

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE DA INIBIÇÃO PROLIFERATIVA DE PBMC CANINAS
EM MEIOS CONDICIONADOS DE ADSC
SUBMETIDAS À FOTOTERAPIA COM *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA
E LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOATRÍTICO

Karina Magano Guimarães

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE DA INIBIÇÃO PROLIFERATIVA DE PBMC CANINAS
EM MEIOS CONDICIONADOS DE ADSC
SUBMETIDAS À FOTOTERAPIA COM *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA
E LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOATRÍTICO

Autora: Karina Magano Guimarães

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na
Área de Morfologia, Cirurgia e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr Emerson Antonio Contesini

Coorientadora: Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne Lima

Porto Alegre

2016

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Guimarães, Karina Magano

Análise da inibição proliferativa de PBMC caninas em meios condicionados de ADSC submetidas à fototerapia com laser de baixa potência e líquido sinovial osteoartrítico / Karina Magano Guimarães. -- 2016.

72 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientadora: Elizabeth Obino Cirne Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. osteoartrite. 2. doença articular degenerativa. 3. células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino. 4. fototerapia com laser de baixa potência. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Cirne Lima, Elizabeth Obino, coorient. III. Título.

Karina Magano Guimarães

ANÁLISE DA INIBIÇÃO PROLIFERATIVA DE PBMC CANINAS
EM MEIOS CONDICIONADOS DE ADSC
SUBMETIDAS À FOTOTERAPIA COM *LASER* DE BAIXA POTÊNCIA
E LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOATRÍTICO

APROVADO POR:

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA
Coorientadora

Dr. LUCAS MARQUES COLOMÉ
Membro da Banca

Prof. Dr. MARCELO MELLER ALIEVI
Membro da Banca

Dra. NATÁLIA EMERIM LEMOS
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Existência, Deus, Vida ou qualquer nomenclatura irrelevante, porém de significado imensurável. Agradeço por me ser permitido vivenciar as experiências nesse vasto e misterioso Universo, no qual ainda se tem muito mais questionamentos do que nos é permitido esclarecer, e agradeço ao desenvolvimento da Paz e Confiança, resultante desse processo.

Limitar o meu agradecimento a nomes, certamente faria com que a mente esquecesse de participações fundamentais. Portanto, minha gratidão se refere a todos os mestres: zens ou não, religiosos ou não, humanos, animais, vegetais ou minerais, “bons ou maus”, que cruzaram o caminho até aqui, fazendo com que agora exista muito mais percepção de consciência do que um dia já existiu. Agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram, para que hoje exista a humildade de saber que não existe problema algum em não saber, pois a evolução é contínua, ilimitada e faz parte de todos os processos existenciais. Todo o amor e gratidão.

“Sempre que o Todo se identifica com uma parte há uma contração; sempre que a parte se identifica com o Todo há uma expansão. Lembre-se: você é o Todo, Nyarsha.”

Satyaprem

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa que promove o desequilíbrio da homeostasia articular. As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) podem ter significativos efeitos imunomodulatórios, principalmente quando associadas à fototerapia com *laser* de baixa potência (FTBP). A terapia com ADSC tem sido utilizada em medicina veterinária como tratamento para a OA. No entanto, pouco se sabe sobre as consequências dessas interações celulares nesse microambiente. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a inibição proliferativa de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) caninas em meios condicionados de ADSC submetidas à FTBP e líquido sinovial osteoartrítico (LSOA). Para isso, ADSC foram submetidas à FTBP e cultivadas com líquido sinovial (LS). Os meios condicionados resultantes foram adicionados a cultivos de proliferação de PBMC induzida com Concanavalina A (ConA) e realizadas leituras em citometria de fluxo. Observou-se alteração morfológica com aumento da confluência de ADSC em todos os grupos contendo LS e aparentemente mais acentuada em LSOA. Na análise de inibição proliferativa de PBMC caninas submetidas aos meios condicionados dos cultivos de ADSC com LS e ADSC em 20% de soro fetal bovino (SFB) sem LS, observou-se ausência de células aos cinco dias de cultivo. Através da citometria, verificou-se maior inibição proliferativa de PBMC submetidas a meios condicionados de ADSC irradiadas sem LS. Com os dados obtidos sugere-se que ADSC submetidas a microambientes contendo LS ou 20% de SFB, se proliferam de forma mais acentuada do que quando comparadas às outras condições experimentais. Além disso, estímulos oriundos da FTBP sob ADSC, parecem ser eficazes em promover atividade imunomodulatória, reduzindo a proliferação de PBMC caninas, quando submetidas a esses meios condicionados. No entanto, devido ao pequeno número amostral e ao grande conjunto de variáveis, indicam-se novos trabalhos de avaliação de diferenciação e proliferação de ADSC sob essas condições, assim como a mensuração dos fatores imunomodulatórios secretados por essas células, nesses microambientes, lançando-se mão de maior enriquecimento de meio para PBMC e redução dos períodos de incubação.

