

Cultivo celular e extração de fosfolipídios para composição de nanossistemas imunomoduladores¹

Carolina Santiago Paiva ²
Emanuelle Baldo Gaspar ³
Robert Domingues ⁴
Marcia Cristina de Azevedo Prata ⁵
Wanessa Araújo Carvalho ^{5,6}

Resumo: A infestação por carrapatos traz vários prejuízos a pecuária brasileira. Dessa forma, objetivou desenvolver nanossistemas imunomoduladores através de nanopartículas lipossomais para reprogramação metabólica de células específicas do sistema imune bovino combater infestação por carrapatos. Para isso, foi feita a extração de fosfolipídios de macrófagos. Durante o cultivo celular dos macrófagos ocorreram sucessivas contaminações das células não sendo possível ter uma eficiente extração de fosfolipídios. Mais estudos precisam ser realizados para amplificação da obtenção dos fosfolipídios e criação de nanossistemas para imunização de uma quantidade maior de animais.

Palavras chave: Nanopartículas, lipossoma, ectoparasita, imunologia, bovino

Cell culture and collection of phospholipids for the composition of immunomodulatory nanosystems

Abstract: The infestation by ticks brings several to Brazilian livestock. Thus, the objective was to develop immunomodulatory nanosystems through nanoparticles for metabolic reprogramming of specific cells of the bovine immune system combater infestation by ticks. For this, phospholipids were received from macrophages. During the cultivation of cellular macrophages, successive contamination of cells is not possible efficiently with phospholipids. More needs to be done to amplify the amount of phospholipid studies to create nanosystems for immunization of a larger number of animals.

Keywords: Nanoparticles, liposome, ectoparasite, immunology, bovine

Introdução

A pecuária é uma importante atividade econômica para o Brasil que enfrenta um grande problema com a infestação por ectoparasitas, principalmente pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, que traz grandes prejuízos econômicos à cadeia produtiva. A soma dos prejuízos anuais tem sido estimada em bilhões de dólares (ANDREOTTI *et al.*, 2019). A principal forma de combate aos carrapatos é pelo uso de acaricidas, que muitas vezes não é eficiente e pode gerar o aparecimento de cepas resistentes do parasita. Além disso, pode ocorrer o descarte indiscriminado da solução residual de carrapaticida no ambiente, resultando na intoxicação dos animais e humanos e a contaminação de solos e águas (PAZ *et al.*, 2021). Assim, é preciso alternativas mais eficazes, sustentáveis e não poluentes para

¹ O presente trabalho foi realizado com o apoio da FAPEMIG, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, e do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil. Parte do projeto SEG 10.19.03.054.00.00, liderado por Wanessa A. Carvalho.

² Graduanda em Medicina Veterinária, UFJF. Bolsista PIBIC FAPEMIG. e-mail: carolinasantiago10@hotmail.com

³ Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS.

⁴ Analista. Embrapa Pecuária Sul.

⁵ Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite. e-mail: wanessa.carvalho@embrapa.br

⁶ Orientadora

o combate a esse parasita, tais como vacinas, agentes imunomoduladores específicos e marcadores para resistência.

Sabendo que os bovinos apresentam resposta imune específica contra carrapatos e que os animais *Bos indicus* são mais resistentes que os *Bos taurus* (JONSSON *et al.*, 2014), uma alternativa viável seria modular a resposta imune, de forma a torná-la mais eficaz em animais taurinos, através da imunomodulação direta utilizando estratégias de nanobiotecnologia a partir de nanopartículas lipossomais.

Lipossomas são caracterizados como vesículas esféricas constituídas por fosfolípidios que se associam em bicamadas formando no centro uma cavidade aquosa. Por esse formato tem potencial de carrear substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, protegendo os compostos encapsulados contra uma variedade de ameaças que podem levar a liberação imediata ou degradação. Por possuírem uma escala nanométrica, se apresentam em forma de nanopartículas. Dessa forma, essas nanopartículas lipossomais podem funcionar como um “delivery” de bioativos com direcionamento ativo na célula alvo (GAYOSO & MORENO, 2016).

