



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

MARIANA CAVALCANTE THEOPHILO GASPAR DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO USO DE EXOSSOMOS DE LEITE CAPRINO E BOVINO NO
ENCAPSULAMENTO E TRANSPORTE DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À
QUITINA DE *Moringa oleifera* (Mo-CBP₃)**

FORTALEZA – CEARÁ

2020

MARIANA CAVALCANTE THEOPHILO GASPAR DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO USO DE EXOSSOMOS DE LEITE CAPRINO E BOVINO NO
ENCAPSULAMENTO E TRANSPORTE DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À
QUITINA DE *Moringa oleifera* (Mo-CBP₃)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Fraga van Tilburg

FORTALEZA – CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Oliveira, Mariana Cavalcante Theophilo Gaspar de .
Avaliação do uso de exossomos de leite caprino e
bovino no encapsulamento e transporte de uma proteína
ligante à quitina de Moringa oleifera (Mo-CBP3) [recurso
eletrônico] / Mariana Cavalcante Theophilo Gaspar de
Oliveira. - 2020.
64 f.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade
Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária,
Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde
Humana e Animal, Fortaleza, 2020.
Área de concentração: Biotecnologia em saúde.
Orientação: Prof. Dr. Maurício Fraga van Tilburg.

1. Vesícula extracelular. 2. Nanotecnologia. 3.
Entrega de moléculas. I. Título.

MARIANA CAVALCANTE THEOPHILO GASPAR DE OLIVEIRA

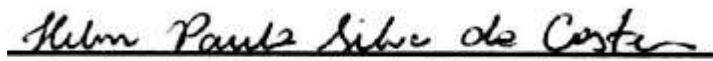
AVALIAÇÃO DO USO DE EXOSSOMOS DE LEITE CAPRINO E BOVINO NO ENCAPSULAMENTO E TRANSPORTE DE UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE *Moringa oleifera* (Mo-CBP₃)

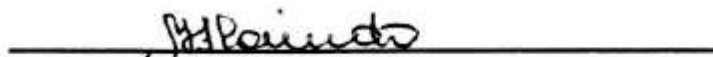
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de concentração: Biotecnologia em saúde.

Aprovada em: 12 de junho de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Mauricio Fraga van Tilburg
(UECE - Presidente)


Prof.ª Dr.ª Helen Paula Silva da Costa
(UFC - Examinador)


Prof.ª Dr.ª Maria Izabel Florindo Guedes
(UECE - Examinador)

Dedico esse trabalho aos meus pais, que são os meus maiores incentivadores. À minha mãe pelo apoio incondicional e pelo exemplo de mulher forte e corajosa, e ao meu pai por ter me ensinado desde cedo o valor da educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde que me proporcionou para trabalhar e conduzir esse projeto até o final.

À professora Maria Izabel Florindo Guedes pela oportunidade única de trabalhar em um dos melhores laboratórios de biotecnologia do estado do Ceará, sendo acompanhada e supervisionada por profissionais extremamente gabaritados.

Ao professor Maurício Fraga van Tilburg, meu orientador, pela paciência, confiança e pela dedicação à arte de ensinar.

À querida dra. Helen Paula Silva da Costa por ter sido muito mais que uma coorientadora e sim um ombro amigo. Eu devo todo o meu conhecimento a você, e, sem dúvida, você é uma grande professora e um ser humano extraordinário.

Ao professor Daniel Câmara Teixeira que gentilmente me concedeu a chance de efetuar esse projeto.

Agradeço ainda à minha amiga Marcela Praxedes, um verdadeiro porto seguro durante esses dois anos e meio, pelas inúmeras conversas, pelas escutas mais pacientes e pelo incentivo constante na busca por esse sonho.

Agradeço em especial aos meus amigos de laboratório e companheiros de bancada: Bruno, Ilana, Duda, Mário, Arnaldo, Chayane, Natália Canabrava, Danielle, Davi e Ana Cláudia, vocês me ensinaram muito! Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e à minha prima Paula Theophilo, meus maiores motivadores durante toda essa jornada.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa etapa seja com palavras, amizade, técnicas em experimentos ou mesmo com a sua compreensão.

RESUMO

Vesículas extracelulares (VE) são estruturas membranosas envolvidas no processo de comunicação intercelular. Os exossomos são as menores VE, medindo em torno de 30-150 nm de diâmetro e sua principal função é o transporte de proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos entre as células. Pesquisas utilizando exossomos como veículo alternativo para o transporte e entrega de compostos bioativos são cada vez mais frequentes, em virtude das vantagens que apresentam, como tamanho reduzido, ampla distribuição no organismo e capacidade de burlar o sistema imune. O leite de mamíferos é uma das principais fontes para a extração de exossomos, devido a fatores como baixo custo, ausência de toxicidade, boa biodisponibilidade e fácil método de obtenção. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi isolar os exossomos provenientes de leite de cabra (LC) e do leite de vaca (LV) para comparar a biodisponibilidade, tamanho e capacidade de encapsulamento de compostos bioativos, bem como o transporte e a entrega de uma molécula para as células. Para isso, os exossomos foram purificados por meio de ultracentrifugação diferencial, caracterizados morfológicamente por microscopia eletrônica, avaliados em relação a capacidade de encapsulamento utilizando a albumina de *Moringa oleifera*, Mo-CBP₃ (*Moringa oleifera* - *Chitin binding protein*) conjugada com FITC, e, por fim, empregados em ensaios celulares. Foram testadas quatro metodologias de encapsulamento: eletroporação, sonicação, incubação à temperatura ambiente e choque térmico. Nossos resultados mostraram que os exossomos do LV são quase 30% maiores que os LC. O conteúdo proteico próprio das amostras de LV e LC foi de 36,6 e 30 mg/mL de proteína, respectivamente. A capacidade de encapsulamento de proteína pelos exossomos foi confirmada por meio de SDS-PAGE, *Western Blotting* e espectrofotometria de fluorescência. Os experimentos de incubação em cultivo celular confirmaram também entrega destas nanopartículas às células.

Palavras-chave: Vesícula extracelular. Nanotecnologia. Entrega de moléculas.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EV) are membranous structures involved in the intercellular communication process. Exosomes are the smallest VE, measuring around 30-150 nm in diameter and their main function is the transport of proteins, nucleic acids and lipids between cells. Research using exosomes as an alternative vehicle for the transport and delivery of bioactive compounds is more and more frequent, due to the advantages they present, such as small size, wide distribution in the organism and ability to circumvent the immune system. Mammalian milk is one of the main sources for the extraction of exosomes, due to factors such as low cost, absence of toxicity, good bioavailability and easy method of obtaining it. In this sense, the objective of this study was to isolate exosomes from goat's milk (LC) and cow's milk (LV) to compare the bioavailability, size and encapsulation capacity of bioactive compounds, as well as the transport and delivery of one molecule to the cells. For this, the exosomes were purified by means of differential ultracentrifugation, morphologically characterized by electron microscopy, evaluated for encapsulation capacity using Moringa oleifera albumin, *Mo*-CBP₃ (Moringa oleifera - Chitin binding protein) conjugated with FITC, and, finally, used in cellular tests. Four encapsulation methodologies were tested: electroporation, sonication, incubation at room temperature and thermal shock. Our results showed that LV exosomes are almost 30% larger than LC. The protein content of the LV and LC samples was 36.6 and 30 mg/mL of protein, respectively. The protein encapsulation capacity by the exosomes was confirmed by means of SDS-PAGE, Western Blotting and fluorescence spectrophotometry. The cell culture incubation experiments also confirmed delivery of these nanoparticles to the cells.

Keywords: Extracellular vesicle. Nanotechnology. Molecular delivery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Biogênese dos exossomos.	18
Figura 2 –	Microscopia Eletrônica de Varredura de exossomos de leite caprino e bovino.....	44
Figura 3 –	Diâmetro médio de exossomos de leite bovino e caprino.....	45
Figura 4 –	Microscopia Eletrônica de Varredura de exossomos de leite caprino e bovino após eletroporação.....	46
Figura 5 –	Análise de Encapsulamento da proteína <i>Mo-CBP₃</i>-FITC por Espectrofotometria de Fluorescência.	47
Figura 6 –	Análise de encapsulamento da proteína <i>Mo-CBP₃</i> por Eletroforese e Western Blotting	48
Figura 7 –	Análise da captação de exossomos de leite bovino e caprino por células da linhagem Hep-G2 através de microscopia confocal.....	52
Figura 8 –	Análise da fluorescência de exossomos incubados com células da linhagem Hep-G2	53
Tabela 1 –	Evidências traducionais para patogênese de doenças ocidentais mediadas por exossomos do leite bovino....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrômetros
Aβ	Peptídeo amiloide β
BHE	Barreira hematoencefálica
C	Celsius
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de Carbono
CA	Corpos apoptóticos
CT	Choque térmico
DA	Doença de Alzheimer
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified - Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HMDS	Hexametildisilazano
Hep-G2	Linhagem e células de Hepatocarcinoma Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ILSI	International Life Sciences Institute
LBBM	Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular
LC	Leite de cabra
LPS	Lipopolisacarídeos
LV	Leite de vaca
mL	Mililitros
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MFA	Microscopia de força atômica
MVs	Microvesículas
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	micro RNA
<i>Mo-CBP₃</i>	<i>Moringa oleifera - Chitin binding protein</i>
<i>NK</i>	<i>Natural Killer</i>

nm	nanômetros, unidade de medida
PBS	do inglês, Phosphate buffered saline (Solução salina de fosfato tamponada)
PVDF	Difluoreto de polivinil
RNA	Ácido ribonucleico
SD	Desvio padrão
SDS-PAGE	do inglês, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Gel de eletroforese de dodecil sulfato de sódio)
SNC	Sistema Nervos Central
SIRNA	RNA silenciador
SIVE	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
TA	incubação à temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
UD	Ultracentrifugação Diferencial
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VE	Vesículas extracelulares
WB	<i>Western blotting</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	JUSTIFICATIVA.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1	Exossomos.....	17
3.2	Fisiopatologia e aplicação terapêutica dos exossomos.....	20
3.3	Exossomos do leite como ferramenta para a terapia celular	24
3.4	Riscos potenciais no uso dos exossomos como biofármacos.....	29
3.5	Albumina 2S de <i>Moringa oleífera</i>	31
4	OBJETIVOS.....	34
4.1	Geral.....	34
4.2	Específicos.....	34
5	METODOLOGIA.....	35
5.1	Isolamento dos exossomos de leite bovino e caprino.....	35
5.2	Caracterização de exossomos de Leite Bovino e Caprino.....	35
5.3	Conjugação da albumina de <i>Moringa oleífera</i> (<i>Mo</i> -CBP ₃) com Isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	36
5.4	Encapsulamento da <i>Mo</i> -CBP ₃ em exossomos do leite bovino e caprino.....	37
5.4.1	Eletroporação.....	37
5.4.2	Sonicação.....	37
5.4.3	Choque Térmico (CT).....	38
5.4.4	Incubação em Temperatura ambiente (TA) na presença de saponina.....	38
5.5	Análise de encapsulamento da proteína <i>Mo</i> -CBP ₃	38
5.6	Ensaio de incubação de exossomos com linhagem celular..	40
5.7	Análise estatística.....	41
5.8	Colaborações interinstitucionais para a execução do projeto.....	41
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
6.1	Isolamento e caracterização dos exossomos.....	42

6.2	Encapsulamento da proteína <i>Mo</i>-CBP₃-FITC.....	47
6.3	Ensaio de incubação de exossomos com linhagem celular..	51
7	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Um organismo multicelular é formado por milhares de células com diferentes formas e funções, as quais devem operar coordenadamente. Para isso, elas apresentam uma série de mecanismos coexistentes que funcionam como mensageiros permitindo a comunicação celular (SANCHO-ALBERO et al., 2019). Um dos processos mais utilizados na comunicação intercelular se dá por meio da transferência de vesículas capazes de transportar informações complexas tais como proteínas, RNA, DNA e lipídios em condições fisiológicas ou patológicas. Nas células eucarióticas, essas vesículas membranosas também participam da transferência de componentes entre compartimentos internos da própria célula (XU et al., 2016).

As vesículas carreadoras, denominação que recebem nesses casos, são produzidas por organelas como o complexo de Golgi ou retículo endoplasmático, e trafegam pelo citoplasma até se ligarem ao compartimento receptor para entregarem seu conteúdo (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Já as vesículas secretadas para o meio extracelular denominadas vesículas extracelulares (VE) originam-se de estruturas conhecidas por endossomos que, eventualmente, são exportados da célula através dos corpos multivesiculares (YUAN et al., 2018).

Os endossomos são as organelas centrais no controle de processos de degradação/reutilização dos componentes da membrana celular. Os componentes endocitados por diversas vias são prontamente entregues aos endossomos que irão reciclá-los de volta à membrana ou encaminhá-los ao complexo de Golgi. Sendo assim, essas organelas estão ligadas também a mecanismos de absorção de nutrientes, imunidade, sinalização, adesão, *turnover* e desenvolvimento da membrana celular (GRUENBERG, 2019).

Particularmente, os endossomos que dão origem às vesículas extracelulares, surgem por meio de processos de invaginação/brotamento da membrana celular, onde a resultante será uma vesícula considerada cópia da célula de origem. Essas vesículas são classificadas de acordo com o seu tamanho em três grandes grupos: corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (CHO et al., 2018). Os corpos apoptóticos (CA) surgem durante o processo de morte celular e apresentam, em geral, diâmetros maiores que 500 nm. Esses corpos tem origem

pelo processo de invaginação da membrana plasmática e são maiores que as outras vesículas, justamente por representarem fragmentos de células. Os CA também atuam apresentando seu conteúdo aos macrófagos, durante o processo de apoptose celular, a fim de que ocorra a fagocitose da mesma (Schiller et al., 2008).

As microvesículas, também conhecidas por ectossomos ou exovesículas, surgem por um processo de brotamento e fissão da membrana plasmática e apresentam tamanho médio que varia de 50 a 1000 nm. No passado, foram considerados apenas debris celulares, entretanto sua função enquanto vetor no intercâmbio de conteúdo entre as células já é consenso (LEMOINNE et al., 2014).

Os exossomos são as menores VE medindo cerca de 30-150 nanômetros de diâmetro e sua principal função está ligada ao transporte de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Dispõem de ampla distribuição no organismo, podendo ser encontrados em diversos fluidos corporais tais como plasma, bile, urina, saliva, secreção mamária, e fluido pleural, o que aumenta a gama de fontes possíveis para a extração e emprego dos mesmos (MELO et al., 2015).

Em virtude de sua função enquanto carreadores de moléculas, de seu tamanho extremamente reduzido, e por serem um produto celular de natureza própria, os exossomos vêm sendo empregados em pesquisas que investigam a sua ação como biofármaco. Tais características fazem com que esses veículos sejam ainda capazes de evitar a fagocitose e degradação por macrófagos e circulem por extensos períodos através do corpo (MELO et al., 2015). Dessa forma, muitas pesquisas têm utilizado exossomos provenientes de células nativas como por exemplo células sanguíneas (QU et al., 2018b), células tronco (KALANI et al., 2016; ONO et al., 2014; YUAN et al., 2018), macrófagos (YUAN et al., 2017) e células dendríticas (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011) como estratégia para aumentar a biodisponibilidade de compostos terapêuticos.

No entanto, antes dos exossomos serem aceitos como um veículo de entrega de medicamentos em pesquisas clínicas, o desenvolvimento de fontes economicamente viáveis e biocompatíveis torna-se necessário. Nesse contexto, estudos têm sido desenvolvidos utilizando o leite bovino como fonte acessível para a extração de exossomos devido a fatores como baixo custo, ausência de toxicidade, adequada biodisponibilidade e fácil método de obtenção. Tais características tornaram o leite bovino uma fonte naturalmente adequada à

obtenção de exossomos em larga escala e fizeram com que ele ganhasse destaque no meio científico (MUNAGALA et al., 2016).