Palavras-chave: osteoartrite, doença articular degenerativa, células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino, fototerapia com *laser* de baixa potência.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease that promotes joint homeostasis imbalance. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (ADSC) can have significant immunomodulatory effects, especially when associated with low-level laser phototherapy (FTBP). ADSC therapy has been used in veterinary medicine as a treatment for OA. However, little is known about the consequences of these cellular interactions in this microenvironment. Therefore, the present study aimed to analyze the proliferative inhibition of canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in conditioned media of ADSC submitted to FTBP and osteoarthritic synovial fluid (LSOA). For this, ADSC were submitted to FTBP and cultured with synovial fluid (LS). The resulting conditioned media were added to cultures of PBMC proliferation induced with Concanavalin A and readings in flow cytometry were performed. There was a morphological change with an increase in the confluence of ADSC in all groups containing LS and apparently more accentuated in LSOA. In the analysis of proliferative inhibition of canine PBMC submitted to the conditioned media of the ADSC cultures with LS and ADSC in 20% fetal bovine serum (SFB) without LS, an absence of cells was observed at five days of culture. Through cytometry, there was a greater proliferative inhibition of PBMC submitted to conditioned media of ADSC irradiated without LS. With the data obtained, it is suggested that ADSC subjected to microenvironments containing LS or 20% SFB, proliferate more shaply than when compared to other experimental conditions. In addition, stimuli from FTBP under ADSC appear to be effective in promoting immunomodulatory activity, reducing the proliferation of canine PBMC, when subjected to these conditioned media. However, due to the small sample size and the large set of variables, new studies to assess the differentiation and proliferation of ADSC under these conditions are indicated, as well as the measurement of the immunomodulatory factors secreted by these cells in these microenvironments, launching greater medium enrichment for PBMC and reduced incubation periods.

Keywords: osteoarthritis, degenerative joint disease, mesenquimal stem cells from canine adipose tissue, low power laser phototherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Artrocentese de líquido sinovial incolor, em articulação fêmoro-tíbio-patelar de cão sem afecção articular.....	28
Figura 2.	Placa de cultivo sobre o <i>template</i> . Acima da placa de cultivo observa-se o <i>grid</i> para padronização das irradiações. A caneta do aparelho permanece imóvel e posicionada abaixo da placa de cultura. O campo semi-escuro delimita a área de irradiação, minimizando a reflexão da luz.....	31
Figura 3.	Fluxograma dos grupos de ADSC em meio contendo 20% de SFB.....	33
Figura 4.	Fluxograma dos grupos de ADSC em meio contendo 2% de SFB.....	34
Figura 5.	Ilustração do procedimento realizado para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (SILVA R. F., 2011).....	38
Figura 6.	A) Líquido sinovial osteoartrítico (coloração amarelo palha); B) Líquido sinovial saudável (incolor).....	41
Figura 7.	Fotos comparativas de diferentes grupos de cultivo após 24, 48 e 72 horas de incubação: A) ADSC em meio contendo líquido sinovial osteoartrítico B) ADSC em meio contendo líquido sinovial sem afecção articular; C) ADSC em meio 20% SFB, sem adição de líquido sinovial.....	44
Figura 8.	A partir de um <i>gate</i> (R9) estabelecido na população de interesse (linfócitos), foi criado um histograma (BL1-A), e fixado o ponto de positividade de uma amostra não marcada (controle não marcado), determinando-se assim, o percentual de 80% de células marcadas com CFSE (controle CFSE).....	45
Figura 9.	Com a indução proliferativa de PBMC, utilizando ConA, foi observado aumento de 30% no número de eventos (células) detectados (R7), após 5 dias de incubação.....	46
Figura 10.	A) Aumento de 30% no número de eventos (células) detectados, após 5 dias de incubação, com ConA (R7). B) Inibição da	

