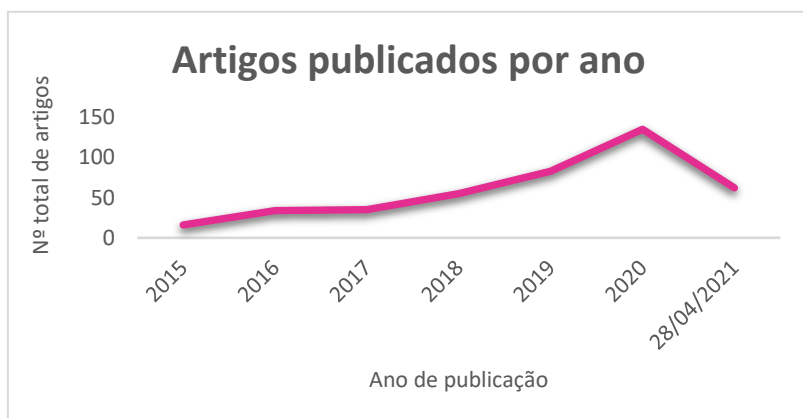


Figura 1. Quantidade de artigos publicados por ano na PubMed sobre isolamento de vesículas extracelulares oriundas de células mesenquimais de humanos.

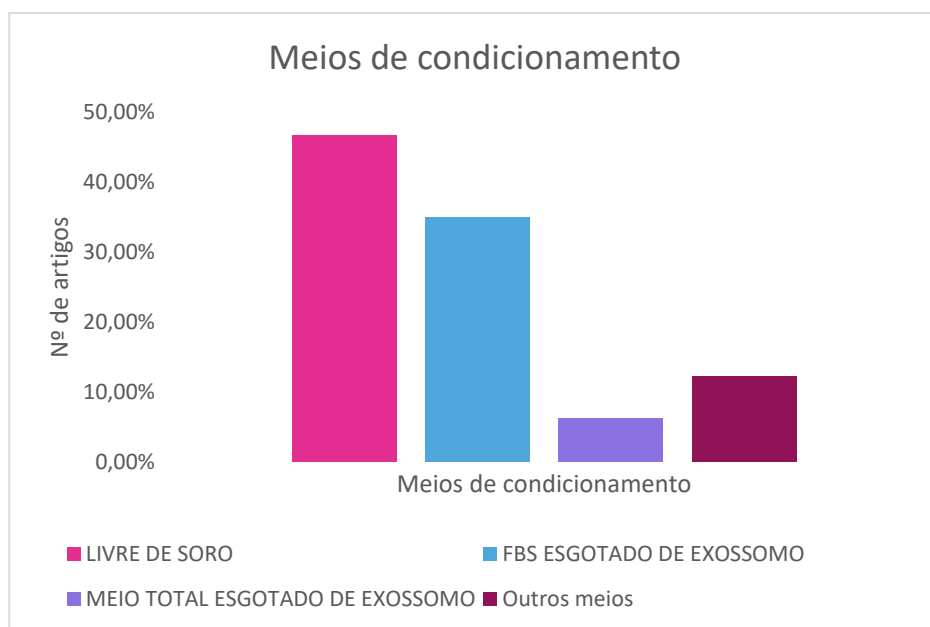


Figura 2. Representação dos meios de condicionamento (MC) mais utilizados. LIVRE DE SORO, representa o MC que não foi utilizado nenhum tipo de soro como suplemento. FBS ESGOTADO DE EXOSSOMO, representa o MC suplementado com FBS ultracentrifugado. MEIO TOTAL ESGOTADO DE EXOSSOMO, representa o MC suplementado ultracentrifugado.

Dos dados relacionados a cultura celular, foi possível observar que a maioria dos protocolos cultivaram as células em um MC livre de soro (46,6%), seguido do MC suplementado com FBS ultracentrifugado (34,9%). Com relação ao tempo

de cultivo podemos perceber uma padronização, onde a maioria dos protocolos cultivam as células por 48 horas (61%) no MC até o momento da coleta (Figura 3).