Diversos estudos já confirmaram a capacidade dos exossomos de encapsular uma extensa gama de moléculas incluindo compostos bioativos com alto poder antioxidante e anti-inflamatório como a curcumina (MUNAGALA et al., 2016; VASHISHT et al., 2017) e antocianinas (MUNAGALA et al., 2017), fármacos anticâncer como celastrol (AQIL et al., 2016) e paclitaxel (AGRAWAL et al., 2017), bem como plasmídeos e outros materiais genéticos (KUSUMA et al., 2016; AQIL et al., 2019; R.C. et al., 2018).

Alternativamente, em regiões onde a produção de leite bovino não é destaque, pode-se optar por outras fontes de exossomos, por exemplo, o leite de cabra. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Ceará possui um dos maiores rebanhos de caprinos do país, com cerca de 1,13 milhão de cabeças, já que essa é uma espécie que se adapta facilmente ao clima semiárido em que está inserido cerca de 92% do estado. O rebanho caprino demanda um baixo custo de manejo, o que torna ainda mais viável a produção em larga escala dos produtos da caprincocultura (IBGE, 2018).

Assim, o presente trabalho se propõe a investigar a utilização de exossomos oriundos do leite de cabra no encapsulamento e transporte de moléculas bioativas, comparativamente ao já estabelecido uso dos exossomos do leite bovino, bem como estudar a capacidade de entrega de sua carga a uma linhagem de células humanas (Hep-G2).

2 JUSTIFICATIVA

Em meio ao empolgante desenvolvimento de tecnologias inovadoras para a entrega de medicamentos, a nanotecnologia é uma grande promessa para novos avanços nas plataformas de biofármacos, especialmente aqueles de liberação controlada e direcionada. Várias nanoformulações de drogas foram desenvolvidas para melhorar seus efeitos terapêuticos. Infelizmente, a opsonização de partículas sintéticas carregadas de medicamentos na corrente sanguínea resulta em dois problemas distintos: toxicidade e liberação rápida pelo sistema de fagócitos mononucleares.

Os exossomos oferecem vantagens que os posicionam exclusivamente como portadores de drogas altamente eficazes. Composto por membranas celulares com várias proteínas de adesão em sua superfície, sabe-se que eles se especializam em comunicações célula-célula e fornecem uma abordagem exclusiva para a entrega de vários agentes terapêuticos às células-alvo.

Atualmente, o encapsulamento de exossomos do leite bovino já foi confirmado com uma extensa gama de moléculas. Alternativamente, em regiões onde a produção de leite bovino não é destaque, pode-se optar por outras fontes de exossomos, por exemplo, o leite de cabra. Assim, o presente trabalho se propõe a caracterizar e investigar a possível utilização de exossomos oriundos do leite de cabra no encapsulamento de moléculas bioativas, comparativamente ao uso dos exossomos do leite bovino.

3 REVISÃO DE LITERATURA

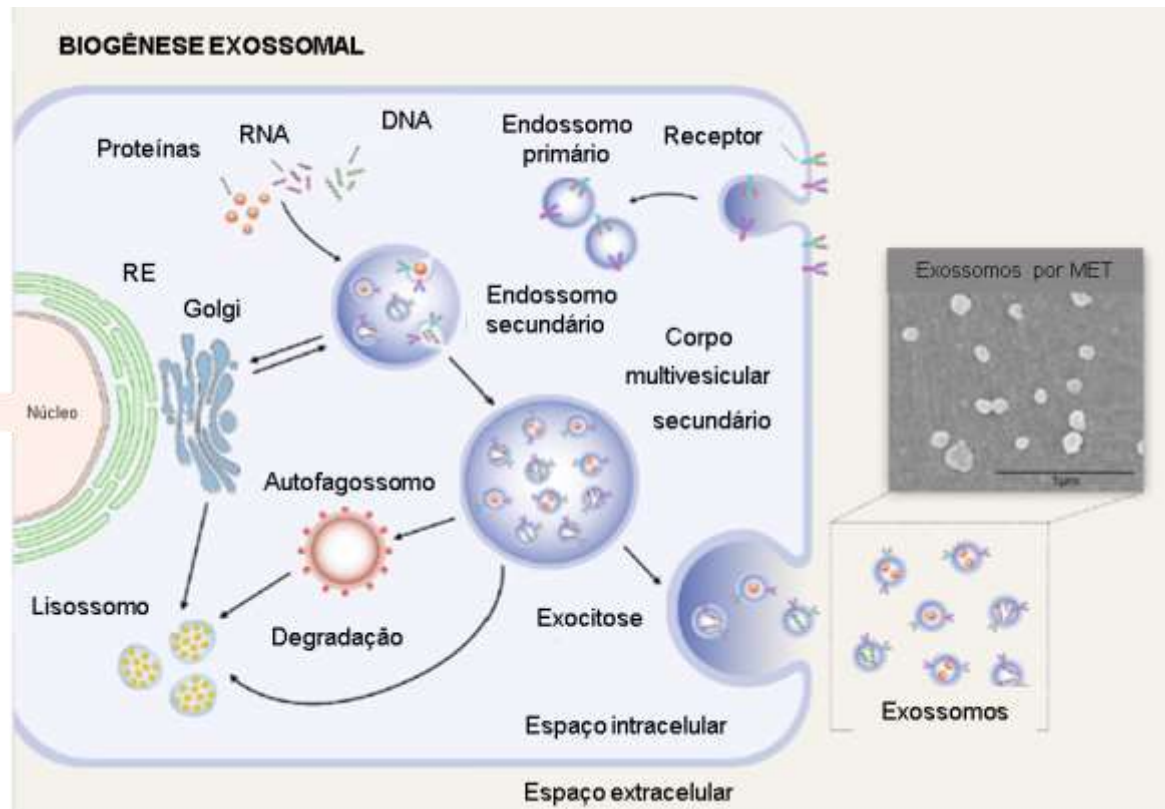
3.1 Exossomos

Os exossomos são vesículas extracelulares secretadas em fluidos corporais, podendo transferir sinais, bem como cargas específicas, de uma célula a outra. Constituem-se como mediadores dos processos de comunicação intercelular, capazes de reprogramar a célula receptora por meio de seu conteúdo (GURUNATHAN et al., 2019). A descoberta dos exossomos no espaço extracelular foi identificada no final da década de 80, quando estes foram considerados somente resíduos resultantes do processo de dano celular, sem nenhum impacto significativo sobre células vizinhas (JOHNSTONE et al., 1987). Apenas recentemente descobriu-se a função dessas vesículas como veículos funcionais capazes de entregar cargas complexas a células alvo (ZHANG et al., 2019).

O processo de biogênese das vesículas exossomais consiste basicamente em três diferentes estágios (Figura 1)

- 1 – Formação das vesículas endocíticas por invaginação da membrana plasmática;
- 2 – Composição dos corpos multivesiculares por múltiplas invaginações da membrana endossomal, com consequente encapsulamento de componentes presentes no citosol;
- 3 – Fusão da membrana dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática celular e secreção das vesículas exossomais (BATISTA et al., 2011).

Figura 1- Biogênese dos exossomos



Processo de biogênese exossomal em células HSY5Y
 Fonte: adaptado de Gurunathan et al., 2019

Baseado nisso, os exossomos podem carrear proteínas provenientes dos endossomos, ou da membrana plasmática, bem como demais componentes presentes do núcleo (DNA e RNA), mitocôndria, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (HOWITT; HILL, 2016). Estudos recentes demonstram que os exossomos participam ativamente de vários processos biológicos como angiogênese, apresentação de antígenos, apoptose, coagulação, homeostase celular e inflamação. Tais funções são atribuídas à sua habilidade de transferir biomoléculas, exercendo assim um papel significativo tanto em estados fisiológicos como em estados patológicos, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, infecções e doenças autoimunes (GURUNATHAN et al., 2019).

A angiogênese consiste na formação de novos capilares a partir de vasos sanguíneos já existentes, e é mediada por um complexo conjunto de eventos. Está associada com vários processos fisiológicos incluindo a proliferação, migração e formação do tubo de células endoteliais, bem como células da musculatura lisa vascular. Evidências apontam para um envolvimento dos exossomos na diferenciação destas células e no processo de neovascularização, o que pode

significar, inclusive, uma nova abordagem terapêutica para casos de doenças isquêmicas no futuro (MERINO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Já a apoptose celular é um processo altamente regulado que ocorre tanto em células saudáveis, como parte de um *turnover* fisiológico, quanto em condições patológicas como câncer, inflamação, infecção e autoimunidade. A influência dos exossomos nesse processo ficou clara quando verificou-se que, em condições malignas como o câncer, essas vesículas forneciam sinais chave capazes de aumentar a habilidade de formar metástase e inibir a apoptose das células tumorais (GREGORY; POUND, 2010). Aparentemente, exossomos oriundos de células cancerígenas apresentam também efeitos citotóxicos sobre células componentes do sistema imune tais como as *Natural Killer* (NK) e induzem a apoptose de outras como os Linfócitos T (ANDREOLA et al., 2002; CLAYTON et al., 2008).

Muitos autores já correlacionaram a ação dos exossomos com processos inflamatórios, sejam eles fisiológicos ou patológicos. A inflamação é uma resposta do sistema imune contra infecções, e é iniciada pelos glóbulos brancos sanguíneos, a fim de restaurar a homeostase tecidual. Estados inflamatórios crônicos geram graves danos aos tecidos, tornando-se os principais responsáveis pelo desencadeamento de diversas doenças (SCRIVO et al., 2011). Em seu estudo, Wu e colaboradores, (2016) demonstraram que exossomos derivados de células gástricas cancerígenas aumentavam os níveis de fatores pró-inflamatórios que, por sua vez, estimulam a migração e proliferação tumoral. Além disso, novos dados evidenciaram ainda a presença de RNAs mensageiros destinados à transcrição de genes ligados à produção de citocinas inflamatórias no conteúdo exossomal (DENG et al., 2009; FERRANTE et al., 2015; LV et al., 2018). Ao serem injetados em camundongos, esses exossomos foram capazes de aumentar a resposta inflamatória e a migração de macrófagos. Sendo assim, inibir a função dessas nanopartículas pode ser uma opção de extrema relevância no tratamento de alguns tumores malignos, bem como no combate de infecções geradas por organismos patogênicos por exemplo (LV et al., 2018).

O processo neuroinflamatório, caracterizado por um alto nível de produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células da glia, também sofre influência direta dos exossomos. Acredita-se que a comunicação entre as células, mediada por essas nanopartículas, seja capaz de desencadear o sinal inflamatório responsável pela instalação de doenças como Parkinson e Alzheimer (GUPTA;

PULLIAM, 2014). Em contrapartida, sabe-se que o correto descarte de componentes celulares em desuso, bem como a comunicação entre células vizinhas, que pode estar associada à neuroproteção, regeneração nervosa, desenvolvimento neural, e plasticidade sináptica também dependem diretamente da ação dos exossomos (KALANI; TYAGI; TYAGI, 2014).

Outro mecanismo fisiológico no qual os exossomos estão implicados é o reparo tecidual. A capacidade terapêutica de exossomos derivados de células tronco mesenquimais tem sido testada em vários modelos de doença, demonstrando uma funcionalidade semelhante ou até superior que a das células propriamente ditas (ZHANG et al., 2019). A eficácia dessas nanopartículas foi confirmada ao verificar-se que eram capazes de diminuir o tamanho da área infartada, após lesão resultante de isquemia-reperfusão no miocárdio (CUI et al., 2017). Além disso, outros estudos constataram que os exossomos proporcionavam efeitos terapêuticos na cura de feridas cutâneas (ZHANG et al., 2015); no reparo de lesões hepáticas e renais agudas (TAN et al., 2014; VAN KOPPEN et al., 2012); lesões pulmonares neonatais (WILLIS; MITSIALIS; KOUREMBANAS, 2018); promoviam a sobrevivência de células ganglionares da retina resultante de lesão de esmagamento do nervo óptico (MEAD; TOMAREV, 2017); ou ainda, orquestravam a proteção neurológica em casos de doenças neuroinflamatórias (XIN et al., 2012).

Dessa forma, entende-se que há uma infinidade de mecanismos possíveis para a atuação destas nanopartículas, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, e que o estímulo adequado ou supressão dessa função podem ser a chave para o tratamento e/ou prevenção de diversas desordens.

3.2 Fisiopatologia e aplicação terapêutica dos exossomos

Estudos extensivos têm sido realizados de modo a explorar o uso de exossomos como veículos para entrega de drogas e no auxílio ao diagnóstico de diversas doenças. A presença de determinados exossomos no plasma de pacientes que receberam tratamento para o câncer tem sido utilizado como método alternativo e não invasivo de diagnóstico, a fim de detectar precocemente e assim impedir a instalação de uma possível recidiva da doença (DEJIMA et al., 2017). Além disso, os pesquisadores acreditam que moléculas presentes em exossomos com potencial

imunossupressor podem ser utilizadas como importantes biomarcadores, tornando-se alvos a serem bloqueados no tratamento da doença (GAO; JIANG, 2018).

A influência dos exossomos no desenvolvimento de metástases de tumores também tem sido investigada. Estudos com células metastáticas oriundas de câncer de mama (ONO et al., 2014) e tumores de células gliais (glioma) (GENG et al., 2012) revelam o envolvimento de exossomos na interrupção do ciclo de divisão celular e indução de um estado de latência para essas células. Sendo assim, a ampla gama de miRNAs, pequenos RNA's não codificadores capazes de regular a expressão gênica, empacotados em exossomos e secretados pelas células tumorais, tornou-se foco de estudos em busca de alternativas terapêuticas mais vantajosas (ONO et al., 2014).

Diante disso, Katakowski (2013) e colaboradores realizaram estudos a fim de identificar o efeito antitumoral do miRNA miR-146b. Após confirmarem essa característica, empacotaram-nos em exossomos secretados por células tronco, e injetaram-nos dentro de tumores intracranianos em ratos. Dez dias após o procedimento, o volume tumoral reduziu significativamente, levando os pesquisadores a crerem que os exossomos podem ter uma ação supressora de tumores, quando carregados com determinados miRNAs dotados de tal capacidade.

Em outro trabalho, Munoz (2013) e colaboradores observaram que células tronco carregadas com nucleotídeos, e cultivadas junto com células de glioblastomas (tumores de origem glial), transferiram seu conteúdo via exossomos para as células cancerígenas, conferindo maior sensibilidade a quimioterápicos, e sugerindo que os exossomos também desempenhem um papel importante na melhora da resposta a estas drogas.

Outra área de pesquisa emergente é a que estuda o papel dos exossomos nas desordens metabólicas. A obesidade, uma patologia frequentemente acompanhada de outras comorbidades, constitui, hoje, uma das principais questões de saúde pública. Dentre os mecanismos pelos quais acredita-se que obesidade leve ao desenvolvimento de doenças associadas, a indução da inflamação em órgãos essenciais como o fígado, tecido adiposo e músculo esquelético tem sido o mais aceito. Supõe-se que as vesículas extracelulares cumpram um papel crucial nessa fisiopatologia, justamente por intermediar a

comunicação intercelular entre os órgãos e as células do sistema imune (KIM et al., 2018).

O diabetes mellitus (DM), uma das comorbidades frequentemente ocasionadas pelo sobrepeso e obesidade, também apresenta correlação com exossomos. De acordo com Guay e colaboradores (2015), as células β pancreáticas interferem na sobrevivência umas das outras por meio da transferência, via exossomos, de miRNAs. Pesquisas revelam que o conteúdo de miRNAs dos exossomos é modificado após a exposição de células β pancreáticas à mediadores inflamatórios e, aparentemente, tais nanopartículas acabam gerando a apoptose das células vizinhas ao serem internalizadas, o que pode estar intimamente associado a quadros de falência pancreática característicos do diabetes mellitus.

Além disso, as nanopartículas também podem interferir na regulação da sensibilidade à insulina, direta ou indiretamente, por meio de duas vias, modulando a inflamação sistêmica, ou por influência na cascata de sinalização do hormônio em órgãos responsivos (DENG et al., 2009; FREEMAN et al., 2018; KRANENDONK et al., 2014).