proliferação de 23% de PBMC caninas, aos 5 dias de incubação, com ConA e meio condicionado de ADSC irradiadas em 20% de SFB (R7). C) Inibição da proliferação de 22% de PBMC caninas, aos 5 dias de incubação, com ConA e meio condicionado de ADSC irradiadas em 2% de SFB (R7) D) Inibição da proliferação de 17% de PBMC caninas, aos 5 dias de incubação, com ConA e meio condicionado de ADSC sem irradiação em 2% de SFB (R7)..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Delineamento experimental dos grupos de ADSC cultivadas em meio contendo 20% SFB.....	35
Tabela 2.	Delineamento experimental dos grupos de ADSC cultivadas em meio contendo 2% SFB.....	36
Tabela 3.	Dados coletados referentes à avaliação clínica, radiográfica e análise de líquido sinovial.....	42
Tabela 4.	Inibição proliferativa de PBMC após adição de ConA e diferentes meios condicionados.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ADSC	Células-tronco mesenquimais adiposo derivadas
ALT	Alanina transaminase
ATP	Trifosfato de adenosina
CFSE	Carboxifluoresceína succinidil éster
cm^2	Centrímetro quadrado
ConA	Concanavalina A
DAD	Doença articular degenerativa
DCXF	Displasia coxofemoral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
FA	Fosfatase alcalina
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FTBP	Fototerapia com <i>laser</i> de baixa potência
g	Gramma
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
IL	Interleucina
J	Joule
Kg	Quilograma
LCC	Ligamento cruzado cranial
LEDC	Laboratório de embriologia e diferenciação Celular
LSOA	Líquido sinovial osteoartrítico
LSS	Líquido sinovial saudável
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinases
MO	Medula óssea
MPD	Membro pélvico direito
MPE	Membro pélvico esquerdo

MSC	Células-tronco mesenquimais
MV	Microvesículas
mW	Miliwatts
Ng	Nanograma
Nm	Nanometro
OA	Osteoartrite
°C	Graus celsius
P	Passagem
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RLCC	Ruptura de ligamento cruzado cranial
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Osteoartrite	17
3.2 Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (ADSC).....	20
3.3 Fototerapia com <i>laser</i> de baixa potência	22
3.4 Carboxifluoresceína succinidil éster (CFSE)	24
3.5 Concanavalina A (ConA).....	24
3.6 Citometria de fluxo	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Recrutamento de pacientes e locais de desenvolvimento	26
4.2 Coletas de líquido sinovial	27
4.3 Análise de líquido sinovial e preparo das amostras	28
4.4 Cultivo de ADSC.....	29
4.4.1 Determinação dos antígenos de superfície celular	29
4.4.2 Diferenciação de ADSC <i>in vitro</i>	29
4.5 Fototerapia de ADSC com <i>laser</i> de baixa potência	30
4.6 Delineamento experimental	31
4.7 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	37
4.8 Marcação das células PBMC com CFSE.....	38
4.9 Indução da proliferação de PBMC caninas com ConA	38
4.10 Análise da proliferação de PBMC em meios condicionados.....	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Correlação entre as informações clínicas, radiográficas e análises de líquido sinovial.....	40
5.2 Morfologia de ADSC caninas em meios contendo líquido sinovial	44
5.3 Análise de marcação e indução da proliferação de PBMC caninas com CFSE e ConA.....	45
5.4 Análise da proliferação de PBMC caninas em meios condicionados	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES.....	59

REFERENCIAS	61
ANEXO 1	69
ANEXO 2	71

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença debilitante, caracterizada por dor e alterações degenerativas articulares, que acometem especialmente as áreas de suporte de carga do corpo, como quadris e joelho (NAM et al., 2011). Constitui-se na doença articular que mais afeta a população mundial levando à diminuição da qualidade de vida (ROSIS; MASSABKI; KAIRALLA, 2010; SACHETTI et al., 2010).

A restauração ou manutenção da cartilagem na doença articular em pacientes com OA é um desafio para pesquisadores e clínicos (OLDERSHAW, 2012; VILAR et al., 2013), pois não há até o presente momento, terapia conhecida que impeça completamente o início ou a progressão da doença. Provavelmente isso se deva ao fato de muitos processos, ainda desconhecidos, estarem envolvidos na fisiopatogenia da doença. Apesar de ser chamada de doença degenerativa, a OA apresenta processos ativos de remodelação que envolvem, entre muitos fatores, a liberação de citocinas inflamatórias e proteases como principais contribuintes (MALDONADO; NAM, 2013).