Baseado nessas informações, a Embrapa Gado de Leite vem desenvolvendo nanossistemas imunomoduladores que foram concebidos com direcionamento ativo para alvos celulares específicos. Esta ferramenta encontra-se em processo de patenteamento junto a Secretaria de Inovação e Negócios - SIN (SEI 21179.004094/2020-86- processo sigiloso). A linha de pesquisa passa pelo pressuposto de que reprogramação metabólica de células específicas do sistema imune bovino pode melhorar a resposta imune de memória e resultar numa resistência artificial induzida de longo prazo ao carrapato. Para desenvolvimento da formulação, uma das etapas consiste na obtenção de fosfolípidios de membrana celular de macrófago murino (linhagem JJ774, ATCC). Uma vez atingida a escala, os nanossistemas serão testados em bovinos taurinos para verificar sua eficácia no controle da infestação pelo carrapato através da contagem de teleóginas em animais inoculados.

Material e Métodos

1. Cultivo celular

1.2. Cultivo e amplificação do número de células

Para o cultivo das células foi utilizado meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, 10um de L-glutamina e antibiótico e antimicótico, todos da marca Sigma® (San Luis, Estados Unidos). As células descongeladas foram ressuspensas com auxílio de uma pipeta estéril e depois transferidas para uma garrafa de cultivo celular com tampa de filtro (SPL®, Thermo scientific). As células foram incubadas em uma estufa (37°C; 5% de CO₂) para proliferação. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias de acordo com a atividade metabólica das células, medida pela cor amarelada indicativa de pH ácido (figura 2). Quando as células atingiram uma confluência maior que 85% procedeu-se a extração de fosfolípidios.

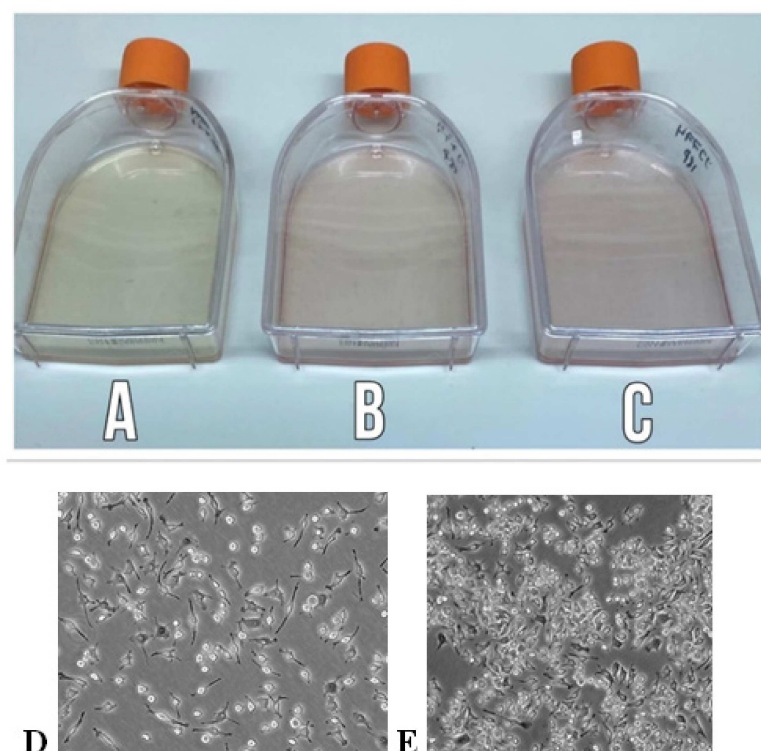


Figura 1. Cultivo de células JJ774 (ATCC®; linhagem de macrófagos murinos). Figura representativa da coloração de meio em garrafa consumido pelos macrófagos: 1A – garrafa com meio amarelado (pH ácido) consumido pelas células; 1B e C – garrafa com meio em diferentes tons de rosa claro (indicativo de pH neutro) após 1 e 2 dias de cultivo celular, respectivamente; 1D e E - Fotomicrografia representativa (aumento de x40) de macrófagos JJ774 apresentando confluência entorno de 55% (D) e 85% (E), respectivamente.