Recentemente, Ortega e colaboradores (2014) observaram redução nos níveis de dois miRNAs pró-inflamatórios presentes no plasma de pacientes diabéticos, após três meses de administração de metformina, um hipoglicemiante oral largamente utilizado no tratamento do DM. Acredita-se, portanto, que o estudo do perfil de miRNAs circulantes, após a administração de metformina, traga informações importantes sobre prováveis alvos terapêuticos para o desenvolvimento de medicamentos ou estratégias com foco neles (PRATTICIZZO et al., 2016).

O fígado é também um órgão metabólico extremamente importante, devido a ampla gama de funções fisiológicas que desempenha no organismo, e a sua saúde é mantida por complexas interações entre as células hepáticas. A função dos exossomos neste órgão está intimamente relacionada à regulação do processo de regeneração e reparo tecidual. Na lesão tecidual, os hepatócitos comunicam-se entre si por meio de exossomos que promovem o início do ciclo celular que levará a proliferação destas células, a fim de restabelecer regiões danificadas do órgão. Os hepatócitos danificados produzem exossomos que são internalizados por células não parenquimatosas e induzem a diferenciação das mesmas de

quiescentes à miofibroblásticas, estimulando assim o processo de fibrose tecidual (SUNG; KIM; JUNG, 2018).

A biópsia hepática ainda é o padrão ouro para o diagnóstico e determinação de prognóstico de lesões no órgão, entretanto este método apresenta limitações. Além de ser um procedimento invasivo, as amostras colhidas são, em geral, insuficientes para definir o estadiamento da lesão. Sendo assim, a identificação de exossomos provenientes de células do fígado, bem como a dosagem hematológica destes, tem sido descrita como uma boa alternativa frente à biópsia para acessar o grau da lesão hepática (SUMIDA; NAKAJIMA; ITOH, 2014).

No que diz respeito ao tratamento das desordens no fígado, muitas pesquisas exploram o potencial anti-inflamatório e imunossupressor de exossomos derivados de células tronco (HYUN et al., 2015; LI et al., 2013; QU et al., 2017). O uso destas nanopartículas, que são agentes livres de células, contorna alguns dos desafios anteriormente associados ao efetivo transplante de células replicadoras (tronco). O emprego de células tronco como agentes terapêuticos carrega riscos, já que o seu potencial biológico de replicação não cessa, nem mesmo é atenuado, após o término do tratamento. As vantagens de se utilizar exossomos no lugar de células tronco tornam-se, então, evidentes, já que estes desencadeiam respostas imunes mais brandas, são incapazes de formar tumores diretamente, e podem ser armazenadas de maneira segura, sem que haja prejuízos à sua função (SUNG; KIM; JUNG, 2018).

Dentro das desordens neurológicas, a maior contribuição dos exossomos tem sido aplicada às doenças neurodegenerativas, em especial Doença de Parkinson e Alzheimer. Através de sua habilidade em mediar a remoção de proteínas tóxicas e realizar a transferência de moléculas neuroprotetoras, os exossomos despontam nos estudos como nova promessa terapêutica para as doenças neurodegenerativas (CIREGIA; URBANI; PALMISANO, 2017).

A barreira hematoencefálica (BHE) é um grande obstáculo à chegada de compostos terapêuticos. De fato, estima-se que 98% de todas as drogas que poderiam melhorar o tratamento de doenças do SNC não estão em uso clínico devido a sua incapacidade de atravessar a BHE (PARDRIDGE, 2012). Diante disso, Zhuang (2011) e colaboradores resolveram pesquisar três modelos de doenças inflamatórias cerebrais (inflamação induzida por lipopolissacarídeo – LPS; encefalite

autoimune experimental; e modelo para tumor cerebral) em animais e testaram a hipótese de entrega de curcumina, um potente anti-inflamatório, às células do tecido. Os resultados da pesquisa evidenciaram que a administração da curcumina encapsulada em exossomos, e administrada via intranasal, permitiu que os compostos atingissem as células da micróglia e modulassem o processo inflamatório.

O peptídeo amiloide β ($A\beta$), agente patogênico da Doença de Alzheimer (DA), é um metabólito fisiológico, cujos níveis são constantemente controlados no cérebro saudável. Estudos recentes demonstraram que uma fração do $A\beta$ extracelular encontra-se associada a exossomos, o que lhe permite passar por mudanças conformacionais que o converte em fibras amiloides não tóxicas. Além disso, evidências apontam que exossomos atuam facilitando a captura do $A\beta$ pela micróglia, células consideradas macrófagos naturais do SNC. Sendo assim, sugere-se que esta associação aumente os processos de degradação das placas $A\beta$, e que a modulação da secreção dessas vesículas possa influenciar no risco de desenvolvimento da DA (YUYAMA et al., 2012).

Dessa forma, novas pesquisas foram conduzidas de maneira a explorar o potencial terapêutico dos exossomos na DA. Recentemente, Yuyama e colaboradores testaram a hipótese de que exossomos enriquecidos com glicosíngolipídeos de membrana pudessem diminuir o acúmulo de $A\beta$ e as patologias decorrentes disso. Para tanto, os pesquisadores isolaram exossomos derivados de neuroblastomas (tumores de origem cerebral) e administraram no hipocampo de camundongos transgênicos para a proteína precursora $A\beta$. Após o procedimento, verificaram que os exossomos administrados exogenamente aprisionaram o $A\beta$ nos glicosíngolipídeos de superfície e o transportaram para a micróglia, funcionando como potentes depuradores de $A\beta$ no cérebro desses animais (YUYAMA et al., 2014).

3.3 Exossomos do leite como ferramenta para a terapia celular

O desenvolvimento de sistemas efetivamente capazes de entregar drogas a células e tecidos alvo é essencial para o combate de diversas doenças. O veículo ideal deve ser seguro, eficiente e apresentar excelente biodisponibilidade. Os exossomos, nanopartículas naturalmente secretadas por uma variedade de

células, apresentam uma gama de vantagens enquanto veículos para a entrega de drogas: são facilmente isolados de fluidos corporais ou culturas de células; apresentam uma excelente estabilidade plasmática, o que lhes permite percorrer longas distâncias no corpo; possuem habilidade de burlar o sistema imunológico, o que aumenta a sua eficácia e meia vida de circulação; e dispõem ainda de características hidrofílicas e lipofílicas que os torna capazes de carrear drogas solúveis e insolúveis (KUSUMA et al., 2016).

As principais vantagens do uso de exossomos provenientes do leite de mamíferos como forma de entrega de compostos terapêuticos em humanos estão na sua capacidade de produção em larga escala, boa distribuição entre diversos tecidos (se administrados via oral) e biocompatibilidade (IZUMI et al., 2012). Estudos comprovam a capacidade humana de absorção de exossomos do leite bovino por meio de mecanismos de endocitose intestinal, permitindo que estas nanopartículas atinjam a corrente sanguínea, e disponibilizem a sua carga às células de tecidos periféricos (KUSUMA et al., 2016; WOLF; BAIER; ZEMPLIENI, 2015). Exossomos do leite bovino exibem, portanto, boa tolerância entre as espécies, sem efeito imune adverso ou resposta inflamatória. Além da biodisponibilidade, Munagala (2016) e colaboradores descreveram ainda vantagens clínicas na administração de exossomos, via oral, tais como: redução de triglicerídeos, aumento expressivo em níveis de determinadas citocinas anti-inflamatórias e presença de RNA's com função imunoregulatória.

Em relação aos métodos de isolamento, a centrifugação diferencial de fluidos corporais tais como o leite bovino parece ser o método mais eficiente do ponto de vista da produção em larga escala. Além disso, comparando-se um litro de leite bovino com o mesmo volume de sobrenadante de cultura de células, verifica-se um rendimento 200 vezes superior ao obtido com a cultura celular, o que endossa a recomendação de uso do leite como excelente fonte para a extração dessa vesículas (ARNTZ et al., 2015; MITCHELL et al., 2008). Outra grande vantagem verificada com o uso de exossomos do leite é a boa estabilidade que apresentam em ambientes ácidos e quando submetidos a altas temperaturas, o que facilita os mecanismos de isolamento, processamento e armazenamento (CHEN et al., 2010; HOWARD et al., 2015; MATEESCU et al., 2017). Por fim, a possibilidade de transportarem moléculas específicas em sua superfície, aliado ao fato de serem partículas com tamanho extremamente reduzido, lhes confere a possibilidade de

transpor barreiras biológicas (JIANG; GAO, 2017). Assim, diversas pesquisas têm sido conduzidas de forma a explorar a capacidade única dos exossomos de entregar compostos terapêuticos a determinadas células e tecidos.

Dentre as pesquisas mais recentes utilizando exossomos do leite bovino, grandes esforços têm sido direcionados ao estudo do seu potencial de ação como transportador de fármacos e compostos bioativos envolvidos no combate ao câncer. Sendo assim, Munagala (2017) e colaboradores investigaram a ação das antocianinas, compostos com alto poder antioxidante, anti-inflamatório e antiproliferativo em culturas de células cancerígenas.

Apesar de seus incontestáveis efeitos benéficos, as antocianinas apresentam baixa permeabilidade, resultando em pouca biodisponibilidade, quando consumidas de maneira livre via oral. Portanto, os pesquisadores utilizaram isolados de leite bovino *in natura* para formular um sistema de entrega eficiente para antocianinas derivadas de mirtilo. Os resultados comprovaram que a formulação exossomal aumentou os efeitos antiproliferativos e anti-inflamatórios das antocianinas, comparando-se àqueles gerados pela sua forma livre *in vitro* (MUNAGALA et al., 2017).

Outros estudos também exploraram a habilidade de exossomos do leite bovino em melhorar a biodisponibilidade de drogas com potencial anticancerígeno. Esse efeito foi observado por Aqil e colaboradores (2016) quando testaram a ação do celastrol, um composto derivado de plantas com relevância terapêutica em vários tipos de câncer. Os autores encapsularam o fármaco em exossomos isolados do leite, e testaram seu potencial de ação contra linhagens celulares de carcinoma pulmonar. Como resultado, observaram um potencial quimioterápico interessante por parte do celastrol, confirmando ainda a eficácia da formulação exossomal em reduzir os efeitos de toxicidade ligados à dose do composto.

A atividade imunoregulatória desempenhada por miRNAs encapsulados em exossomos de leite bovino também vem sendo estudada em modelos animais para doenças inflamatórias. Pacientes com artrite reumatoide são constantemente aconselhados a consumir leite, embora a literatura ainda seja controversa quanto aos benefícios de se adotar tal hábito (MICHAËLSSON et al., 2014; UDDIN et al., 2010). Sendo assim, pesquisadores decidiram investigar os efeitos da administração via oral de exossomos de leite bovino no desenvolvimento de artrite reumatoide em ratos. Os resultados demonstraram que as nanopartículas foram

capazes de retardar o início da doença, diminuir patologias na cartilagem, e inflamação de medula óssea nos modelos animais estudados. Os autores sugerem que tais efeitos protetores estejam relacionados ao conteúdo de compostos bioativos com efeitos imunorregulatórios e antiinflamatórios – tais como TGF- β e miRNA's - estabilizados dentro dos exossomos do leite bovino (ARNTZ et al., 2015).

Outra recente aplicação terapêutica de exossomos do leite bovino foi avaliada por Li e colaboradores (2019) ao estudarem a enterocolite necrotizante, uma doença intestinal devastadora que ocorre em prematuros com baixo peso extremo. A doença caracteriza-se por severos danos intestinais e produção prejudicada de mucina pelas células caliciformes, uma proteína capaz de formar um muco protetor contra a invasão bacteriana. A cultura de células de cólon humano exposta a exossomos teve como resultado um aumento na expressão de células caliciformes e produção de mucina. Em seguida, a doença foi induzida em modelo animal, e os exossomos do leite foram administrados via gavagem, o que resultou em prevenção do dano morfológico ileal, além de impedir a redução na expressão de células caliciformes e de mucina, comumente observadas durante curso da doença. Sendo assim, a pesquisa destacou o potencial emprego de exossomos do leite bovino na prevenção do desenvolvimento de doença intestinal grave em bebês de alto risco, quando o leite materno não estiver disponível.

A notoriedade que os exossomos vêm ganhando no mundo científico fez com que pesquisadores começassem a investigar novas fontes para extração dessas nanopartículas provenientes de outros mamíferos. Nesse sentido, Ibrahim e colaboradores (2019) avaliaram os efeitos imuno-modulatórios e antioxidantes de exossomos isolados do leite de camelo. Os autores investigaram a ação dessas nanopartículas sobre o estresse oxidativo e a imunotoxicidade gerada por ciclofosfamida, uma droga utilizada no tratamento do câncer, em modelo animal. Os resultados demonstraram que os ratos que receberam os tratamentos tiveram seus níveis de enzimas antioxidantes normalizados, apresentaram redução na produção de citocinas pró inflamatórias (IL- 6 e TNF- α) e melhora na resposta de células do sistema imune. Destaca-se que o grupo que recebeu a suspensão de exossomos teve resultados mais expressivos, quando comparado ao grupo que recebeu o leite *in natura*.

Outra fonte já investigada para o isolamento e aplicabilidade de exossomos em pesquisas científicas foi o leite de laque. Laque é um mamífero nativo

dos platôs do Tibet, habituado a altitudes elevadas (2500 a 6000 m), aonde a disponibilidade de oxigênio acaba sendo limitada. Sabe-se que as células epiteliais intestinais são as grandes responsáveis pela formação da primeira barreira entre o corpo e o meio exterior, e que tanto sua função absorptiva quanto a de construção dessa barreira são reguladas pela disponibilidade de oxigênio (TAYLOR; COLGAN, 2007). Dessa forma, Gao e colaboradores (2019) estudaram a ação dos exossomos do leite desses mamíferos na regulação da proliferação de células de epitélio intestinal sob condições de hipóxia.

Ao compararem a ação dos exossomos do leite de laque com os do leite de vaca, concluíram que os primeiros aumentaram significativamente a sobrevivência das células intestinais incubadas em condições de hipóxia por 12 h. Além disso, as análises realizadas por microscopia confocal revelaram que as células intestinais capturaram mais exossomos de leite de laque que de leite de vaca, quando submetidos às mesmas condições de hipóxia. Por fim, observou-se que as células incubadas com os exossomos do leite de laque produziam menores quantidades da proteína p53, o principal regulador negativo do ciclo celular (GAO et al., 2019).

Em outro estudo, Xie e colaboradores (2019) analisaram os efeitos dos exossomos do leite de porco sobre os danos intestinais causados por exposição a lipopolisacarídeos (LPS) presentes na membrana de bactérias gram negativas. *In vivo*, observou-se que os exossomos preveniram o dano intestinal causado por LPS e inibiram o processo inflamatório. *In vitro*, os exossomos foram capazes de inibir a apoptose celular. A presença de miRNAs (miR-4334 e miR-219) atenuou o processo inflamatório por meio da inibição da via do NFκB, a principal via de sinalização de inflamação induzida por LPS. Já o miR-338 foi responsável por impedir a apoptose celular via inibição da p53. Os autores concluíram então que os exossomos do leite de porco protegem as células de epitélio intestinal inibindo o processo inflamatório e protegendo contra a apoptose através da ação de miRNAs exossomais. Os resultados apresentados sugerem que as quantidades fisiológicas de exossomos enriquecidos com miRNAs adicionados à fórmulas infantis possam ser usadas como uma nova medida preventiva para doenças como a enterocolite necrosante, em caso de impossibilidade de aleitamento materno.

Diante disso, verifica-se a grande notoriedade que os exossomos do leite de mamíferos vêm demonstrando no tratamento de diversas doenças e que pesquisas nesse sentido tornam-se cada vez mais promissoras.

3.4 Riscos potenciais no uso dos exossomos como biofármacos

Diante de incontestáveis vantagens tais como: baixa antigenicidade, excelente biodisponibilidade, e facilidade de transposição de barreiras fisiológicas, a farmacologia despertou grande interesse para o uso de exossomos provenientes do leite como potenciais sistemas de entrega de compostos terapêuticos (BETKER et al., 2019; MUNAGALA et al., 2016). No entanto, há de se considerar que, além dos compostos de interesse, os exossomos do leite também transportam sua carga intrínseca, a qual, eventualmente, poderá ser composta por miRNAs oncogênicos, bem como proteínas ligadas à tumorigênese.

