

P 1289**Geração de vesículas de membrana a partir de células-tronco mesenquimais para aplicação em terapia celular**

Fabiany da Costa Gonçalves; Sander Korevaar; Natália Schneider; Ana Merino Rodriguez; Martin Hoogduijn; Ana Helena da Rosa Paz - HCPA

As vesículas de membrana consistem em membranas reconstituídas que apresentam bicamada de fosfolipídios em torno de compartimentos aquosos, podendo ser geradas a partir de células-tronco mesenquimais (MSCs) lisadas. Em contraste com a terapia celular, as vesículas de membrana de MSCs (MMVs) são menores e não se aprisionam nos micro-capilares pulmonares, o que facilita a sua migração para locais de inflamação. Além disso, as MMVs são estáveis e sem risco de aneuploidia; e a contaminação com o material nuclear das MSCs pode ser minimizado, reduzindo a rejeição imunológica. No presente estudo, avaliamos as propriedades imunomoduladoras de MMVs formadas a partir de MSCs humanas em comparação com células intactas, utilizadas como controle positivo. MSCs isoladas do tecido adiposo foram cultivadas na ausência ou presença de IFN- γ . As MMVs foram geradas a partir de membranas lisadas e reaneladas. Através da análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), as MMVs foram verificadas de acordo com o tamanho e concentração; e a morfologia foi analisada por microscopia confocal. A expressão dos marcadores de superfície foi avaliada por citometria de fluxo de acordo com o painel de caracterização das MSCs. Já a funcionalidade foi verificada pelo cultivo com monócitos CD14+ durante 24 h. Após, foram coletadas células para análise de PCR e para citometria de fluxo. A análise de NTA indicou que o diâmetro das MMVs é menor que 200 nm e que não há diferença significativa no tamanho entre o grupo estimulado com IFN- γ (197.9 ± 23.6 nm) e o controle (170.6 ± 33.8 nm). As imagens do confocal revelam vesículas isoladas e agrupadas com morfologia arredondada. As MMVs expressaram CD13, CD73, CD90, CD105, HLA-I e foram negativas para CD45, HLA-II e PD-L1. Porém, as estimuladas com IFN- γ apresentaram alta expressão de HLA-II e PD.L1. Na cultura com monócitos, as MMVs induziram a diminuição da população pró.inflamatória CD14++CD16+ ($P<0.01$), assim como regularam positivamente a expressão de marcadores de membrana CD90 ($P<0.01$) e PD.L1 ($P<0.001$, grupo MMVs IFN. γ). Com as análise de PCR, foi confirmado que, após cultivo com MMVs, os monócitos começaram a expressar os marcadores CD90 ($P<0.05$) e PD.L1 ($P<0.05$); além de aumentarem os níveis de IL.6 ($P<0.05$) e IL.10 e diminuírem os níveis de TNF. α ($P<0.05$) e TGF. β ($P<0.05$). Podemos concluir que as MMVs possuem efeitos moduladores em células do sistema imune e podem ser importantes ferramentas para o tratamento de desordens imunológicas. Unitermos: Vesículas de membrana; Células.tronco mesenquimais