Nesse contexto, as células-tronco mesenquimais (MSC) vêm sendo amplamente estudadas devido ao seu grande potencial regenerativo tecidual. Inicialmente acreditava-se que o papel dessas células na regeneração estivesse relacionado à capacidade de diferenciação celular que apresentam. Contudo, evidências sugerem que seu potencial terapêutico seja exercido de forma regulatória, através da secreção de citocinas, fatores de crescimento, exossomas e modulação da expressão gênica, a partir da interação com o microambiente em que estão localizadas (ZIPORI, 2005; PAREKKADAN, 2013).

Aliada a isso, a FTBP), tem apresentado resultados promissores como agente indutor externo de proliferação e reparo tecidual, agindo no incremento da secreção de fatores de crescimento (KARU, 1998; EDUARDO et al., 2008; LINS et al., 2010; CONVISSAR, 2011; BASSO et al., 2012; GARCEZ; RIBEIRO; NUNEZ, 2012) e assim potencializando os efeitos das MSC.

O presente estudo, no intuito de trazer novos esclarecimentos a respeito dessa temática, teve o objetivo de avaliar a inibição proliferativa de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) caninas, em meios condicionados de ADSC, submetidas à FTBP e LSOA, através de citometria de fluxo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a inibição proliferativa de células mononucleares de sangue periférico caninas, em meios condicionados de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, submetidas à fototerapia com *laser* de baixa potência e líquido sinovial osteoartrítico, através de citometria de fluxo.

2.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar as informações clínicas, radiográficas e análises de líquido sinovial de cães com osteoartrite.
- Analisar a morfologia de ADSC caninas em meios contendo líquido sinovial.
- Avaliar a marcação e indução proliferativa de PBMC caninas com carboxifluoresceína succinidil éster (CFSE) e ConA, através de citometria de fluxo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Osteoartrite

A osteoartrite, também conhecida como osteoartrose ou doença articular degenerativa (DAD), é um distúrbio das articulações sinoviais caracterizado pela degeneração da cartilagem articular, além de novas formações ósseas nas margens articulares, esclerose do osso subcondral e diferentes graus de inflamação sinovial (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; FOSSUM, 2008).

É uma doença muito comum, considerada a artropatia mais diagnosticada em humanos (LOESER et al., 2013) e animais (MALEK et al., 2012), afetando cerca de 15% da população humana mundial (EGLOFF; HÜGLE; VALDERRABANO, 2012) e 20% dos cães acima de um ano de idade (FOSSUM, 2008). Pode acometer cães e gatos de qualquer idade ou raça (FOSSUM, 2008) e por comprometer diversos tecidos circundantes às articulações, como líquido sinovial, cápsula articular, músculos, tendões (VAN DER KRAAN, 2012), osso subcondral, membrana sinovial, ligamentos e principalmente cartilagem articular (MALDONADO; NAM, 2013), representa um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes acometidos (IMAMURA et al., 2015).

Essa enfermidade pode ser classificada como primária ou secundária, dependendo da causa que a origina (FOSSUM, 2008). Quando primária ou idiopática é um distúrbio do uso prolongado ou desgaste, que pode estar associado ao envelhecimento, no qual há degeneração cartilaginosa por razões desconhecidas (BOJRAB, 2005; FOSSUM, 2008; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009). Quando secundária frequentemente é resultante de anormalidades que causam instabilidade na articulação (como ruptura do ligamento cruzado cranial - RLCC) ou sobrecarga anormal da cartilagem articular (como ocorre na displasia coxofemoral - DCXF) (BOJRAB, 2005; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009). Fraturas articulares, osteocondrite dissecante, luxações congênicas ou crônicas, necrose asséptica da cabeça do fêmur, artrite séptica, inflamação imunomediada e neuropatias são outros exemplos de afecções que podem anteceder um processo de DAD nos animais (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; FOSSUM, 2008).

A principal queixa da OA é a dor que motivou a procura pelo atendimento médico. Juntamente com esse sintoma, os pacientes podem apresentar rigidez articular, fadiga, limitações na locomoção, distúrbios de sono e ansiedade (LANE et al., 2011).

Na OA, ocorre lesão na membrana sinovial (sinovite) e células inflamatórias, condrócitos e sinoviócitos são responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios no líquido sinovial (FOSSUM, 2008), contribuindo significativamente para o desenvolvimento de dor e degradação da cartilagem articular (SUTTON et al., 2009).

Dentre o vasto número de mediadores envolvidos neste processo, destacam-se como principais fatores pró-inflamatórios as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α); enquanto que envolvidos em mecanismos antiinflamatórios, atuam principalmente a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (TODHUNTER; JOHNSTON, 2007).