A restrição do consumo de leite ao período pós-natal deveria ser assegurada pela diminuição na produção da enzima lactase, característica comum a todos indivíduos em fase de desmame. No entanto, a existência de mutações genéticas que permitem a produção prolongada dessa enzima, bem como o uso de artifícios provenientes da indústria farmacêutica, permite que os humanos prossigam com o consumo de laticínios até a fase adulta (MELNIK et al., 2016; MELNIK; JOHN; SCHMITZ, 2013; MELNIK; SCHMITZ, 2017b; PERGE et al., 2017).

Atualmente, são conhecidos mais de 400 miRNAs e proteínas encapsuladas nos exossomos do leite bovino (CAI et al., 2018; HATA et al., 2010; KOH et al., 2017) que contam com uma enorme semelhança em relação à carga genética transportada por exossomos da espécie humana (HERWIJNEN et al., 2018). Como o sistema de sinalização por exossomos é arcaico e altamente conservado em todos os mamíferos, alguns miRNAs exibem um alto grau de homologia sequencial entre as espécies. Sendo assim, infelizmente, os benefícios conferidos pelos exossomos do leite materno durante o desenvolvimento infantil, podem ser substituídos por sinalizações obesogênicas, diabetogênicas, cancerogênicas e neurodegenerativas na idade adulta, caso o consumo de leite seja prolongado. Dentre os miRNAs homólogos destacam-se o miR-148a, miR-21, miR-29b, e miR-155 que são exatamente iguais aos encontrados na espécie humana (GOLAN-GERSTL et al., 2017; HERWIJNEN et al., 2018). Esforços empregados

para melhorar a performance de lactação e produção de vacas leiteiras parecem aumentar a expressão de miR-148a, miR-21, e a consequente transferência destes para os consumidores humanos (MELNIK; SCHMITZ, 2017a). A tabela 1 traz as principais correlações entre a tradução desses genes e a patogênese de doenças ocidentais mediadas por exossomos.

Tabela 1 - Evidências traducionais para patogênese de doenças ocidentais mediadas por exossomos do leite bovino

Componente de exossomo do leite	Potencial envolvimento patogênico
miR-148a	Aterosclerose, obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hiperfagia, câncer de próstata, câncer de mama, osteoporose e Carcinoma hepatocelular associado à hepatite-C
miR-21	Adipogênese, macrosomia fetal, câncer de próstata, câncer de mama, osteoporose, carcinoma hepatocelular, linfoma difuso de células B
miR-29b	Diabetes Mellitus tipo 2
miR-155	Câncer de mama, Carcinoma hepatocelular associado à hepatite-C, linfoma difuso de células B, Doença de Parkinson e câncer de próstata.
TGF-β	Câncer de mama, câncer de próstata e osteoclastogênese
Lipídeos exossomais	Doença de Parkinson

Fonte: Adaptado de Melnik e Schmitz, 2019.

Sabe-se que essas vesículas são capazes de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI) (BENMOUS et al., 2016; PIETERS et al., 2015), e sofrem endocitose pelas células do epitélio intestinal e células endoteliais vasculares. Dessa forma, são capazes de atingir tecidos distantes no organismo e acabam rompendo os limites entre as espécies (ARNTZ et al., 2015; KUSUMA et al., 2016; MUNAGALA et al., 2016; WOLF; BAIER; ZEMPLIENI, 2015). A transferência de miRNAs encapsulados nos exossomos do leite bovino é considerada uma das mais importantes comunicações epigenéticas entre espécies e que pode estar relacionada à patogênese de diversas doenças. Sendo assim, antes que os exossomos despontem em pesquisas clínicas como sistemas de administração de drogas e compostos bioativos, ou mesmo que sejam empregados como suplementos de fórmulas infantis, novos estudos são necessários, a fim de se avaliar seu papel intrínseco na transmissão de miRNAs, bem como sua potencial habilidade de transferência de demais patógenos (MELNIK; SCHMITZ, 2019).

3.5 Albumina 2S de *Moringa oleifera*

Moringa oleifera Lamarck é uma planta nativa da Índia com vasta distribuição pelo mundo, especialmente em países tropicais. É conhecida como uma árvore multipropósito, em virtude de sua versatilidade de uso, podendo ser empregada tanto como alimento, quanto na medicina tradicional e popular, bem como na indústria. A partir desta espécie foram isoladas proteínas pertencentes à classe das proteínas ligantes à quitina, um grupo de moléculas isoladas de diferentes fontes, como bactérias e plantas, que interferem no crescimento de fungos, em virtude de sua afinidade pela quitina, polissacarídeo presente na parede celular desses microrganismos. A aplicabilidade dessas proteínas naturais tem sido vastamente discutida pela literatura nas últimas décadas, mas o principal interesse no uso delas é o seu potencial emprego na proteção de culturas agrícolas (PINTO et al., 2015).

Os fungos são responsáveis por diversas doenças que atacam vegetais, causando sérios danos em plantações e diminuindo assim a produtividade (LABANDEIRA; PREVEC, 2014; MANDAL et al., 2013). Além disso, o controle químico desses microrganismos está altamente associado a efeitos tóxicos e perigosos tanto para o meio ambiente, quanto para os demais organismos não alvo, incluindo o ser humano (MAREI; ABDEL RASOUL; ABDELGALEIL, 2012; MENG et al., 2010; YADAV S; TOMAR AK; YADAV RN, 2013). Sendo assim, estratégias modernas para confrontar esse problema tornam-se cada vez mais urgentes, e incluem a alternativa de melhoramento genético de plantas, com o objetivo de produzir espécies transgênicas capazes de expressar características definidas. Esforços significativos têm sido direcionados então para a identificação de compostos com potencial antifúngico que podem ser utilizados para produzir plantações resistentes a patógenos (PINTO et al., 2015).

A proteína ligante à quitina *Mo-CBP₃* (*M. oleifera* – Chiting-Binding Protein), é oriunda das sementes dessa espécie de plantas e possui um largo espectro de atividade contra importantes fungos fitopatogênicos (GIFONI et al., 2012). Em relação a seus atributos estruturais, a *Mo-CBP₃* apresenta-se como uma glicoproteína de massa aparente de 18 KDa, apresentando múltiplas isoformas heterodiméricas compostas por duas diferentes cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfeto. É uma proteína extremamente estável, sendo capaz de manter

sua estrutura secundária e sua capacidade antifúngica mesmo em condições extremas de temperatura e pH (BATISTA et al., 2014).

Diante desse grande potencial, estudos foram realizados a fim de investigar a segurança alimentar no uso da *Mo*-CBP₃. De acordo com os níveis de abordagem propostos pelo International Life Sciences Institute (ILSI), o histórico de uso seguro, modo de ação, e resultado para homologia sequencial de aminoácidos, indicam baixo risco associado a esta proteína. A homologia sequencial é feita comparando-se a sequência de aminoácidos primária da proteína em questão com a mesma estrutura de proteínas alergênicas, tóxicas ou antinutricionais. Considerando que não há consenso a respeito da definição destes termos (alergênico, tóxico e antinutricional), como método conservador, a comparação é feita a partir de bancos de dados gerais, que contêm todas as sequências proteicas disponíveis (PINTO et al., 2015). A análise de sete grandes bancos de dados permitiu concluir que a *Mo*-CBP₃ não demonstrou identificação sequencial com nenhuma proteína tóxica, alergênica ou antinutricional, entretanto estudos revelam características inerentes à proteínas alergênicas tais como resistência à digestão por pepsina durante 2 horas (apesar de ter sido susceptível à pancreatina) (PINTO et al., 2015).

As propriedades antifúngicas da *Mo*-CBP₃ são baseadas em alterações causadas na superfície celular. Acredita-se que esta proteína seja capaz de permeabilizar a membrana plasmática do fungo, interferindo direta ou indiretamente na bomba de prótons responsável pela manutenção do pH intracelular e gradiente eletroquímico. A ação da *Mo*-CBP₃ gera assim prejuízos ao tráfego de substâncias através da membrana, o que pode levar à morte celular (BEN-JOSEF et al., 2000; MELLO et al., 2011). Outro mecanismo de ação proposto em relação ao potencial antifúngico da *Mo*-CBP₃ é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). Após sua ligação com componentes da membrana celular, verificou-se que a *Mo*-CBP₃ induziu a produção de EROS em esporos do fungo fitopatogênico *Fusarium solani*. Sendo assim, um aumento na geração de EROS, que excede a capacidade neutralizadora do fungo, promove um estresse oxidativo, podendo causar hiperoxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando à morte celular (GESSLER; AVER'YANOV; BELOZERSKAYA, 2007).

Considerando o uso indiscriminado de medicamentos antibióticos e antifúngicos, o crescimento e propagação de microrganismos resistentes a drogas convencionais cresceu a passos largos. A fim de evitar que a resistência a essas drogas torne-se uma calamidade de saúde pública, novas estratégias precisam ser pensadas (OLIVEIRA et al., 2019). Peptídeos e proteínas antimicrobianas são facilmente encontrados em muitos organismos, e estão sendo apontados como prováveis substitutos ou adjuvantes em terapias antimicrobianas tradicionais. Sua principal vantagem é o fato de não gerarem resistência, justamente por atuarem em nível de membrana celular, ao contrário das drogas tradicionais, que atuam em vias biossintéticas específicas. Dessa forma, os mecanismos de resistência tornam-se muito mais difíceis, já que os patógenos teriam que modificar constituintes de membrana, o que é metabolicamente muito dispendioso para a célula (DONG et al., 2014; ZASLOFF, 2002). Diante disso, pesquisas que investiguem a possibilidade de produção em larga escala de biofármacos utilizando proteínas antimicrobianas derivadas de plantas são de grande destaque para o enfrentamento dessas questões.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Purificar e caracterizar exossomos provenientes dos leites de cabra e de vaca e avaliar a capacidade de encapsulamento de uma proteína ligante à quitina de *Moringa Oleifera* ($Mo-CBP_3$) para transporte e entrega a uma linhagem de células humanas.

4.2 Específicos

Isolar exossomos do leite de cabra e de vaca;

Caracterizar os exossomos oriundos de leites caprino e bovino;

Carregar exossomos isolados dos leites bovino e caprino com uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera*, $Mo-CBP_3$;

Identificar a melhor metodologia de encapsulamento das biomoléculas;

Comparar a eficácia do uso de exossomos do leite de cabra com os exossomos do leite de vaca como veículo de entrega de compostos bioativos à linhagem de células de hepatocarcinoma humano (Hep-G2).

5 METODOLOGIA

5.1 Isolamento dos exossomos de leite bovino e caprino

A obtenção dos exossomos do leite foi realizada de acordo com a metodologia de Kusuma e colaboradores (2016) com modificações. O leite de vaca (LV) e de cabra (LC) UHT (*ultra high temperature*) foram adquiridos em mercados locais e utilizados como fonte para o isolamento de exossomos. As amostras de leite foram centrifugadas em tubos de 38 mL por meio da ultracentrífuga da marca *Beckman Coulter*, modelo *Optima XE-90 Ultracentrifuge*.

Primeiramente, as amostras foram centrifugadas a 13.200 x g, a 4°C, por 35 minutos para precipitar debris e células somáticas. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 30.000 x g, a 4°C por 60 minutos para remoção de proteínas precipitadas, glóbulos de gordura, e vesículas maiores que exossomos.

A suspensão foi então ultracentrifugada a 80.000 x g, a 4°C, por 60 minutos para a retirada de agregados de caseína. Por fim, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 120.000 x g, a 4°C, por 90 minutos, para coleta de exossomos. O precipitado com exossomos foi ressuspenso com quantidade mínima de tampão fosfato salino (PBS) contendo 0,01% de azida de sódio e posteriormente armazenado a -80°C (Adaptado de Kusuma et al. 2016).

5.2 Caracterização de exossomos de Leite Bovino e Caprino

Os exossomos foram caracterizados quanto à distribuição de tamanhos e morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) com o apoio da Central Analítica, órgão suplementar vinculado à Universidade Federal do Ceará. Para o preparo das amostras os exossomos foram fixados em solução Karnovsky (glutaraldeído 1% (v/v) + paraformaldeído 4% (v/v)), preparado em tampão fosfato de sódio 0,15 M pH 7,2) e transferidas para lamínulas previamente adesivadas com gelatina 1%. Em seguida, foram tratadas com tetróxido de ósmio 0,1% e posteriormente, lavadas em tampão PBS. Após lavagem, as amostras foram desidratadas utilizando uma série de solução etanólica de 10, 30, 50, 70, 90 100% (com incubação de 10 minutos em cada concentração). Em seguida, foram secas em solução de etanol/hexametildisilazano (HMDS), 50/50 (v/v), seguido de imersão

em HMDS 100% (incubação de 10 minutos em cada condição). Para facilitar a observação, as amostras foram cobertas com uma fina camada de ouro, utilizando um metalizador. Por fim, as imagens foram coletadas em MEV (Quanta 450 FEG – FEI) sob 20 kv com aumento de 50.000 e 100.000 vezes.

A proteínas de membrana presentes nos exossomos foram quantificadas, utilizando-se o protocolo de Bradford adaptado para microplacas (BRADFORD, 1976). A absorbância das amostras foi analisada por meio leitor de microplacas Synergy 2 (Biotek, USA) a 595 nm.

5.3 Conjugação da albumina de *Moringa oleifera* (Mo-CBP₃) com Isotiocianato de fluoresceína (FITC)

A albumina de *Moringa Oleifera*, Mo-CBP₃ (*Moringa oleifera* - Chitin binding protein) foi gentilmente doada pelo Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Foi preparada uma solução padrão da proteína na concentração de 4 mg/ml em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9. Em seguida, dissolveu-se o FITC em DMSO anidro na concentração de 1 mg/ml. Para cada ml de solução proteica adicionou-se 100 ul de solução do fluoróforo em alíquotas de 5 ul. Após esta etapa, a solução foi incubada no escuro, *overnight*, a 4 °C, sendo posteriormente adicionado cloreto de amônio (concentração final de 50 mM) e incubado por mais 2 h a 4 °C, a fim de suspender a reação de conjugação. Por fim, o fluoróforo não conjugado foi separado por meio de filtração em gel. O protocolo de conjugação da proteína com o fluoróforo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich).

A concentração final de proteína conjugada foi determinada por meio da detecção da intensidade de fluorescência da amostra por espectrofotometria de fluorescência (comprimento de onda de excitação de 495 nm e de emissão de 525 nm), utilizando o leitor de microplacas Synergy 2 (Biotek, USA).

5.4 Encapsulamento da *Mo*-CBP₃ em exossomos do leite bovino e caprino

As alíquotas de exossomos obtidas por ultracentrifugação de amostras de leite bovino e caprino foram diluídas com PBS a uma concentração padrão de 5 ug/ul. A partir destas, quatro metodologias para a incorporação da *Mo*-CBP₃ foram realizadas: eletroporação, sonicação, choque térmico e incubação à temperatura ambiente na presença de saponina (0,2%). Utilizou-se uma proporção 1 para 1 de proteína exossomal e *Mo*-CBP₃ (500 ug de cada).

5.4.1 Eletroporação

A solução contendo 500 ug de proteínas exossomais foi adicionada a *Mo*-CBP₃ respeitando a proporção acima descrita. O volume final de 200 ul foi alcançado por meio da adição de PBS. Ambas as soluções (leite de cabra ou leite de vaca com *Mo*-CBP₃) foram então transferidas para cubetas de 4 mm, e submetidas a eletroporação (450 V, 2 pulsos de 15 ms) usando eletroporador Multiporator (Eppendorf, Alemanha). Após o procedimento, a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos, a fim de garantir que a membrana plasmática dos exossomos se recuperasse totalmente da abertura instantânea de poros gerada pela ação da eletroporação (adaptado de TIAN et al., 2014). Em seguida, a amostra foi armazenada a – 20 °C.