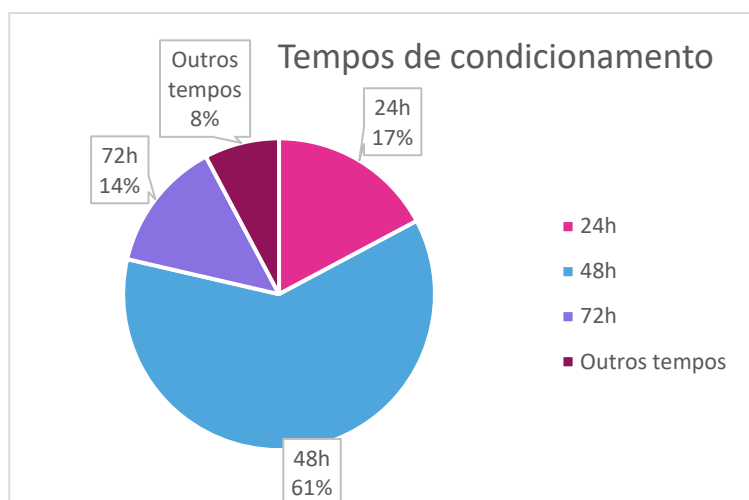


Figura 3. Tempos de condicionamento do meio de cultivo.

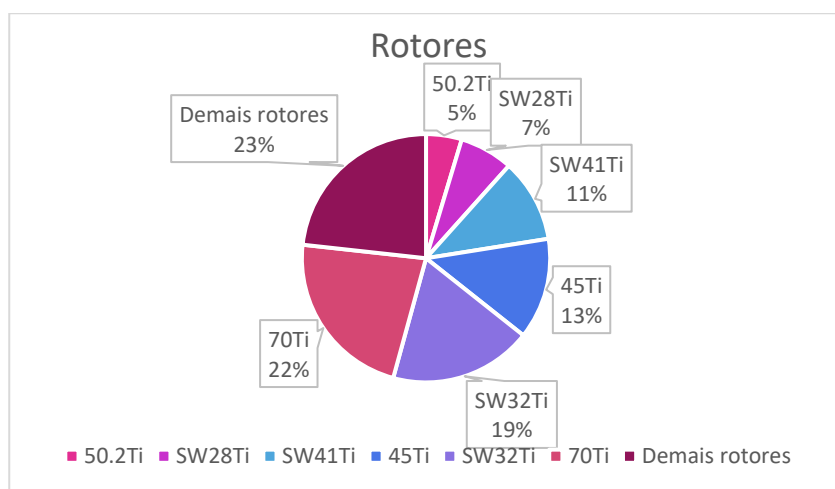


Figura 4. Representação gráfica dos rotores utilizados para a realização da ultracentrifugação.

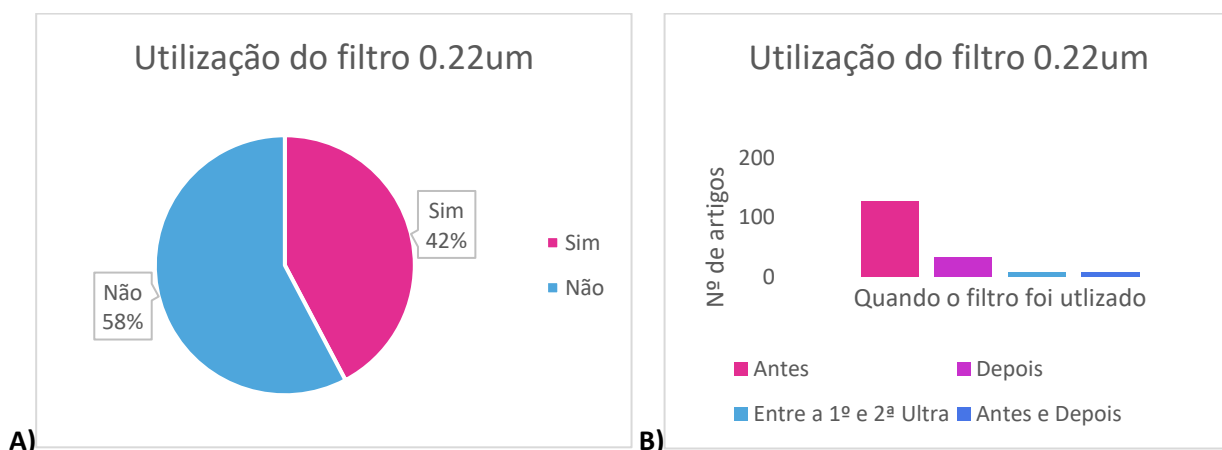


Figura 5. Representação gráfico do uso de filtro 0.22 µm (micrometro) nos protocolos de UC. A) Porcentagem dos artigos que utilizaram e não utilizaram. B) Representação do momento de foi utilizado: antes ou depois da UC, entre a primeira e a segunda etapa de UC, e quanto foi utilizado 2x, antes e depois.

