

CORRELAÇÕES CLÍNICAS, RADIOGRÁFICAS E SINOVIAIS DE CÃES COM OSTEOARTRITE E INTERAÇÃO DO MICROAMBIENTE ARTICULAR COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE (ADSC) IRRADIADAS COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA

Germano Filipe Grings¹, Emerson Antonio Contesini².

¹ Aluno de graduação em Medicina Veterinária - UFRGS; ² Departamento de Medicina Animal – UFRGS.



Introdução

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa responsável por promover o desequilíbrio da homeostasia articular. A utilização de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) tem sido amplamente discutida como alternativa de tratamento para melhorar a qualidade de vida de pacientes com essa enfermidade. Essas células possuem efeitos imunomodulatórios significativos, que podem ser potencializados através de sua fotobioestimulação com laser de baixa potência in vitro.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar in vitro a interação entre o microambiente osteoartítico canino com ADSC, irradiadas com laser de baixa potência in vitro.

Materiais E Métodos

As ADSC caninas, cultivadas em diferentes concentrações de soro fetal bovino (SFB) e submetidas à fototerapia com laser de baixa potência, foram submetidas ao cultivo com líquido sinovial proveniente de pacientes com OA e sem afecções articulares. Utilizando-se os meios condicionados (MC) resultantes desses cultivos, foi realizado ensaio de proliferação de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). As ADSCs resultantes desses cultivos foram congeladas para possíveis ensaios futuros.



Figura 1: Artrocentese realizada com a introdução da agulha imediatamente lateral ao ligamento patelar e distal à patela em canino sem afecção articular. Ao lado, líquido sinovial proveniente de um paciente com osteoartrite (coloração amarelo-palha) e líquido sinovial de um paciente sem afecção articular (incolor).

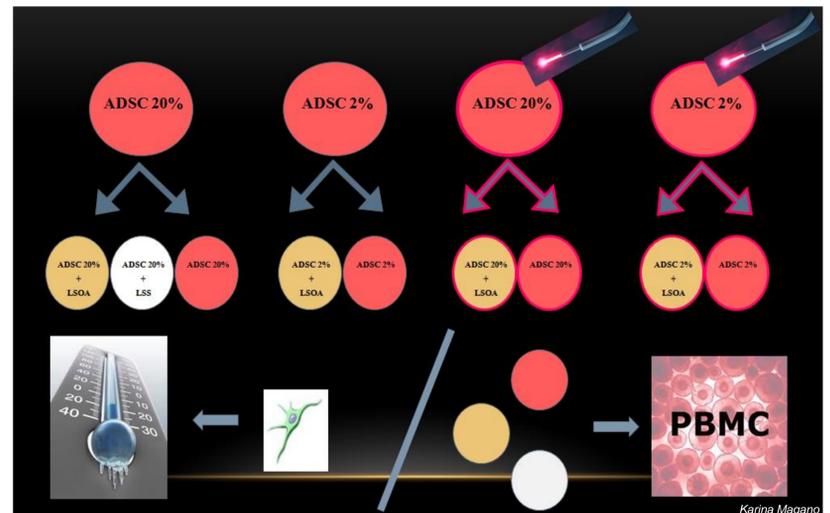


Figura 2: Desenho experimental demonstrando a divisão dos diferentes grupos de tratamento de ADSC irradiadas e não irradiadas, com diferentes concentrações de soro fetal bovino (2% e 20%) e diferentes fontes de líquido sinovial (osteoartítico, saudável ou controle-sem líquido sinovial). Após o tratamento, os meios condicionados foram utilizados em ensaio de proliferação de PBMC, enquanto as ADSC foram congeladas para futuros ensaios experimentais.

Resultados

Foram observadas alterações morfológicas gradativas, aparentemente mais acentuadas, em ADSC cultivadas com líquido sinovial osteoartítico, durante o período de 72 horas de incubação. Foi observado, ainda, aumento na confluência celular de ADSC em todos os grupos de tratamento, indicando proliferação de ADSC após contato com os MC contendo líquido sinovial. Quanto ao ensaio de proliferação de PBMC, observou-se morte celular de PBMC em todos os grupos em que foi adicionado líquido sinovial, além do grupo de ADSC 20% SFB. Foi observado, também, menor contagem no número de células (PBMC) nos grupos ADSC 20% SFB irradiadas, ADSC 2% SFB sem irradiação e ADSC 2% SFB irradiadas. Foram encontrados menores percentuais de PBMC nos grupos irradiados.

Tabela 1: Demonstração esquemática dos percentuais de aumento do número de eventos após adição de ConA e dos diferentes meios condicionados à população de PBMCs.