5.4.2 Sonicação

Os exossomos e a proteína *Mo*-CBP₃ foram adicionados nas mesmas condições descritas anteriormente. O volume de 1000 ul foi atingido adicionando-se PBS à solução. Cada amostra (leite de cabra ou leite de vaca), foi então submetida à sonicação em sonicador Q55 (Qsonica, EUA) a uma amperagem fixa de 50 mA. Foram realizados 6 ciclos de 2 s de pulso por 10 s de pausa. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo por 2 minutos, e depois submetidas a nova sonicação, respeitando as mesmas condições anteriormente descritas (adaptado de HANEY et al., 2015). Após o procedimento, a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos, e então armazenada a – 20 °C.

5.4.3 Choque Térmico (CT)

Novamente, as mesmas quantidades de proteína exossomal e *Mo-CBP₃* foram solubilizadas nas mesmas condições, a fim de se realizar a metodologia do choque térmico. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, e então rapidamente submetidas a ciclos de congelamento, utilizando Nitrogênio líquido, e descongelamento em temperatura ambiente. O ciclo de choque térmico foi repetido três vezes, até que as amostras fossem armazenadas, posteriormente, a – 20 °C (adaptado de HANEY et al., 2015).

5.4.4 Incubação em Temperatura ambiente (TA) na presença de saponina

Para a realização da quarta metodologia de encapsulamento da proteína nos exossomos, utilizou-se a mesma proporção de exossomos e albumina da moringa já mencionada, e adicionou-se 20 ul de uma solução de saponina (10%). Em seguida, completou-se o volume final de 1000 ul com PBS, atingindo uma concentração de 0,2% de saponina na solução final.

A mistura foi agitada em shaker a 37 °C durante 20 min, e em seguida, incubada a temperatura ambiente durante 18 h.

Após a realização das quatro metodologias, as amostras foram então lavadas em PBS por meio de ultracentrifugação a 120.000 x g por 1h e 30 min, a fim de remover as proteínas que, eventualmente, não foram incorporadas. O precipitado de exossomos foi então ressuscitado no menor volume possível de PBS e armazenado a – 80°C (adaptado de HANEY et al., 2015).

5.5 Análise de encapsulamento da proteína *Mo-CBP₃*

A eficácia das metodologias de encapsulamento foi confirmada através da detecção da fluorescência do FITC por espectrofotometria de fluorescência (emissão 525 nm e excitação a 495 nm), utilizando o leitor de microplacas Synergy 2 (Biotek, USA). Para isso, 100 uL de cada uma das amostras (concentração final de 1 ug/uL), bem como dos controles positivo (*Mo-CBP₃*, concentração final 1 ug/uL) e negativo (exossomos vazios) foram aplicadas em duplicata em placas de 96 poços, e, em seguida, foi realizada a leitura.

Outra técnica utilizada para verificar de carregamento dos exossomos foi a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS - PAGE). A proteína (albumina da moringa *Mo*-CBP₃) previamente encapsulada e não conjugada ao fluoróforo, foi extraída por meio de choque térmico congelando-se as amostras em nitrogênio líquido e descongelando-as em banho seco a 70 °C por três vezes. Após isso, foi feita a precipitação da proteína por incubação com ácido tricloroacético a 12,5% (TCA) na proporção de 300 uL de ácido para cada mL de amostra. Os exossomos vazios (controle negativo) também passaram pelo mesmo processo. Após a incubação com o ácido durante 30 minutos a -20 °C, as proteínas foram então lavadas com acetona e centrifugadas a 10000g, 10 °C durante 10 minutos por três vezes.

Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho seco (Cool Block ALB 6400, FINEPCR, Korea) a 70 °C durante 10 minutos na presença de Tampão de amostra (Tris-HCL 0,0625 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS, 20% de glicerol e azul de bromofenol). A partir daí, alíquotas de cada amostra (8uL, na concentração de 5,3 ug/uL) foram aplicadas em poços de placas (8,5 cm x 8 cm) contendo gel de aplicação, constituído de 4% de acrilamida e 1% de SDS, preparado com tampão Tris-HCL 0,5 M, pH 6,8, e gel de separação de poliacrilamida 15% (p/v) e 1% de SDS, preparado em tampão Tris-HCL 3,0 M, pH 8,8.

O gel foi então submetido à corrente constante de 400 mA e 180 V por aproximadamente 1 h. As bandas proteicas, assim como o marcador de peso molecular, foram detectadas corando-se o gel com solução de azul de Coomassie (0,25% de coomassie brilhante blue; 45% de metanol; 10% de ácido acético) durante 1 h. Após esse procedimento, o gel foi então descorado com solução descorante (30% de metanol e 10% de ácido acético). Como padrões de massa molecular foram usados fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunits (20,1 kDa) e 2-lactoalbumina (14,4 kDa) (GE Healthcare).

As proteínas submetidas a separação por SDS-PAGE (15%) foram então transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinil (PVDF) em cuba de eletrotransferência *semi-dry* com tampão de transferência 3 - (ciclohexilamino) -1 - propanesulfônico (CAPS), sob amperagem constante de 120 mA por 30 minutos. Após transferência, os sítios inespecíficos presentes nas membranas foram bloqueados utilizando-se solução de bloqueio (PBS contendo leite desnatado a 5%,

p/v) *overnight*. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho (anti-*Mo*-CBP₃) (GARCIA et al., 2019), na diluição de 1:5000, por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, passaram por processo de lavagem: realizou-se 3 lavagens com duração de 10min em PBS-T, sob agitação contínua.

Por fim, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) conjugado com peroxidase, na diluição de 1:5000 por mais 1 hora, sob agitação. Para retirada do anticorpo não ligado, as membranas foram novamente lavadas com PBS-T, conforme descrito acima. A visualização das bandas proteicas foi realizada a partir do processo de revelação, feito por meio de imersão das membranas em solução de DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride).

5.6 Ensaio de incubação de exossomos com linhagem celular

Para atestar a capacidade de entrega de seu conteúdo, os exossomos carregados com *Mo*-CBP₃ foram incubados com a linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma humano). As células foram gentilmente disponibilizadas pelo laboratório de biotecnologia e biologia molecular da Universidade Estadual do Ceará (UECE), e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified - Eagle's Medium (DMEM), adquirido da empresa Vitrocell, contendo bicarbonato de sódio, glutamina, antibiótico e antimicótico, e suplementadas com 10% de soro fetal bovino. As células foram distribuídas em placas de 24 poços (1 x 10⁵ células por poço), onde foram incubadas durante 24 horas com os seguintes tratamentos: 1- amostras de exossomos vazios, 2 - exossomos carregados com a proteína *Mo*-CBP₃ conjugada com FITC, de acordo com as metodologias descritas acima (eletroporação, sonicação, TA e CT), 3 - apenas a proteína conjugada com o fluoróforo, todos na concentração de 0,1 ug/uL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. As células foram posteriormente analisadas por microscopia confocal (LM710-Confocal – Zeiss) com laser a 488 nm, aonde verificou-se a intensidade do sinal de fluorescência emitido pelo FITC; em seguida, as imagens foram processadas e a fluorescência quantificada usando o software ImageJ (University of Wisconsin-Madison).

5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0, e diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. O teste t ou o teste Tukey foi usado para valores de p de diferentes grupos. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD).

5.8 Colaborações interinstitucionais para a execução do projeto

Este projeto foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade estadual do Ceará (UECE) em parceria com o Laboratório de Toxinas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Além disso, contamos ainda com o apoio da Central Analítica, órgão suplementar da UFC, que dispõe de infraestrutura em técnicas analíticas e de microscopia.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e caracterização dos exossomos

Diante da diversidade de métodos experimentais para isolamento de nanopartículas, fontes e espécies biológicas distintas, bem como variação na instrumentação empregada, há na literatura uma gama de protocolos e interpretações acerca dos processos de purificação e caracterização de VEs. Visando uma melhor padronização, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (SIVE) definiu então critérios mínimos a serem empregados na caracterização das VEs. Portanto, para que seja minimamente possível a identificação de VEs em determinada amostra, as nanopartículas devem ser provenientes de fluidos corporais ou do sobrenadante de culturas de células, e o método de isolamento deve ser suave, evitando a lise celular e a consequente contaminação do material isolado com conteúdo proveniente de compartimentos intracelulares (ARALDI et al., 2012).

Considerando isso, no presente estudo, optou-se pela realização da Ultracentrifugação Diferencial (UD) como método para o isolamento das nanopartículas, já que, quando comparada a outras metodologias, a UD foi capaz de isolar os exossomos com sucesso, sem que ocorressem danos em suas superfícies (YAMAUCHI et al., 2019).

Em relação à caracterização das nanopartículas, a recomendação é que seja feita uma análise geral de composição proteica das amostras, incluindo descrição ou quantificação desses componentes (LÖTVALL et al., 2014). Sugere-se que os pesquisadores identifiquem proteínas de interesse, especialmente transmembrana, ou outras de origem citosólica. Sendo assim, muitos estudos utilizam a técnica do Western Blotting durante esta etapa (GAO et al., 2019; KALANI et al., 2014, 2016; MA et al., 2017). No entanto, à medida que as análises proteômicas foram sendo realizadas, ficou claro que proteínas transmembrana não podem ser consideradas bons marcadores específicos para exossomos, já que outras VEs apresentam um perfil proteico muito parecido (LÖTVALL et al., 2014).

Além disso, embora espere-se que exossomos de diferentes fontes tenham pelo menos um conjunto de proteínas em comum, o que se observa, na realidade, é a existência de uma assinatura molecular própria, que vai variar de

acordo com a natureza e as condições da célula de origem no momento da liberação exossomal (CORRADO et al., 2013). Outra descoberta interessante ocorreu após análises realizadas dentro de uma mesma amostra de exossomos, extraída de cultura de células intestinais humanas. Evidenciou-se a existência de duas subpopulações distintas de exossomos, e verificou-se que tais subpopulações eram idênticas em termos de tamanho e propriedades morfológicas, mas divergiam em termos de perfis proteicos (TAURO et al., 2013).

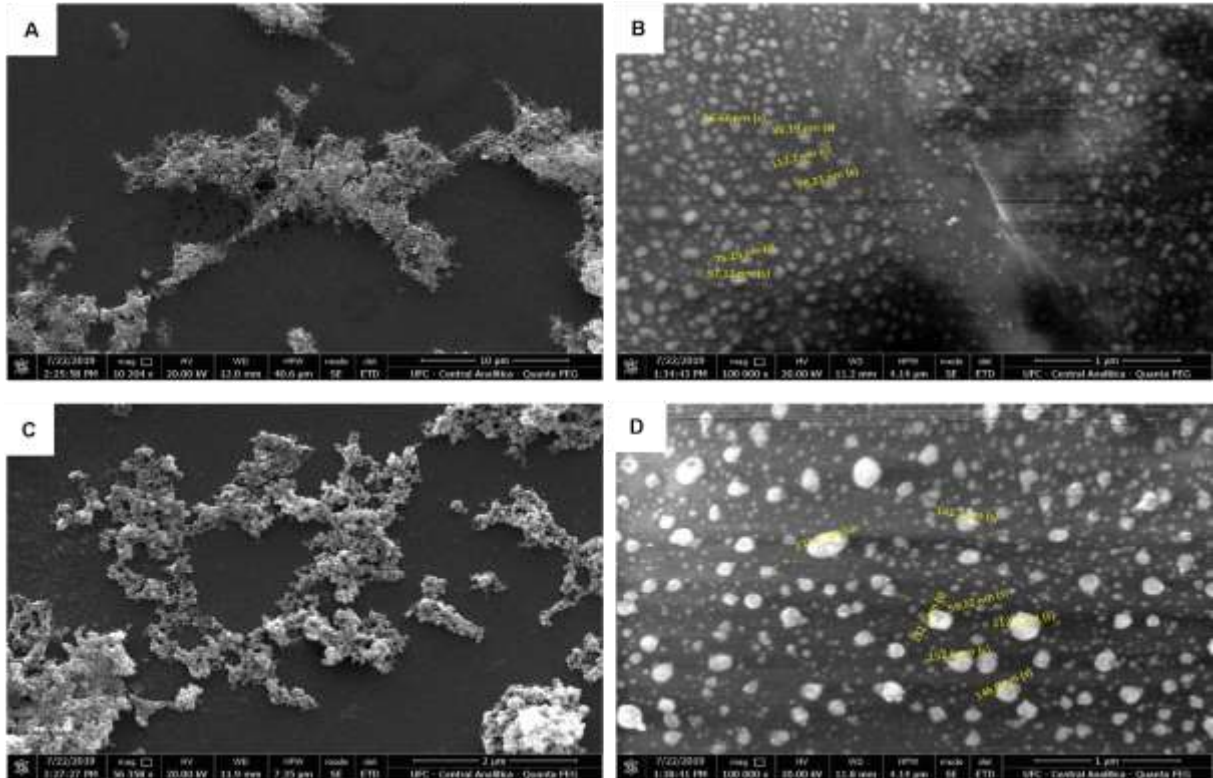
Diante disso, percebe-se uma real dificuldade na padronização de perfil proteico dessas estruturas, já que a interferência de diversos fatores ficou bastante nítida conforme foram avançando os estudos, portanto, no presente estudo, decidimos considerar apenas a quantificação das proteínas de membrana como forma de análise geral da composição proteica das amostras.

Após isolamento dos exossomos de leite bovino e caprino verificou-se que o conteúdo de proteínas de membrana foi semelhante entre eles, apresentando concentrações médias de 36,6 e 30 mg/mL, respectivamente. Esse parâmetro, utilizado anteriormente por diversos autores (Alvarez-Erviti et al., 2011; EL-ANDALOUSSI et al., 2012; GUAY et al., 2015; Haney et al., 2015) serviu como referência para estimar a quantidade de nanopartículas a serem empregadas nos ensaios posteriores.

Outra recomendação em termos de caracterização exossomal diz respeito à análise morfológica de vesículas individualizadas. Para tanto, pode-se optar por diferentes técnicas tais como microscopia eletrônica ou microscopia de força atômica (LÖTVALL et al., 2014). No presente estudo utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como forma de caracterização morfológica dos exossomos isolados (Figura 2). As imagens obtidas revelaram que tanto as vesículas de leite de cabra quanto as de vaca se apresentam, em sua maioria, como estruturas esféricas. Essa mesma característica também foi constatada por outros autores que analisaram exossomos de leite bovino por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (KUSUMA et al., 2016; MUNAGALA et al., 2017).

De acordo com a SIVE, a recomendação para análises realizadas por microscopia eletrônica é que as imagens geradas exponham tanto campos mais amplos, abrangendo múltiplas vesículas (Figura 2, a e c), quanto imagens mais aproximadas identificando vesículas únicas (Figura 2, b e d) (LÖTVALL et al., 2014).

Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura de exossomos de leite caprino e bovino.

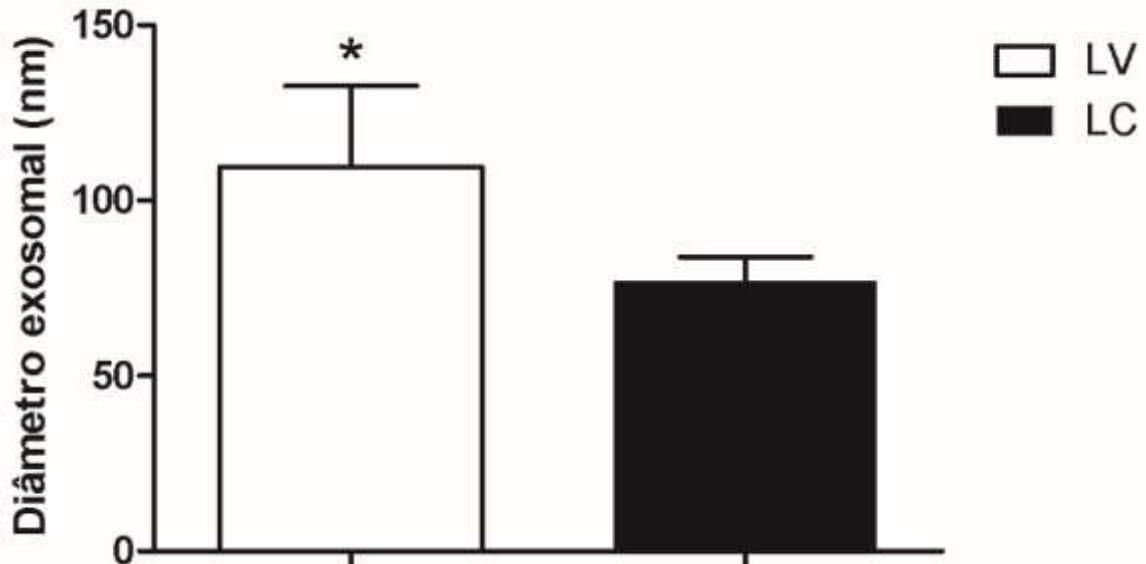


Imagens representativas de exossomos do leite de cabra (A) e do leite de vaca (C) em magnificação de 10.000 vezes. Tamanho e morfologia dos exossomos do leite de cabra (B) e do leite de vaca (D) em magnificação de 100.000 vezes. Em amarelo apresentamos o diâmetro de algumas nanopartículas distribuídas nas amostras.