Acredita-se que a principal função das citocinas pró-inflamatórias relacionadas à OA, seja estimular numerosas células, incluindo condrócitos, a secretar metaloproteinasas (MMP), como colagenase e estromelisina (JOUGLIN et al., 2000). Além disso, sugere-se estarem envolvidas na inibição da síntese de colágeno tipo II (KAMM; NIXON; WITTE, 2010), na inibição da síntese de proteoglicanos, na síntese de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular cartilaginosa (MEC) e na síntese de outros mediadores como prostaglandina 2 (PGE₂) e óxido nítrico (NO) (MORAES, 2013).

Em contrapartida, o TGF- β induz a proliferação de sinoviócitos, auxilia em maior produção de colágeno e menor síntese de proteases (SUTTON et al., 2009). Além disso, segundo Harvey (1991), parece ainda ter papel na redução da liberação de MMP por IL-1 (MORAES, 2013).

Estudos recentes mostram que a expressão de IL-10 é induzida pelo movimento articular (HELMARK et al., 2010) e possivelmente a diminuição ou deficiência de movimento resulte em menor expressão dessa citocina anti-inflamatória (EGLOFF; HÜGLE; VALDERRABANO, 2012), colaborando para que a perpetuação da doença se estabeleça.

Em cães, o diagnóstico dessa doença pode ser realizado com base na idade, raça, histórico, achados físicos, alterações radiográficas (FOSSUM, 2008) e análise do líquido sinovial (BOJRAB, 2005). A possibilidade de diagnósticos diferenciais como traumas articulares, neoplasias e artrites sépticas também deve ser considerada (FOSSUM, 2008).

Embora existam técnicas mais atuais, a radiografia é a ferramenta de imagem mais acessível na avaliação da articulação com OA (BRAUN; GOLD, 2012). Os principais sinais radiográficos observados incluem a esclerose do osso subcondral, a

formação de osteófitos articulares e periarticulares, o estreitamento do espaço articular e a remodelação óssea (KEALY; MCALLISTER, 2012). No entanto, esse exame pode não condizer com os achados clínicos do paciente. É possível que haja um processo de OA com lesão cartilaginosa, muito antes de alterações serem constatadas no raio x. Assim como, diversos animais com sinais radiográficos da enfermidade, também podem ser assintomáticos (FOSSUM, 2008). Devido a essa fraca correlação entre as informações clínicas e radiográficas, a osteoartrite se torna uma doença heterogênea, em que a avaliação e graduação do estágio em que se encontra, são realizadas com dificuldade (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

A artrocentese é provavelmente uma técnica subutilizada na medicina veterinária, porém todas as articulações suspeitas como sendo a origem de claudicação, devem ser puncionadas (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Apesar de anormalidades laboratoriais raramente estarem presentes na doença degenerativa articular (FOSSUM, 2008), a análise do líquido sinovial pode revelar informações fundamentais a respeito da articulação (TODHUNTER; JOHNSTON, 2007). O exame permite a observação de alterações que possam estar associadas ao processo de sinovite (FOSSUM, 2008) e é realizado através da avaliação macroscópica de aspectos físicos como volume, coloração e viscosidade, além de avaliação microscópica com preparados citológicos para as contagens celulares, mensuração protéica (comparada aos níveis séricos) e cultivo bacteriológico (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).

As opções de tratamento incluem: tratamento conservador, tratamento cirúrgico e artroscopia. O tratamento inicial mais apropriado desses pacientes consiste na modificação das atividades físicas, evitando movimentos excessivos da articulação, manutenção de peso e utilização de anti-inflamatórios (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009). Entretanto, em muitos casos, esse tipo de tratamento pode trazer alívio apenas temporário e a opção cirúrgica ser recomendada. A cirurgia apresenta bons resultados em pacientes com alterações precoces ou anatômicas que propiciam a degeneração articular. Contudo, embora seja necessária para o restabelecimento da função, pode não prevenir a progressão da OA (CRESTANI; TELÖKEN; GUSMÃO, 2006; FOSSUM, 2008).

Assim sendo, a restauração cartilaginosa ainda é desconhecida para pesquisadores e clínicos, médicos humanos e veterinários, e diversas estratégias terapêuticas têm sido estudadas como alternativa para a substituição de terapias mais agressivas (SINGH,

2012). Nesse contexto, tem-se investigado os efeitos das células-tronco mesenquimais na regeneração e/ou manutenção da cartilagem articular na OA (OLDERSHAW, 2012; VILAR et al., 2013).