MENOR % DE AUMENTO DO NÚMERO DE CÉLULAS APÓS 5 DIAS	
GRUPO	ConA + MC
GRUPO ADSC 20% IRR	7%
GRUPO ADSC 2% IRR	8%
GRUPO ADSC 2%	13%

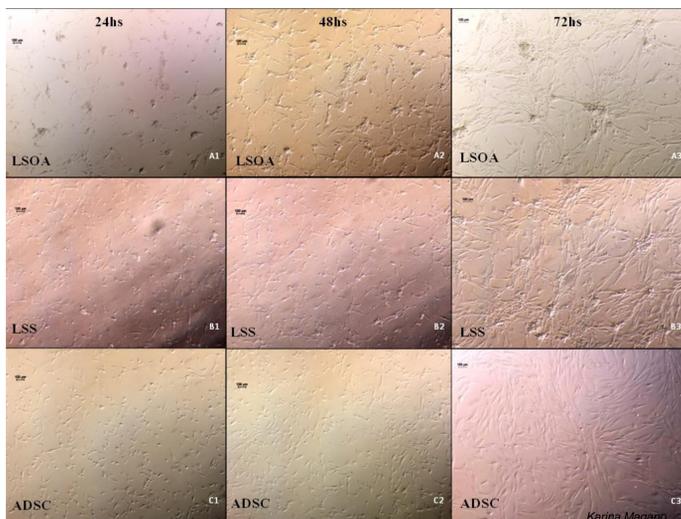


Figura 3: Fotos comparativas de diferentes grupos de tratamento após 72 horas de incubação: A1) ADSCs após 24 horas em meio de cultivo com adição de líquido sinovial osteoartítico; A2) ADSCs após 48 horas em meio de cultivo com adição de líquido sinovial osteoartítico; A3) ADSCs após 72 horas em meio de cultivo com adição de líquido sinovial osteoartítico; B1) ADSCs após 24 horas em meio de cultivo com adição de líquido sinovial sem afecção articular; B2) ADSCs após 48 horas em meio de cultivo com adição de líquido sinovial sem afecção articular; B3) ADSCs após 72 horas em meio de cultivo com adição de líquido sinovial sem afecção articular; C1) ADSCs após 24 horas em meio de cultivo sem adição de líquido sinovial; C2) ADSCs após 48 horas em meio de cultivo sem adição de líquido sinovial; C3) ADSCs após 72 horas em meio de cultivo sem adição de líquido sinovial.

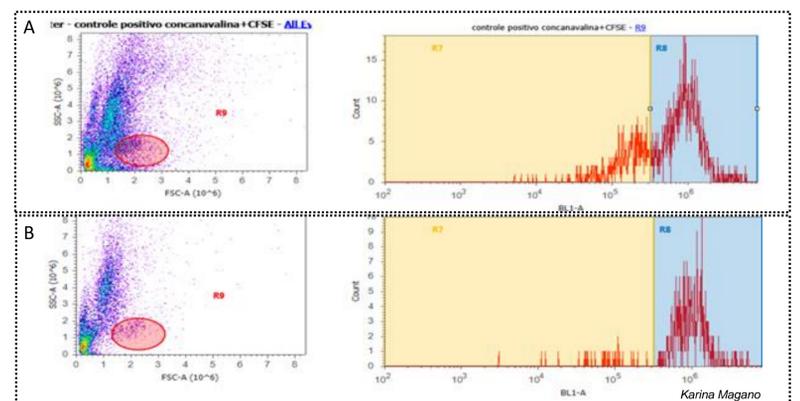


Figura 4: Ilustração da análise de citometria de fluxo: **A)** Aumento de 30% no número de eventos (células) detectados, após 5 dias de incubação, com ConA (R7). **B)** Aumento de 7% no número de eventos (células) detectados, após 5 dias de incubação, com ConA + meio condicionado de ADSCs 20% IRRADIADAS (R7).

Conclusões

Com os dados obtidos, foi possível observar que a associação do laser de baixa potência em cultura de ADSC caninas pode potencializar a atividade imunomodulatória dessas células e, portanto, servir de protocolo de tratamento nas enfermidades em que reações inflamatórias são deletérias. Contudo, para a confirmação desses dados, é indicada a realização de ensaios avaliando a proliferação de ADSC, assim como a análise de fatores imunomodulatórios secretados por essas células, quando submetidas aos diferentes microambientes.

Referências

ALGHAMDI, K. G.; KUMAR, A.; MOUSSA, N.A. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Journal of Lasers in Medical Sciences*. v. 27, n. 1, p.237-249, 2012.
 BLAZQUEZ, R., et al. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Frontiers in Immunology*. v. 5, article, 556, p. 1-9, 2014.
 CAMPAGNARO, B. P., Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hiperensão renovascular 2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas), Universidade Federal do Espírito Santo – Centro de Ciências da Saúde, Vitória, 2012.
 CUERVO, B., et al. Hip Osteoarthritis in Dogs: A Randomized Study Using Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue and Plasma Rich in Growth Factors. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 15, n. 4, p. 13437-13460, 2014.
 LEJUS, M. J. C., et al. Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: an explorative in vitro study. *Frontiers in Immunology*. v. 3, 2012.