1.3. Extração de fosfolipídios

Para extração de fosfolipídios, os macrófagos JJ774 foram descolados da garrafa por choque térmico a frio, feito em freezer. Basicamente, a garrafa foi resfriada até o meio ficar no ponto leitoso de congelamento seguido de batidas veementes na lateral para o descolamento das células. Procedeu-se a lavagem da garrafa com 20 ml de tampão PBS, agitando por 30 segundos. As células descoladas foram transferidas para um tubo falcon, seguido de centrifugação a 300g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas novamente em tampão PBS para lavagem seguida de centrifugação (300g/10min). Para extração dos fosfolipídios, as células lavadas foram lisadas em 1,25 ml de água ultrapura tipo I, seguido de 1,25 ml de clorofórmio (Merck, Darmstadt - Alemanha) para solubilização do material hidrofóbico, de 2,4ml de metanol (Merck, Darmstadt - Alemanha) para solubilizar o material hidrofílico. A adição desses componentes foi repetida e, entre cada adição, foi feita a solubilização, por 5 minutos, em de agitação no vórtex. Após todo esse processo foi feita uma centrifugação a 1000g por 5 minutos para separação de fases. A fase mais translúcida onde estavam os fosfolipídios, depositada ao fundo, foi removida com auxílio de uma pipeta. Os fosfolipídios foram armazenados no freezer -20°C em pote de vidro estéril devidamente vedado. Todo material extraído foi enviado para Embrapa CENARGEN para obtenção dos nanossistemas por extrusão.

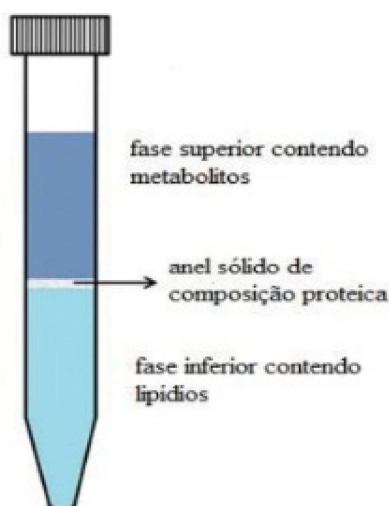


Figura 2. Representação esquemática da etapa final da extração dos fosfolipídios. Observa-se que os fosfolipídios ficam depositados no fundo do tubo. Fonte: BORGES, 2020.

Resultados e Discussão

Durante o cultivo celular ocorreram sucessivas contaminações das garrafas dentro da estufa. Foram feitas diversas tentativas para identificar de onde sugiram as contaminações, porém sem sucesso, podendo ter ocorrido durante o congelamento das partidas celulares utilizadas, da estufa de CO₂, usada de forma compartilhada, ou da manipulação na hora da troca do meio. Sendo assim, novos ensaios serão feitos para tentar identificar a fonte de contaminação e tentar amplificar a obtenção de células no futuro visando a extração eficiente de fosfolípidos para que se consiga sintetizar os nanossistemas para testes em animais.

Conclusões

A amplificação de células para obtenção dos fosfolipídios e posterior síntese de nanossistemas imunomoduladores, apesar de já estar bem padronizada, falhou por motivo de contaminação recorrente e a fonte deve ser descoberta em investigação futura.

Agradecimentos

Agradeço a FAPEMIG pela concessão da bolsa e a minha orientadora pela oportunidade e ensinamentos.

Referências

ANDREOTTI, R., GARCIA, M. V., KOLLER, W. W. (Ed.). Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília: Embrapa, 2019. 240 p. il. color.

BORGES, E. D. **Aplicação do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM – profiling) para a caracterização lipídica de espermatozoides de homens férteis e subférteis.** 2020. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

GAYOSO, L. C., MORENO, A. I. **Lipossomas e nanopartículas no tratamento de patologias do sistema nervoso central**. 2016. 216 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

JONSSON, N. N., PIPER, E. K., CONSTANTINOIU, C. C. Host resistance in cattle to infestation with the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Parasite immunology*, v. 36, p. 553-559, 2014.

PAZ, V. C. D., PAZ, C. J., SANTANA, S. C. Avaliação in vitro de formulação homeopática no controle do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **PUBVET**, v.15, 1976, p.1-6, 2021.