3.2 Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (ADSC)

Nos últimos anos, as MSC têm sido estudadas como fonte primária de células para utilização em pesquisas e novas terapias (STREM et al., 2005). Estudos demonstram que estas células podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteócitos, miócitos (JUNG et al., 2009; VIOLINI et al., 2009), hepatócitos e células tipo neuronais (JIANG et al., 2002). De acordo com a *International Society of Cellular Therapy* (ISCT) existem alguns critérios mínimos para caracterização de MSC, tais como, morfologia fibroblástica, aderência ao plástico, antígenos de superfície específicos e multipotencialidade *in vitro* (MARTINELLO et al., 2010; TAKEMITSU et al., 2012).

Ainda que a principal fonte de MSC seja a medula óssea (MO), o tecido adiposo tem sido amplamente explorado, por conter ADSC (ZUK et al., 2001). Estas células possuem três grandes vantagens em comparação com as células da MO como fonte de MSC: a) elevada capacidade proliferativa, b) método de extração menos invasivo e c) capacidade de multidiferenciação em um número maior de passagens *in vitro* (STREM et al., 2005; TAKEMITSU et al., 2012). Estas características motivaram a intensificação dos estudos das ADSC como fonte segura e conveniente para uso em medicina regenerativa (RICHARDSON et al., 2007; BAGLIONI et al., 2009; MARTINELLO et al., 2010; GANGJI; MAERTELAER; HAUZEUR, 2011).

Em diversos trabalhos em humanos e em diferentes modelos animais, foram comparados alguns aspectos das diferenças entre as células extraídas do TA subcutâneo e visceral (omento). Os resultados desses estudos demonstram que as MSC derivadas de TA subcutâneo apresentam maior capacidade de proliferação celular quando comparadas à fonte visceral em humanos (BAGLIONI et al., 2009; RADA; REIS; GOMES, 2009), lebres (PEPTAN; HONG; MAO, 2006) e caninos (NEUPANE et al., 2008; YANESELLI, 2015).

Outra propriedade das MSC está relacionada ao efeito parácrino que exercem, através da secreção de citocinas, fatores de crescimento e exossomas. O papel regulatório dessas células é também ilustrado pela capacidade que possuem de modular

sua expressão gênica a partir da interação com o microambiente (ZIPORI, 2005; PAREKKADAN, 2013).

Diante das evidências deste papel predominantemente regulatório, estudos com células-tronco têm sido desenvolvidos com enfoque na interação entre estas células e as células do sistema imunológico. Acredita-se que seu papel esteja envolvido tanto na proteção ao dano tecidual frente a reações inflamatórias, quanto na otimização da eliminação de patógenos através da ativação imune local (LI, 2012).

Nesse contexto, a interação entre MSC e linfócitos T tem sido amplamente estudada, principalmente *in vitro*. As MSC podem modular a função das células T, especialmente no controle do ciclo celular, da proliferação e secreção de citocinas. Além do caráter do mecanismo ser importante, a reversibilidade da inibição da proliferação é fundamental e denota que a célula mesenquimal pode exercer sua influência sem mecanismos deletérios ou morte celular (KRAMPERA et al., 2003).

Estas células segregam várias moléculas bioativas às quais é atribuído o potencial imunossupressor, em que participam quatro moléculas principais: indolamina 2,3 dioxigenase (IDO), antígeno leucocitário humano do tipo G (HLA-g), IL-10 e TGF- β (JONES; MCTAGGART, 2008).

Embora seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente elucidado, acredita-se que sua função seja desempenhada também através da secreção de grandes quantidades de nano e microvesículas (MV), tanto constitutivamente quanto sob atividade (RATAJCZAK et al., 2006).

Mokarizadeh et al. (2012) caracterizaram MV de MSC co-cultivadas com fração mononuclear de MO. Essas MV foram positivas para PD-L1, Gal-1 e TGF- β . Por outro lado, a co-cultura de linfócitos com MV de MSC inibiu a proliferação e aumentou os níveis de IL-10, TGF- β e linfócitos Treg. MV de ADSC foram capazes de inibir a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺. Outros autores ainda demonstraram a capacidade de MV em modular a proliferação e a diferenciação de células B em plasmócitos (BUDONI et al., 2013; BLAZQUEZ et al., 2014).

No caso de aloenxertos, além de liberarem fatores antiinflamatórios inibitórios, estas células não expressam vários antígenos de superfície imunologicamente importantes no reconhecimento por linfócitos T e B (LE BLANC et al., 2003). Fazendo com que transplantes alógenos de MSC não causem comprometimentos ao paciente por rejeição.