Algumas informações no protocolo de UC ainda são divergentes, enquanto outras já estão mais próximas de serem padronizadas. Os rotores utilizados variam muito entre os protocolos (Figura 4), assim como o uso do filtro 0,22µm (Figura 5A) e a realização de uma ou duas UCs, sendo uma para isolamento e outra para eliminar proteínas

contaminantes (Figura 6). Entretanto, outros parâmetros já estão mais definidos, como a rotação a 100.00g (Figura7); o tempo de processamento entre 60 a 70 minutos (Figura 8) e o uso do filtro de 0,22um antes da UC (5B).

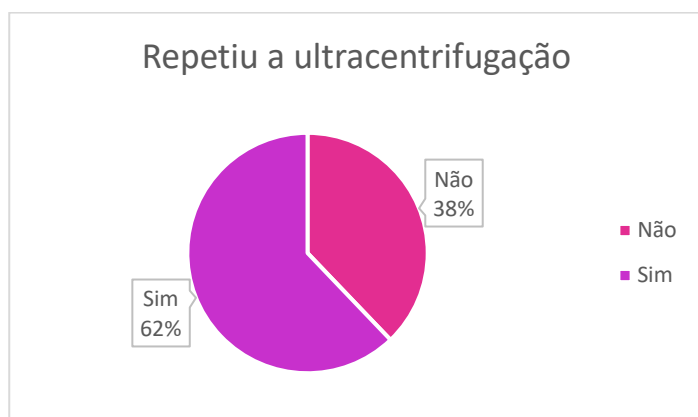


Figura 6. Porcentagem dos artigos que fizeram a segunda ultracentrifugação.

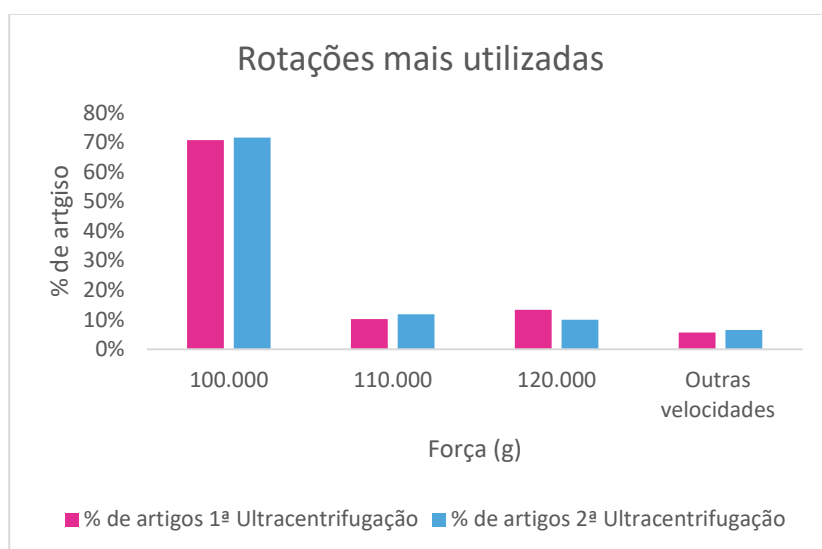


Figura 7. Representação das 3 rotações mais utilizadas na primeira e segunda etapa de ultracentrifugação com suas respectivas porcentagens de artigo.

