



## Caracterização morfo-funcional de vesículas de membrana (VMs) liberadas de macrófagos infectados pelo *Mycobacterium bovis* BCG.

Elissandro Miranda Martins<sup>1</sup>; Silas Gabriel Souza de Oliveira<sup>1</sup>; Paulo Sergio Mattos<sup>1</sup>; Clarissa Cunha Santana<sup>1</sup>; Yasmim da Silva de Azevedo Oliveira<sup>1</sup>; Tonya Azevedo Duarte<sup>2</sup>; André Cronenberger Andrade<sup>3</sup>; Ana Claudia Trocoli Torrecilhas<sup>3</sup>; Bruno Solano de Freitas Souza<sup>1</sup>; Leonardo de Paiva Farias<sup>1</sup>; Juliana Perrone Bezerra de Menezes<sup>1</sup>; Cláudio Pereira Figueira<sup>1</sup>; Bruno de Bezerril Andrade<sup>1</sup>; Theolis Barbosa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Bahia, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia, Bahia, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de São Paulo.

### INTRODUÇÃO

Vesículas de membrana (VMs) são estruturas envolvidas por membrana lipídica que podem conter componentes citoplasmáticos como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Elas são encontradas em fluidos biológicos como plasma, soro, saliva e leite materno, e são liberadas por vários tipos celulares. Sua liberação e conteúdo variam conforme o estado da célula. Por exemplo, macrófagos infectados por *Mycobacterium* spp. induzem a sua maior produção e mudanças na composição. As VMs são consideradas como uma das principais vias de comunicação intercelular, em conjunto com fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos, lipídios, NO2 e moléculas de adesão, e são capazes de modular respostas imunes. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar morfo-funcionalmente as VMs derivadas de macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* BCG (BCG).

### MÉTODOS

VMs foram isoladas a partir do sobrenadante de cultura de macrófagos humanos obtidos a partir de bolsas de sangue e infectados (VMsBCG) ou não (VMsMeio) por BCG (cepa vacinal Moreau-RJ), bem como do isolamento direto a partir do plasma de doadores saudáveis (VMsPlasma). As VMs foram caracterizadas morfológicamente, por microscopia eletrônica de transmissão (MET), quanto a tamanho e concentração por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e bioquimicamente, quanto à presença de moléculas de superfície e citocinas internas.

### RESULTADOS

A caracterização morfológica por MET (figura 1), e quanto a tamanho e concentração por NTA (figura 2), sugerem que as VMs obtidas têm tamanho e formato compatíveis com a literatura, sendo maior a concentração de VMsPlasma. A origem e a capacidade de transportar antígenos foi confirmada pela presença de moléculas de superfície de macrófagos e a presença de receptores do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) (figura 3). VMs-BCG mostraram carregar níveis aumentados de IL-6 e IL8 quando comparadas com VMsMeio e VMsPlasma, sugerindo sua potencial atividade pró-inflamatória (figura 4).

### CONCLUSÃO

Concluímos que macrófagos liberam VMs com características da célula originária e capacidade de apresentação de antígenos, e que quando infectados pelo BCG, liberam VMs que carregam citocinas pró-inflamatórias que podem favorecer o macrófago frente a infecção pelo BCG.

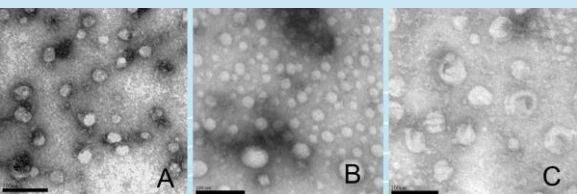


Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão de VMs.

VMsMeio (A), VMsBCG (B) ou VMsPlasma (C) foram adsorvidas a grades de cobre revestidas com formvar por 20 minutos. Foi utilizado acetato de urânio 2% para contração negativa. Barra de escala: 100nm.

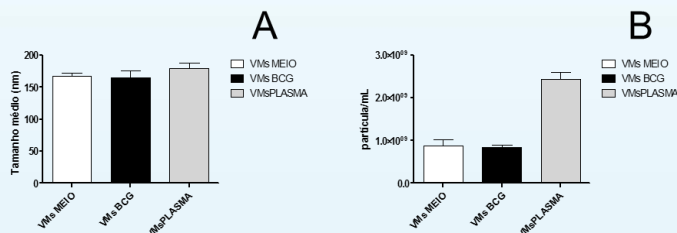


Figura 2 - Quantificação das VMs por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

VMs em suspensão foram capturadas por uma câmera CCD, cada partícula teve seu movimento acompanhado para mensuração do tamanho (A) e concentração (B) pelo NanoSight NS300. As barras representam a média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

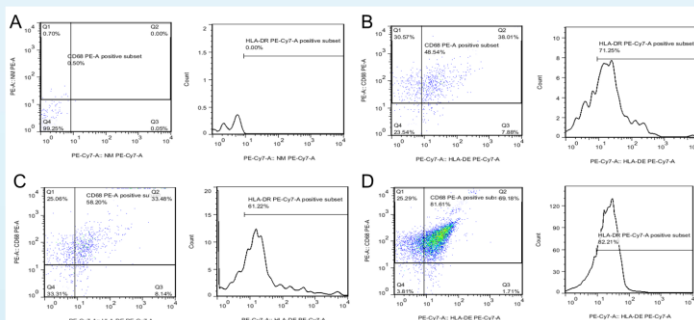


Figura 3 - Citometria de fluxo das VMs marcadas com anti-CD68 e anti-HLA-DR.

As VMs foram marcadas com Anti-CD68 e anti-HLA-DR por 30 minutos no escuro e em seguida analisadas por citometria de fluxo. Ao lado esquerdo estão representados os dot plots da marcação do anti-CD68 e anti-HLA-DR. Foi selecionado um gate apenas com as VMs CD68 positivo. Ao lado direito está representado a positividade do HLA-DR entre as VMs CD68 positivo. A: Não marcado; B: VMsMeio; C: VMsBCG; D: VMsPlasma.

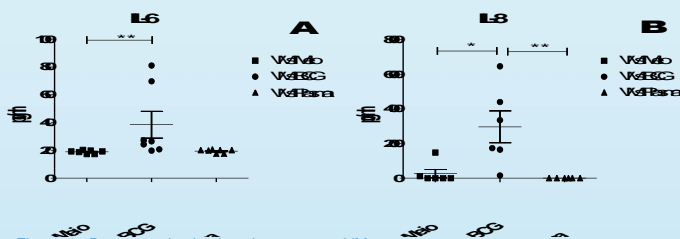


Figura 4 - Dosagem de citocinas internas nas VMs

A quantificação de citocinas foi realizada utilizando o kit CBA inflamatório. Foram encontradas níveis detectáveis das citocinas IL-6 (A), IL-8 (B) nas VMs de diferentes condições.

### AGRADECIMENTOS