As MSC têm sido testadas em muitos ensaios pré-clínicos com diferentes modelos animais, tais como ratos (IMANISHI et al., 2008), coelhos (PEPTAN; HONG; MAO, 2006; NIEMEYER et al., 2010) e caninos (JUNG et al., 2009; YANESELLI et al., 2013) e têm sido importantes para a medicina veterinária, principalmente nas áreas de regeneração de lesões ortopédicas de cães e equinos (YANESELLI et al., 2013).

3.3 Fototerapia com *laser* de baixa potência (FTBP)

O termo *laser* é uma sigla para o termo inglês *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, em português, Luz Amplificada pela Emissão Estimulada de Radiação (MILLIS; MARTINEZ, 2007). A FTBP, ou terapia com *laser* de baixa intensidade (TLBI), surgiu nas décadas de 60 e 70, quando pesquisadores europeus descobriram a capacidade do *laser* em induzir bioestimulação (KARU, 1998). Os primeiros relatos do uso da FTBP foram sobre a cicatrização de feridas, gerando o interesse em outras áreas da medicina regenerativa, especialmente por acelerar o processo de regeneração (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

A FTBP refere-se ao uso do *laser* vermelho ou infravermelho com comprimento de onda entre 600-1.100nm e potência de saída de 1-500mW. Esse tipo de irradiação pode ser contínuo ou pulsado, e consiste num feixe constante de baixa intensidade de energia (0.04-50J/cm²), o qual é direcionado a um tecido alvo ou monocamada de células utilizando potências medidas em miliwatts (mW) (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012).

Além de promover a cicatrização dos tecidos, possui ação analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana (CONVISSAR, 2011; GARCEZ; RIBEIRO; NUNEZ, 2012). Pesquisas têm sido realizadas, a partir da irradiação em culturas celulares de diversas linhagens, para a maior compreensão do mecanismo de ação e da eficácia dessa terapia. A aplicação da FTBP *in vitro* tem apresentado o aumento da proliferação celular e da atividade mitocondrial, com maior produção de trifosfato de adenosina (ATP), síntese de RNA e DNA, sem qualquer efeito citotóxico (GARCEZ; RIBEIRO; NUNEZ, 2012).

A fotobioestimulação da atividade celular promovida pela terapia com *laser* de baixa potência é responsável por secretar um amplo painel de fatores de crescimento e citocinas, como TGF- β , fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), interferon- γ (IFN- γ), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e algumas interleucinas, em resposta ao aumento da síntese de proteínas, ATP e proliferação celular. Por esse

motivo, a fim de mensurar os possíveis efeitos do *laser* sobre as células, geralmente são realizados ensaios que avaliam proliferação e viabilidade celular, dano ao DNA, integridade de membrana, síntese e secreção de proteínas, morfologia e características ultra-estruturais (PEPLOW et al., 2011). Por atuar em nível celular, o *laser* de baixa potência provoca modificações bioquímicas, bioelétricas e bioenergéticas, aumentando o metabolismo, a proliferação e a maturação celular. O incremento do metabolismo celular induzido pelo *laser* eleva os níveis de ATP pela estimulação de fotorreceptores na cadeia respiratória mitocondrial, além de aumentar a liberação de fatores de crescimento, citocinas e a síntese de colágeno (LINS et al., 2010).

Entre as linhagens celulares irradiadas destacam-se as MSC, isoladas de diferentes tecidos, como MO, tecido adiposo, cordão umbilical, tecido cardíaco, tecido muscular e polpa dentária (EDUARDO et al., 2008; GIANNELLI et al., 2013). MSC irradiadas com *laser* de baixa intensidade apresentam suas propriedades terapêuticas potencializadas, pelo aumento da secreção de fatores de crescimento e citocinas destas células (ALGHAMDI; KIMAR; MOUSSA, 2012; GIANNELLI et al., 2013), como por exemplo, TGF- β , PDGF, HGF e interleucinas (PEPLOW et al., 2011).

Devido à extensa diversidade de protocolos relatados em literatura (quanto a tipos de *laser*, equipamentos, comprimentos de onda, densidade de energia e *déficit* nutricional das células), a padronização se faz necessária a fim de conhecer o comportamento da linhagem celular estudada frente ao estímulo desejado (KARU, 1998; DIAS et al., 2009; BASSO et al., 2012). Acredita-se que a densidade de energia aplicada *in vitro* deva respeitar o intervalo de 0,05 a 10J/cm², uma vez que, acima desta potência os resultados obtidos apresentam efeitos bioinibitórios. Os melhores resultados para a proliferação de várias linhagens celulares ocorreram quando a densidade de energia foi selecionada entre 0,05 a 4J/cm² (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012) e em dados obtidos em trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (LEDC-HCPA), observaram-se melhores resultados utilizando o *laser* no comprimento de onda de $\lambda=904\text{nm}$ (PIGNONE, 2015).