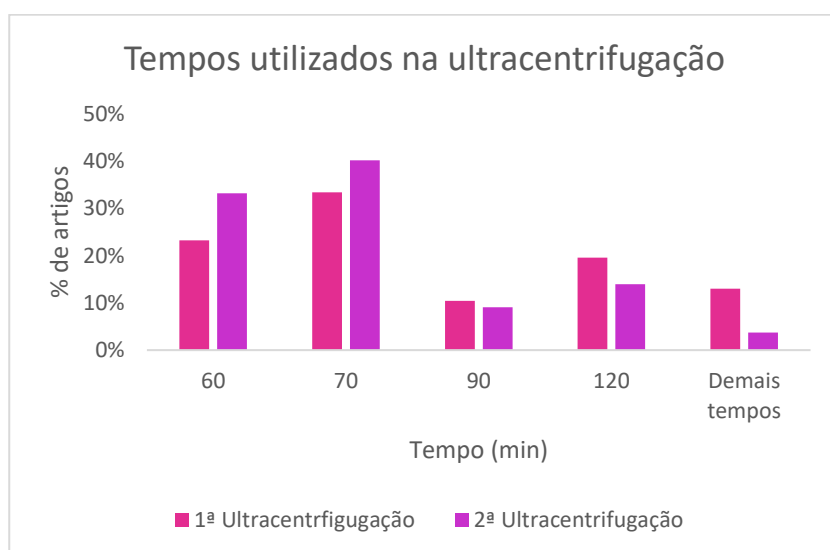


Figura 8. Tempos (em minutos) utilizados na primeira e segunda etapa de ultracentrifugação em 100.000g e suas respectivas porcentagens de artigo.

O tipo de ressuspensão final para armazenar as EVs após o isolamento foi uma das informações que não houve muita divergência entre os protocolos, a grande maioria (85,56%) ressuspendeu as vesículas extracelulares em PBS.

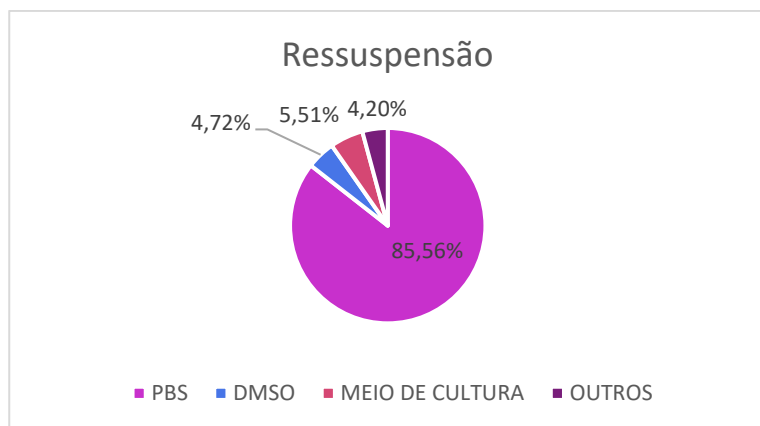


Figura 9. Representação gráfica da porcentagem do tipo de ressuspensão final utilizada para armazenar as vesículas extracelulares isoladas nos diferentes artigos.

É importante ressaltar que essa revisão possui limitações pois não foram todos os 420 artigos que forneciam todas as informações colhidas. Por conta do aumento de artigos publicados sobre vesículas extracelulares oriundas de MSCs humanas, até a publicação do paper, será feita uma atualização das informações coletadas.

CONCLUSÕES:

Apesar da ultracentrifugação ser o método mais utilizado para isolar vesículas extracelulares oriundas de células mesenquimais estromais humanas, ainda não há um protocolo padrão para esse uso. Entretanto através dessa revisão foi possível observar que avanços na padronização estão sendo alcançados. O desenvolvimento de um método padrão aumenta a eficiência do isolamento de EVs, podendo ser aplicado em mais estudos científicos e clínicos; e futuramente para uma aplicação clínica, como uma terapia alternativa a terapia celular.

BIBLIOGRAFIA

- Banerjee A, Jain SM, S Abrar S, Kumar MM, Mathew C, Pathak S. **Sources, isolation strategies and therapeutic outcome of exosomes at a glance.** *Regen Med.* 2020 Dec;15(12):2361-2378.
- Chhoy P, Brown CW, Amante JJ, Mercurio AM. **Protocol for the separation of extracellular vesicles by ultracentrifugation from *in vitro* cell culture models.** *STAR Protoc.* 2021 Jan 29;2(1):100303.
- Fu M, Gu J, Jiang P, Qian H, Xu W, Zhang X. **Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications.** *Mol Cancer.* 2019 Mar 15;18(1):41.
- Hu P, Yang Q, Wang Q, Shi C, Wang D, Armato U, Prà ID, Chiarini A. **Mesenchymal stromal cells-exosomes: a promising cell-free therapeutic tool for wound healing and cutaneous regeneration.** *Burns Trauma.* 2019 Dec 26;7:38.
- Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov AV, Laktionov PP. **Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and activation of NLRP3 in macrophage.** *Life Sci.* 2020;246:117401.
- Zhang S, Jiang L, Hu H, Wang H, Wang X, Jiang J, Ma Y, Yang J, Hou Y, Xie D, Zhang Q. **Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF- α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage.** *Life Sci.* 2020 Apr 1;246:117401.