Fonte: elaborado pela autora

A análise das vesículas de maneira individualizada permitiu a avaliação de seus diâmetros, e assim conclui-se que os exossomos do leite bovino são maiores que os do leite caprino, com diâmetros médios de $109,6 \text{ nm} \pm 23,14$ e $77,06 \text{ nm} \pm 23,14$, respectivamente (Figura 3). Medidas semelhantes as do LV puderam ser observadas em outros estudos que avaliaram exossomos do leite bovino por meio de microscopia eletrônica ou microscopia de força atômica (MFA) (Aqil et al., 2016; Arntz et al., 2015).

Figura 3 - Diâmetro médio de exossomos de leite bovino e caprino



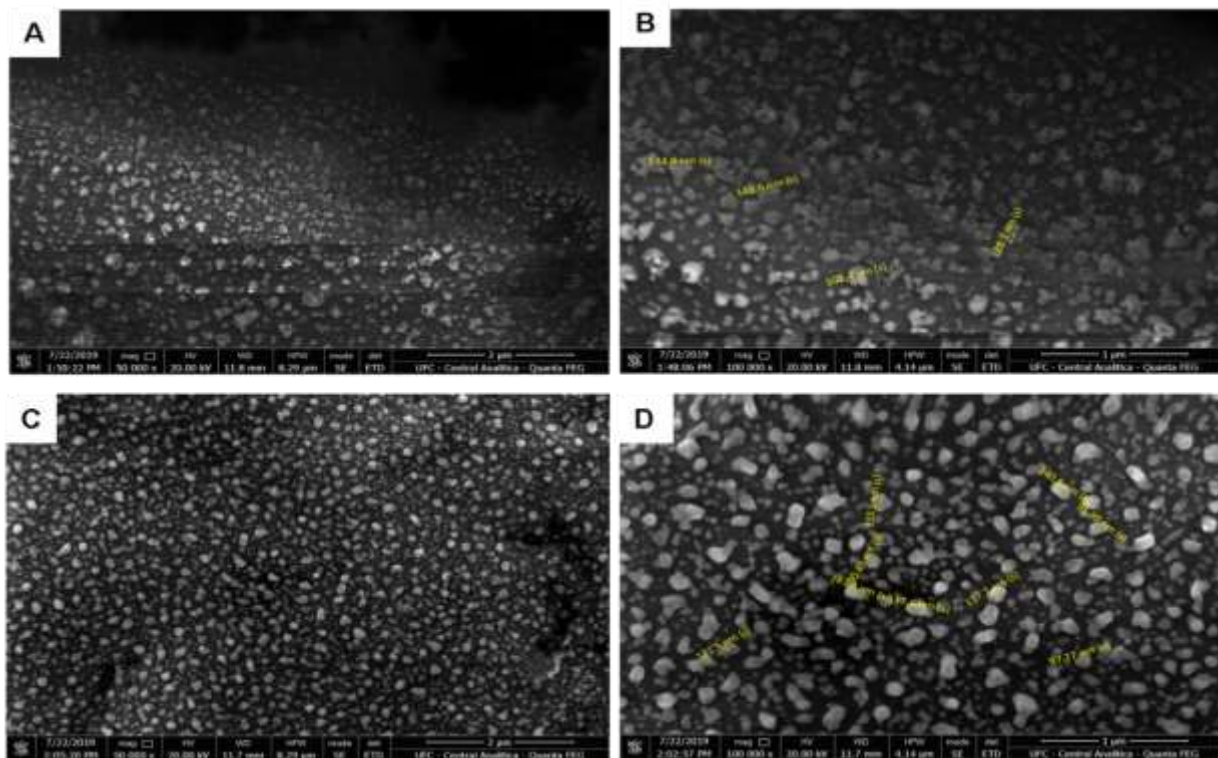
Média de distribuição de tamanhos de exossomos de leite bovino e caprino. Os dados foram analisados por teste t de student ($p > 0,05$).

Fonte: elaborado pela autora

O diâmetro dos exossomos isolados do leite bovino é muito próximo aos de outros mamíferos como laque ($109,2 \pm 57,1$ nm) (GAO et al., 2019); camelos (30 – 100 nm) (IBRAHIM et al., 2019) ou até mesmo de pandas gigantes (aproximadamente 130 nm) (MA et al., 2017), já os do leite de cabra são consideravelmente menores. Este fato pode ser bastante interessante no que diz respeito ao uso dessas nanopartículas como agentes para a entrega de drogas, pois um tamanho reduzido pode significar maior facilidade em driblar o sistema fagocítico mononuclear, bem como em transpor barreiras biológicas, aumentando assim as chances de fusão de membranas e entrega de carga de maneira eficiente às células alvo (VAN DEN BOORN et al., 2011).

Por fim, as análises realizadas por MEV revelaram também alterações morfológicas nas partículas após a metodologia de encapsulamento por eletroporação. Verificou-se que tais vesículas perderam a característica essencialmente esférica, aumentaram de tamanho (diâmetro médio do LV: 131,17 nm e LC: 118,92 nm) e tomaram um formato com delimitação irregular (Figura 4).

Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de exossomos de leite caprino e bovino após eletroporação.



Imagens representativas de exossomos do leite de cabra (A) e do leite de vaca (C) em magnificação de 50.000 vezes. Tamanho e morfologia dos exossomos do leite de cabra (B) e do leite de vaca (D) em magnificação de 100.000 vezes após metodologia de eletroporação. Em amarelo apresentamos o diâmetro médio de algumas nanopartículas distribuídas nas amostras.

Fonte: elaborado pela autora

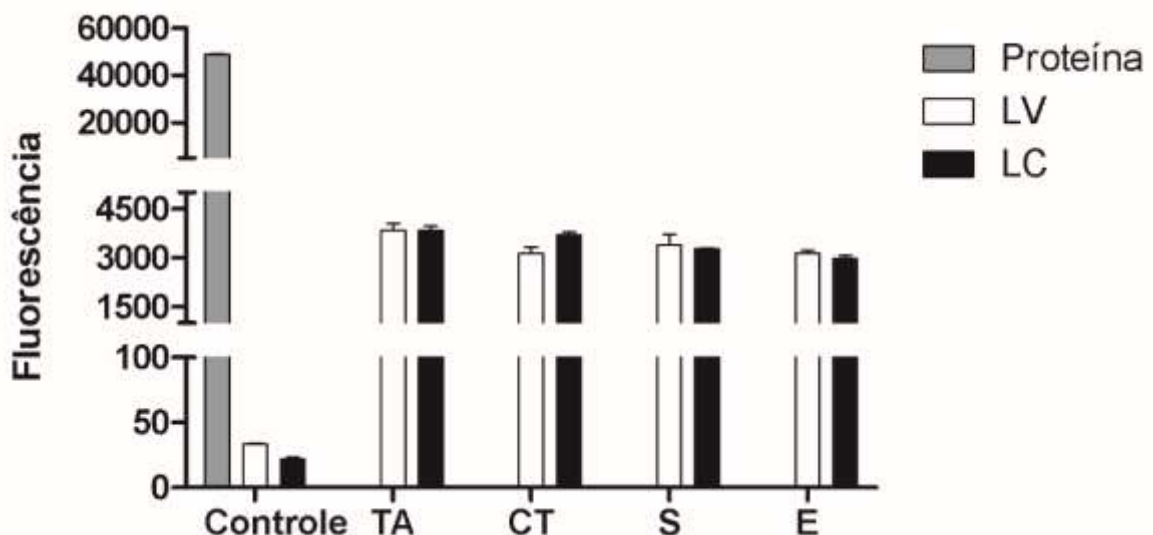
Tal fato pode ter sido motivado pela formação de pequenos aglomerados de exossomos, induzidos provavelmente pela aplicação do campo elétrico.

De acordo com Johnsen e colaboradores (2014) a eletroporação é uma metodologia favorável para o carregamento de exossomos, entretanto é suspeita de induzir efeitos adversos na integridade das partículas e na carga terapêutica (JOHNSEN et al., 2014) (JOHNSEN et al., 2014). Outro estudo demonstrou que o processo de eletroporação induziu à formação de agregados de ácidos nucleicos (siRNAs) impossibilitando o seu carregamento no interior de vesículas extracelulares (KOOIJMANS et al., 2013). Além disso, a eletroporação parece induzir também a agregação das próprias partículas exossomais, o que prejudica ainda mais o encapsulamento de compostos, bem como sua utilização enquanto biofármaco (HOOD; SCOTT; WICKLINE, 2014).

6.2 Encapsulamento da proteína *Mo*-CBP₃-FITC

O encapsulamento da proteína conjugada ao fluoróforo foi confirmada por meio de duas técnicas distintas: 1- Espectrofotometria de Fluorescência (EF); 2 – Eletroforese seguida de *Western Blotting* (WB). O resultado obtido pela EF permitiu observar que a capacidade de encapsulamento dos exossomos de origem caprina e bovina foi semelhante. Além disso, quando as diferentes metodologias (eletroporação, sonicação, TA ou CT) foram analisadas, verificou-se também não haver diferença significativa na quantidade de proteína encapsulada (Figura 5).

Figura 5 - Análise de Encapsulamento da proteína *Mo*-CBP₃-FITC por Espectrofotometria de Fluorescência.



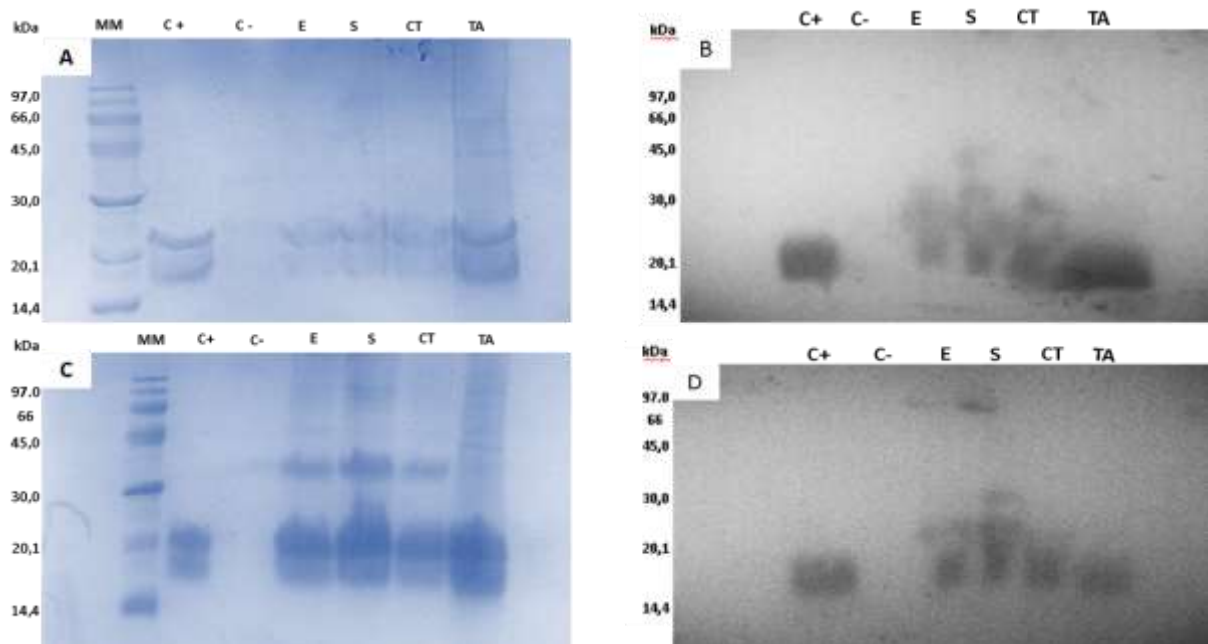
Exossomos de leite de vaca (LV) em colunas brancas e de leite de cabra (LC) em colunas pretas previamente carregados com *Mo*-CBP₃-FITC por meio das metodologias de incubação à temperatura ambiente (TA); Choque térmico (CT); Sonicação (S) e Eletroporação (E). Em cinza controle proteico não encapsulado, seguido dos controles negativos: exossomos de LV e LC não encapsulados

Fonte: elaborado pela autora

Em relação a técnica de eletroforese seguida de *Western Blotting*, sabe-se que a proteína em questão apresenta-se em SDS-PAGE como duas bandas de massas aparentes de 28 e 17 kDa (FREIRE et al., 2015). Após a realização da eletroforese, constatou-se a presença desse mesmo padrão no controle positivo (*Mo*-CBP₃) e demais amostras de exossomos submetidas às diversas metodologias de encapsulamento (Figura 6, A e C), o que não pode ser observado nas amostras

de exossomos não encapsulados (controle negativo). O resultado da eletroforese evidenciou a presença da proteína *Mo*-CBP₃ carregada nas nanopartículas, e o WB confirmou essa existência por meio do reconhecimento específico da proteína com anticorpos anti- *Mo*-CBP₃ (Figura 6, B e D).

Figura 6 - Análise de encapsulamento da proteína *Mo*-CBP₃ por Eletroforese e Western Blotting



Carregamento dos exossomos com MOCBP3 confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) para amostras de leite de cabra (A) e leite de Vaca (C). Western Blotting das amostras comprovando eficácia no encapsulamento da proteína MOCBP3 em exossomos do leite de cabra (B) e leite de vaca (D).

Legenda: MM: marcador de massa molecular; C+: controle positivo (*Mo*-CBP₃, 10 µg); C -: Controle negativo (proteínas de exossomos vazios); proteínas exossomais (10 µg) após encapsulamento de *Mo*-CBP₃ pelo método de eletroporação (E); sonicação (S), choque térmico (CT) e incubação em temperatura ambiente (TA)

Fonte: elaborado pela autora

Devido ao fato de possuírem um núcleo aquoso e uma membrana constituída de bicamada lipídica, os exossomos exibem uma grande versatilidade no carregamento de moléculas, podendo interagir tanto com cargas hidrofílicas quanto hidrofóbicas (VLASSOV et al., 2012). Apesar do exato mecanismo de carregamento de moléculas ainda precisar ser melhor explorado, a hipótese é que a natureza mista de sua superfície (lipídica e proteica) facilite, em parte, a interação com os compostos a serem carregados. Outra possibilidade é que o encapsulamento de compostos ocorra por meio de difusão simples, motivado

apenas pela diferença no gradiente de concentração. Dessa forma, os estudos tendem a explorar tanto métodos passivos de encapsulamento, como é o caso da incubação (PASCUCCI et al., 2014; SUN et al., 2010), quanto técnicas de carregamento ativo tais como a eletroporação, sonicação, tratamento com saponina e extrusão (FUHRMANN et al., 2015; HANEY et al., 2015; TIAN et al., 2014), a depender da natureza da carga a ser trabalhada, bem como da origem da nanopartícula estudada.

Em sua pesquisa, Haney e colaboradores avaliaram a eficácia de encapsulamento de uma proteína, a catalase, em exossomos provenientes de macrófagos. Para tanto, foram utilizadas quatro metodologias distintas: 1 – Incubação a temperatura ambiente, com ou sem a presença de saponina; 2 – Choque térmico; 3 – Sonicação ou 4 – Extrusão. Ao contrário do que foi observado no presente estudo, os autores constataram haver diferença na quantidade de proteína encapsulada, a depender da metodologia empregada. A eficácia no encapsulamento proteico demonstrou ser maior para as metodologias da sonicação e extrusão, seguida pelo choque térmico, e, por fim, pela incubação a temperatura ambiente (na ausência de saponina).

Baseado nisso, a hipótese levantada pelos autores é que a formação transitória de poros após a sonicação/ extrusão permitiu uma maior difusão da catalase do meio externo para o interior dos exossomos. Da mesma forma, quando adicionou-se saponina à solução incubada à temperatura ambiente, a taxa de carregamento dos exossomos subiu consideravelmente. Sugere-se que a saponina atue na remoção seletiva de moléculas de colesterol presentes na superfície de membrana dos exossomos, o que permite também a criação de poros que facilitam a entrada da proteína (HANEY et al., 2015) .

Outro estudo também avaliou a capacidade de encapsulamento de exossomos isolados de macrófagos e utilizou como carga o agente quimioterápico Paclitaxel (PTX). Foram testadas três diferentes metodologias para o carregamento dos exossomos: Incubação a temperatura ambiente; eletroporação e sonicação. Novamente a sonicação teve a maior taxa de sucesso no carregamento de exossomos. Nesse caso, os autores supõem que a alta rigidez da membrana exossomal pode ser reduzida após a realização dessa metodologia, o que permite a incorporação do PTX por entre a bicamada lipídica (KIM et al., 2016).

Já Munagala e colaboradores (2016) investigaram a capacidade de encapsulamento de exossomos do leite bovino por meio da metodologia da incubação à temperatura ambiente (22 °C). Uma vasta gama de compostos que variavam de acordo com a polaridade, peso molecular e presença de grupos funcionais foram testados. Os resultados indicaram que a taxa de carregamento dos exossomos com agentes quimiopreventivos (withaferrin A, antocianidina e curcumina) ou quimioterápicos (paclitaxel e docetaxel) variou de 10 a 40% utilizando-se apenas a metodologia citada. Sendo assim, conclui-se que a natureza da molécula a ser encapsulada também interfere bastante para o sucesso da metodologia.

A molécula da *Mo*-CBP₃ é polar, portanto apresenta alta afinidade com água, o que a torna extremamente solúvel. Em contrapartida, tal característica dificulta a sua interação com os lipídeos de membrana, o que poderia ser um obstáculo ao processo de encapsulamento por parte dos exossomos. Sendo assim, os mecanismos de encapsulamento ativo são de extrema importância para o sucesso da metodologia de carregamento da *Mo*-CBP₃.

Fuhrmann e colaboradores (2015) investigaram a capacidade de encapsulamento por parte de vesículas extracelulares (em sua maioria exossomos) sobre a droga anticâncer porfirina. Porfirinas com diferentes graus de hidrofobicidade (alta, intermediária e baixa) foram utilizadas para o carregamento de VEs provenientes de diferentes culturas de células. Os autores observaram que a porfirina hidrofóbica teve um encapsulamento satisfatório, independente da metodologia empregada, tenha sido ela passiva (incubação) ou ativa (eletroporação). Já as moléculas com características hidrofílicas, foram melhor encapsuladas por meio de processos ativos de carregamento (eletroporação e incubação a temperatura ambiente na presença de saponina).

Três das quatro metodologias empregadas no presente estudo (eletroporação, sonicação e choque térmico) funcionam basicamente de acordo com o mesmo princípio: perturbação na homeostase da membrana exossomal, seja por meio da incidência de corrente elétrica, ondas sonoras, ou mudanças bruscas de temperatura, respectivamente. Já a incubação a temperatura ambiente só foi realizada na presença de saponina, que, como já foi destacado, também altera momentaneamente a composição membranar. Além da formação transitória de poros, a retirada de moléculas de colesterol motivada pela saponina gera diminuição

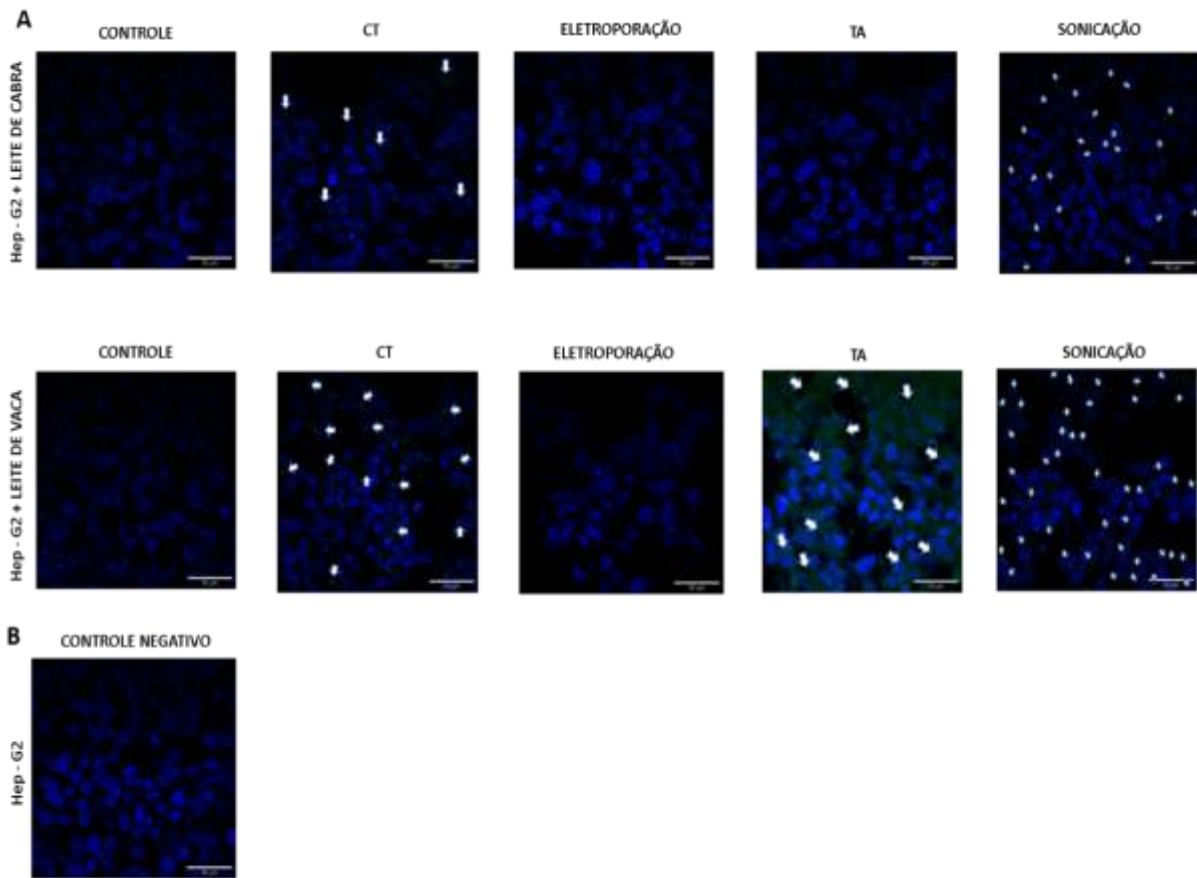
na rigidez da bicamada fosfolipídica, bem como alterações físicas que possibilitam uma maior interação com as proteínas de membrana (FUHRMANN et al., 2015). Por fim, vale destacar que o tempo de incubação a temperatura ambiente realizada no presente estudo (18h) foi maior do que a média empregada em outras pesquisas (KALANI et al., 2016; SUN et al., 2010).

Considerando a característica hidrofílica da molécula de *Mo*-CBP₃, era natural, portanto, que ela respondesse melhor a metodologias ativas de encapsulamento. De fato, todos os procedimentos empregados (eletroporação, sonicação, choque térmico e incubação a temperatura ambiente) são metodologias ativas. Aliado a isso, todos eles funcionam basicamente de acordo com o mesmo mecanismo de ação. Dessa forma, essa é uma provável explicação para alta capacidade de encapsulamento observada diante das diferentes metodologias empregadas em ambas as amostras (LC e LV).

6.3 Ensaio de incubação de exossomos com linhagem celular

Após a realização dos experimentos para encapsulamento da proteína, o potencial de entrega dos exossomos de leite de cabra e do leite de vaca submetidos às diferentes metodologias foi testado *in vitro*. O resultado dos ensaios de incubação celular (figura 7 a), evidenciou uma maior eficiência na captura de exossomos do leite bovino em comparação aos do leite caprino (figura 8). Em relação ao leite de cabra, quando comparamos a eficácia das diferentes metodologias de encapsulamento, verificou-se que os exossomos sonicados tiveram a maior taxa de captura pelas células, seguidos dos exossomos que passaram pelo processo de choque térmico. Já os eletroporados e incubados a temperatura ambiente na presença de saponina, aparentemente, não foram internalizados de maneira eficiente (figura 8).

Figura 7 - Análise da captação de exossomos de leite bovino e caprino por células da linhagem Hep-G2 através de microscopia confocal

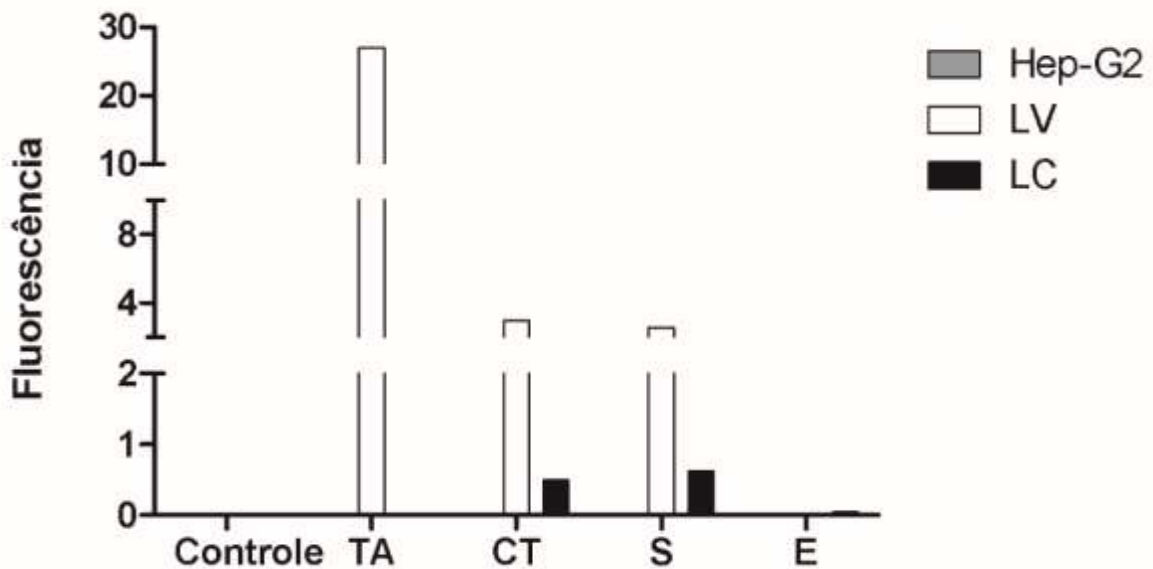


A – Captação de exossomos de leite bovino e caprino carregados com a proteína *Mo-CBP₃* conjugada ao fluoróforo FITC (verde – indentificado pelas setas brancas) por células de hepatocarcinoma humano (HepG2), após ensaio de incubação com duração de 24 h. As células foram fixadas e analisadas por microscopia confocal. Os núcleos foram identificados por meio de marcação com DAPI (azul). Barra de escala de 50 μ m.

Os Controles testados para cada amostra constituem-se apenas dos exossomos, sem o encapsulamento proteico. Já o controle negativo (B) são apenas as células Hep-G2 cultivadas em DMEM por 24 h sem a presença de exossomos.

Fonte: elaborado pela autora

Figura 8 - Análise da fluorescência de exossomos incubados com células da linhagem Hep-G2



Intensidade da fluorescência emitida pelos exossomos internalizados pelas células Hep-G2 quantificada por meio do software Image J.

Exossomos de leite de vaca (LV) foram representados por colunas brancas, leite de cabra (LC) por colunas pretas e o controle celular (Hep-G2) por coluna cinza.

Fonte: elaborado pela autora

Apesar dos exossomos de leite de vaca terem apresentado maior eficácia na entrega da carga às células em estudo, coincidentemente, a eletroporação foi a única metodologia que não demonstrou sucesso (figura 7 a). Tal resultado pode estar intimamente relacionado às disfunções que a exposição ao campo elétrico gera sobre as nanopartículas em estudo, bem como nas moléculas a serem carregadas.

Considerando as evidências de falha no processo de carregamento de exossomos por eletroporação, Kooijmanns e colaboradores (2013) questionaram o nível de eficiência dessa metodologia no encapsulamento de ácidos nucleicos (siRNAs) em vesículas extracelulares. De acordo com as análises, os autores concluíram que tal metodologia induzia a formação de agregados insolúveis de siRNAs, fazendo com que o nível de retenção da carga no interior das nanopartículas fosse, na prática, menor que 0,05%. Sabe-se que as descargas elétricas que incidem sobre os eletrodos metálicos das cubetas causam a liberação

de cátions de alumínio. Estes provavelmente reagirão com os ânions presentes nos tampões e com as moléculas a serem encapsuladas precipitando-as de forma a gerar tais agregados (STAPULIONIS, 1999).

O efeito precipitador provocado pela eletroporação causa confusão ao método de avaliação por espectrofotometria, já que o equipamento não é capaz de distinguir a fluorescência emitida pelos exossomos carregados daquela produzida pelos agregados insolúveis de moléculas que não foram encapsuladas. Toda essa problemática pode resultar, então, na determinação de uma falsa eficácia na taxa de encapsulamento (KOOIJMANS et al., 2013). Durante o presente estudo, observou-se resultados conflitantes em relação a metodologia da eletroporação: a eficácia de encapsulamento das nanopartículas não foi seguida de sucesso na entrega da carga nos posteriores ensaios de incubação com a linhagem celular. Sugere-se, portanto, que a análise da eficácia de encapsulamento proteico realizada por espectrofotometria possa ter, de fato, superestimado os valores atribuídos aos exossomos eletroporados.

Em contrapartida, os exossomos sonificados apresentaram maior habilidade na entrega da carga às células alvo, tanto nos testes realizados com exossomos do leite caprino quanto no caso dos de leite bovino. Resultados semelhantes foram observados por Haney e colaboradores (2015) ao avaliarem a eficiência no transporte da enzima catalase encapsulada em exossomos por meio de diferentes metodologias. Os autores demonstram que, após a sonicação, os exossomos aumentaram de tamanho, sugerindo então que a maior superfície de contato tenha melhorado a capacidade de interação entre a vesícula e a célula alvo. Além disso, sabe-se que o processo de sonicação promove uma reorganização na membrana exossomal, o que induz a exposição de estruturas, tais como proteínas de membrana, capazes de tornar mais eficiente a captura por parte das células.

De fato, existem basicamente três mecanismos pelos quais os exossomos podem ser encapsulados por células alvo: 1 – fusão simples de membranas (CLAYTON et al., 2004; MONTECALVO et al., 2012); 2 – endocitose (FENG et al., 2010; HANNAFON; DING, 2013) e 3 – ativação celular por meio da presença de ligantes específicos de membrana (MELO et al., 2015; YOUSEFPOUR; CHILKOTI, 2014). A sonicação atuaria em dois dos três mecanismos citados, já que permite uma maior interação entre membranas facilitando o processo de fusão, bem como expõe um maior número de ligantes. Além disso, de acordo com Gyorgy e

colaboradores (2011) alguns mecanismos de encapsulamento expõem constituintes proteicos da membrana exossomal que podem funcionar como uma concha protetora capaz de estabilizar a estrutura vesicular fazendo-a carregar a informação diretamente ao seu destino específico dentro da célula (GYÖRGY et al., 2011).

Por outro lado, há de se considerar que a perturbação gerada pelo processo de sonicação à membrana exossomal pode também interromper seus privilégios imunológicos, tornando-os visíveis ao sistema fagocítico mononuclear. De fato, testes *in vivo* demonstram que a eficácia terapêutica de exossomos sonicados é bem menor que a obtida pela utilização de nanopartículas submetidas a outras metodologias de encapsulamento. Tal resultado provavelmente deve-se a uma maior capacidade de preservação da uniformidade morfológica dos exossomos conferida por metodologias como a incubação a temperatura ambiente por exemplo, tornando-os assim menos susceptíveis à fagocitose por macrófagos (HANEY et al., 2015).

Em seu estudo, Kalani e colaboradores (2016) avaliaram a capacidade de encapsulamento do composto bioativo curcumina em exossomos por meio da metodologia do Choque térmico (CT). Os autores avaliaram a eficácia dessa nanoformulação na restauração do dano neurovascular causado por lesão isquêmica cerebral. Os resultados mostraram que a formulação exossomal foi capaz de reduzir processos inflamatórios e ajudar na restauração neurovascular *in vivo*. Além disso, verificaram ainda que, mesmo após a metodologia de encapsulamento, os exossomos mantiveram atividades enzimáticas e a presença de proteínas de membrana específicas, evidenciando assim uma preservação de sua integridade estrutural. Tais resultados vão ao encontro do que foi observado no presente estudo, confirmando que o choque térmico é uma metodologia eficaz do ponto de vista do encapsulamento de moléculas, e que não causa sérias alterações à membrana das nanopartículas, sendo portanto uma alternativa viável à fabricação de biofármacos.

Por fim, acredita-se que a maior afinidade apresentada pelos exossomos de origem bovina em relação as células alvo pode ter explicações diversas. Uma delas é o fato de apresentarem um maior diâmetro. Assim como ocorreu com exossomos sonicados nos estudos descritos, o fato dos exossomos do leite de vaca serem maiores que os do leite de cabra pode ter influência sobre o processo de captura celular motivado pela maior superfície de contato. Outra hipótese é que o

perfil proteico das superfícies de membrana seja diferente entre as espécies caprina e bovina, favorecendo assim a ligação com receptores celulares específicos. Por outro lado, sabe-se que o reduzido tamanho dos exossomos do leite de cabra pode ser vantajoso do ponto de vista da opsonização pelo sistema fagocítico mononuclear. Dessa forma, ressalta-se a necessidade de realização de mais estudos, especialmente *in vivo*, utilizando os exossomos de leite caprino, a fim de tornar possível a fiel determinação da ação dessas nanopartículas enquanto biofármacos em organismos vivos.

7 CONCLUSÃO

Exossomos são interessantes ferramentas com um enorme potencial de emprego enquanto transportadores inteligentes de drogas. As vantagens no uso dessas vesículas são inúmeras, e já estão muito bem estabelecidas na literatura. O presente estudo proporcionou dados inéditos acerca do isolamento, caracterização e funcionalidade de exossomos oriundos do leite de cabra. Acredita-se que a descoberta de características específicas como o fato de apresentarem um tamanho bastante reduzido, faça com que essas vesículas ganhem destaque do ponto de vista de sua aplicabilidade em posteriores pesquisas clínicas. Além disso, algumas das metodologias ativas de encapsulamento estudadas parecem ser alternativas eficazes para o carregamento de exossomos do leite caprino, resultando assim na criação de um novo modelo de biofármaco com um futuro promissor. O processo final de incubação com a linhagem celular também evidenciou que essas nanovesículas são adequadamente internalizadas por células humanas, o que significa um grande passo para a proposição de novas pesquisas. Por fim, destaca-se que as metodologias aqui descritas são de baixa complexidade e facilmente aplicáveis ao carregamento de outras moléculas, podendo ser testadas em diversas situações. Dessa forma, espera-se que novos trabalhos tragam dados mais complexos acerca da caracterização, testes de toxicidade *in vitro*, bem como subsequentes experimentos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Ashish K. et al. Milk-derived exosomes for oral delivery of paclitaxel. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 5, p. 1627-1636, 2017.
- ALVAREZ-ERVITI, Lydia et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 341-5, 2011.
- ANDREOLA, Giovanna et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 10, p. 1303-16, 2002.
- AQIL, Farrukh et al. Exosomal formulation enhances therapeutic response of celastrol against lung cancer. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 101, n. 1, p. 12-21, 2016.
- AQIL, Farrukh et al. Exosomal delivery of berry anthocyanidins for the management of ovarian cancer. **Food and Function**, v. 8, n. 11, p. 4100-4107, 2017.
- AQIL, Farrukh et al. Milk exosomes - Natural nanoparticles for siRNA delivery. **Cancer Letters**, v. 8, n. 11, p. 4100-4107, 2019.
- ARALDI, Elisa et al. International Society for Extracellular Vesicles: first annual meeting, April 17–21, 2012: ISEV-2012. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 1, n. 10, 2012.
- ARNTZ, Onno J. et al. Oral administration of bovine milk derived extracellular vesicles attenuates arthritis in two mouse models. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 9, p. 1701-12, 2015.
- BATISTA, Adelina B. et al. New insights into the structure and mode of action of Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein of *Moringa oleifera* seeds. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.
- BEN-JOSEF, A. M. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of a novel complex carbohydrate: CAN-296. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 4, p. 287-95, 2000.
- BENMOUSSA, A. et al. Commercial Dairy Cow Milk microRNAs Resist Digestion under Simulated Gastrointestinal Tract Conditions. **Journal of Nutrition**, v. 146, n. 11, p. 2206-2215, 2016.
- BETKER, Jamie L. et al. The Potential of Exosomes From Cow Milk for Oral Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 4, 2019.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 1976.

CAI, Mingcheng et al. Genome-wide microRNA profiling of bovine milk-derived exosomes infected with *Staphylococcus aureus*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 23, n. 4, p. 663-672, 2018.

CHEN, Xi et al. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. **Cell Research**, v. 20, n. 10, p. 1128-37, 2010.

CHO, Young Eun et al. Extracellular vesicles as potential biomarkers for alcohol- and drug-induced liver injury and their therapeutic applications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 187, p. 180–194, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.009>. Acesso em: 5 fev. 2020.

CIREGIA, Federica; URBANI, Andrea; PALMISANO, Giuseppe. Extracellular Vesicles in Brain Tumors and Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 1, 2017.

CLAYTON, Aled et al. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 9, p. 977-9, 2004.

CORRADO, Chiara et al. Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: Basic science and clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5338–5366, 2013.

DONG, Na et al. Antimicrobial potency and selectivity of simplified symmetric-end peptides. **Biomaterials**, v. 35, n. 27, p. 8028-39, 2014.

EL-ANDALOUSSI, Samir et al. Exosome-mediated delivery of siRNA in vitro and in vivo. **Nature Protocols**, v. 7, n. 12, p. 2112-26, 2012.

FENG, Du et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. **Traffic**, v. 11, n. 5, p. 675-87, 2010.

FREIRE, José E. C. et al. Mo-CBP3, an antifungal chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds, is a member of the 2S albumin family. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

FUHRMANN, Gregor et al. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 3, 2015.

GAO, H. N. et al. Yak-milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells in an hypoxic environment. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 2, p. 985-996, 2019.

GARCIA, Tarcymara B. et al. Gene expression and spatiotemporal localization of antifungal chitin-binding proteins during *Moringa oleifera* seed development and germination. **Planta**, v. 249, n. 5, p. 1503-1519, 2019.

GESSLER, N. N.; AVER'YANOV, A. A.; BELOZERSKAYA, T. A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 10, p. 1091-109, 2007.

GIFONI, Juliana M. et al. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 406-15, 2012.

GOLAN-GERSTL, Regina et al. Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 10, 2017.

GUAY, Claudiane et al. Horizontal transfer of exosomal microRNAs transduce apoptotic signals between pancreatic beta-cells. **Cell Communication and Signaling**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–12, 2015.

GURUNATHAN, Sangiliyandi et al. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. **Cells**, v. 8, n. 4, 2019.

GYÖRGY, Bence et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011.

HANEY, Matthew J. et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 10, n. 207, p. 18-30, 2015.

HANNAFON, Bethany N.; DING, Wei Qun. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14240-69, 2013.

HATA, Taketoshi et al. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 2, p. 528–533, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.135>. Acesso em: 6 fev. 2020.

HERWIJNEN, Martijn J. C. va. et al. Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 2, 2018.

HOOD, Joshua L.; SCOTT, Michael J.; WICKLINE, Samuel A. Maximizing exosome colloidal stability following electroporation. **Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 448, p. 41–49. 2014.

HOWARD, Katherine M. et al. Loss of miRNAs during processing and storage of cow's (*Bos taurus*) milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 588-92, 2015.

HYUN, Jeongeun et al. MicroRNA125b-mediated Hedgehog signaling influences liver regeneration by chorionic plate-derived mesenchymal stem cells. **Scientific Reports**, v. 15, n. 5, p. 141-135, 2015.

IBRAHIM, Hany M. et al. Camel milk exosomes modulate cyclophosphamide-induced oxidative stress and immuno-toxicity in rats. **Food and Function**, [s. l.], v. 2, 2019.

IZUMI, H. et al. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 4831-4841, 2012.

JIANG, Xin Chi; GAO, Jian Qing. Exosomes as novel bio-carriers for gene and drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1-2, p. 167-175, 2017.

JOHNSEN, Kasper Bendix et al. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 1, p. 75-87, 2014.

KALANI, A. et al. Curcumin-primed exosomes mitigate endothelial cell dysfunction during hyperhomocysteinemia. **Life Sciences**, v. 107, n. 1-2, p. 1-7, 2014.

KALANI, Anuradha et al. Curcumin-loaded embryonic stem cell exosomes restored neurovascular unit following ischemia-reperfusion injury. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 79, p. 360–369, 2016.

KIM, Ahlee; SHAH, A. S.; NAKAMURA, Takahisa. Extracellular Vesicles: A Potential Novel Regulator of Obesity and Its Associated Complications. **Children, Basel**, v. 11, n. 152, 2018.

KIM, Myung Soo et al. Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 2, 2016.

KOH, Y. Q. et al. Characterization of exosomes from body fluids of dairy cows. **Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 3, 2017.

KOOIJMANS, Sander A. A. et al. Electroporation-induced siRNA precipitation obscures the efficiency of siRNA loading into extracellular vesicles. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 1, p. 229-238, 2013.

KUSUMA, Rio Jati et al. Human vascular endothelial cells transport foreign exosomes from cow's milk by endocytosis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 310, n. 10, 2016.

LABANDEIRA, Conrad C.; PREVEC, Rose. Plant paleopathology and the roles of pathogens and insectsInternational. **Journal of Paleopathology**, v. 74, p. 1158–1178, 2014.

LI, Tingfen et al. Exosomes Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Alleviate Liver Fibrosis. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 6, p. 845–854, 2013.

LÖTVALL, Jan et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, n. 10, 2014.

MA, Jideng et al. Exosomal microRNAs in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) breast milk: Potential maternal regulators for the development of newborn cubs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 35- 07, 2017.

MANDAL, Santi M. et al. The attack of the phytopathogens and the trumpet solo: Identification of a novel plant antifungal peptide with distinct fold and disulfide bond pattern. **Biochimie**, v. 95, n. 10, p. 1939-48, 2013.

MAREI, Gehan I. K.; ABDEL RASOUL, Mona A.; ABDELGALEIL, Samir A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103. p. 56–61, 2012.

MATEESCU, Bogdan et al. Obstacles and opportunities in the functional analysis of extracellular vesicle RNA - an ISEV position paper. **Journal of extracellular vesicles**, [s. l.], v. 6, 2017.

MELLO, Erica O. et al. Antifungal activity of Pvd1 defensin involves plasma membrane permeabilization, inhibition of medium acidification, and induction of ROS in fungi cells. **Current Microbiology**, v. 62. n. 4, p. 1209-1217, 2011.

MELNIK, Bodo C. et al. Milk miRNAs: Simple nutrients or systemic functional regulators? **Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 42. 2016.

MELNIK, Bodo C.; JOHN, Swen Malte; SCHMITZ, Gerd. Milk is not just food but most likely a genetic transfection system activating mTORC1 signaling for postnatal growth. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 103, 2013.

MELNIK, Bodo C.; SCHMITZ, Gerd. MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 31, n. 4, p. 427-442, 2017. a.

MELNIK, Bodo C.; SCHMITZ, Gerd. Exosomes of pasteurized milk: potential pathogens of Western diseases. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 3, 2019.

MELNIK, Bodo; SCHMITZ, Gerd. Milk's Role as an Epigenetic Regulator in Health and Disease. **Diseases**, v. 5, n. 1, 2017. b.

MELO, Sonia A. et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. **Nature**, v. 523, p. 177-82, 2015.

MENG, Xianghong et al. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81,n. 1, p.70-75, 2010.

MICHAËLSSON, Karl et al. Milk intake and risk of mortality and fractures in women and men: Cohort studies. **BMJ**, v. 28, n. 349, 2014.

MONTECALVO, Angela et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 756-66, 2012.

MUNAGALA, Radha et al. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. **Cancer Letters**, v. 371, n. 1, p. 48-61, 2016.

MUNAGALA, Radha et al. Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types. **Cancer Letters**, v. 393, p. 94-102, 2017.

OLIVEIRA, Jose T. A. et al. Mo-CBP3-PepI, Mo-CBP3-PepII, and Mo-CBP3-PepIII are synthetic antimicrobial peptides active against human pathogens by stimulating ROS generation and increasing plasma membrane permeability. **Biochimie**, [s. l.], v. 157, 2019.

PASCUCCI, Luisa et al. Paclitaxel is incorporated by mesenchymal stromal cells and released in exosomes that inhibit in vitro tumor growth: A new approach for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 192, p. 262–270, 2014.

PERGE, Pál et al. Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for disease pathogenesis. **RNA Biology**, v. 14, 2017.

PIETERS, Bartijn C. H. et al. Commercial cow milk contains physically stable extracellular vesicles expressing immunoregulatory TGF- β . **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 2015.

PINTO, Clidia E. M. et al. Food safety assessment of an antifungal protein from *Moringa oleifera* seeds in an agricultural biotechnology perspective. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 83, 2015.

QU, Ying et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 10, p. 2491-2502, 2017.

SANCHO-ALBERO, María et al. Exosome origin determines cell targeting and the transfer of therapeutic nanoparticles towards target cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, 2019.

STAPULIONIS, Romualdas. Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 48, n. 1, p. 249-54, 1999.

SUN, Dongmei et al. A novel nanoparticle drug delivery system: The anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 9, p. 1606-1614, 2010.

SUNG, Sumi; KIM, Jieun; JUNG, Youngmi. Liver-Derived Exosomes and Their Implications in Liver Pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3715, 2018. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/12/3715>. Acesso em: 6 fev. 2020

TAURO, Bow J. et al. Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 12, n. 3, p. 587-598, 2013.

TAYLOR, Cormac T.; COLGAN, Sean P. Hypoxia and gastrointestinal disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 85, n. 12, p. 1295-300, 2007.

TIAN, Yanhua et al. A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. **Biomaterials**, v. 35, n. 7, p. 2383–2390, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083>. Acesso em: 6 fev. 2020

UDDIN, Mohammad Nizam et al. Toxic effects of d-galactose on thymus and spleen that resemble aging. **Journal of Immunotoxicology**, v. 23, n. 11, 2010.

VAN DEN BOORN, Jasper G. et al. SiRNA delivery with exosome nanoparticles. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 325-6, 2011.

VLASSOV, Alexander V. et al. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 7, p. 940-948, 2012.

WOLF, T.; BAIER, S. R.; ZEMPLIENI, J. The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. **Journal of Nutrition**, v. 145, n. 10, p. 2201-6, 2015.

XU, Rong et al. Extracellular vesicle isolation and characterization: Toward clinical application. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 4, p. 1152-62, 2016.

YADAV S; TOMAR AK; YADAV RN. Screening of Antifungal Proteins from Plants of Cucurbitaceae family against *Fusarium oxysporum*: Potential as Biofungicides. **International Research Journal of Environment Sciences**, v. 23, 2013.

YAMAUCHI, Marika et al. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 45, 2019.

YOUSEFPOUR, Parisa; CHILKOTI, Ashutosh. **Co-opting biology to deliver drugs. Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 9, 2014.

ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p. 389–395, 2002.