Adicionalmente, para que os efeitos indutores da FTBP sobre culturas celulares sejam observados, como aumento da proliferação celular e da atividade mitocondrial, há necessidade de submetê-las a estresse, a partir da supressão de SFB no meio de cultura ofertado. Este *déficit* nutricional propicia uma simulação de lesão tecidual, onde se necessita reparo (KARU, 1998, EDUARDO et al., 2008).

3.4 Carboxifluoresceína succinidil éster (CFSE)

O diacetato de CFSE é uma molécula que pode ser utilizada na investigação da proliferação celular *in vitro* ou *in vivo* (ASQUITH et al., 2006; EVRARD et al., 2010; QUAH, PARISH, 2010). Ela consiste em dois grupos acetato e um grupo funcional succinidil éster. Nesta forma, é permeável à membrana celular e não-fluorescente (SILVA R. F., 2011). Segundo Lyons (2000), após sua difusão para o meio intracelular, esterases endógenas removem os grupos acetato, tornando a molécula altamente fluorescente e não-permeável à membrana celular (PASSARELLI, 2011). Além disso, possui a capacidade de ficar retida no interior da célula por semanas, sem comprometer a viabilidade celular (ASQUITH et al., 2006; EVRARD et al., 2010; QUAH; PARISH, 2010).

A intensidade de fluorescência do CFSE é inversamente proporcional à proliferação celular, pois durante cada ciclo de divisão (mitose), o corante é distribuído equitativamente entre as células filhas geradas. Portanto, segundo Tomiyoshi et al. (2009), a diminuição da intensidade de fluorescência indica proliferação celular (PASSARELLI, 2011). A análise do decréscimo das moléculas de CFSE por citometria de fluxo permite verificar um perfil característico de picos que representam essa diminuição (ASQUITH et al., 2006; EVRARD et al., 2010; QUAH; PARISH, 2010).

3.5 Concanavalina A (ConA)

Os linfócitos presentes na fração de células mononucleares do sangue periférico estão predominantemente na fase quiescente do ciclo celular. Rhodes e Milton (1998) relatam que, *in vitro*, esse tipo de célula pode ser estimulado com determinadas substâncias e retornar ao ciclo celular normal com conseqüente síntese de DNA e divisão celular (SILVA R.F., 2011).

Entre os mitógenos utilizados para essa finalidade, está a ConA, que é uma lectina extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*. A ConA é utilizada como mitógeno inespecífico nas culturas de células mononucleares, pois é capaz de se ligar não-covalentemente aos carboidratos da superfície dos linfócitos, promovendo um aumento da entrada de cálcio na célula, proporcionando o estímulo para a síntese de DNA e resultando na proliferação celular. Segundo Mccole e colaboradores (1998) a proliferação de linfócitos mediada pela ConA é dependente de células acessórias, sendo necessária a presença de macrófagos e linfócitos B (PASSARELLI, 2011).

3.6 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo, desenvolvida na década de 1970, é uma técnica quantitativa de análise celular, que possibilita a medida simultânea de múltiplas características físicas, químicas e biológicas de células em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de luz (RILEY et al., 2005).

O princípio básico da citometria de fluxo é fazer as células em suspensão passarem de forma alinhada por um feixe de luz com comprimento de onda constante, geralmente um *laser*, que ao interceptar as células gera sinais que são captados e transformados por detectores apropriados. Os sinais eletrônicos produzidos são proporcionais ao tamanho, complexidade interna e intensidade de fluorescência relativa da célula analisada (CAMPAGNARO, 2012).

Dentre suas principais aplicações, destacam-se as relacionadas à farmacologia (estudos de cinética celular e resistência a fármacos), microbiologia (sensibilidade a antimicrobianos), biologia molecular (ensaio de apoptose e proliferação celular) e genética (cariótipo) (RILEY et al., 2005).

Desse modo, essa ferramenta pode ser utilizada para a avaliação da proliferação celular de PBMC, através da marcação celular com CFSE e indução com ConA (FILHO, 2010; CALDAS, 2011; SILVA R. F., 2011; SOARES, 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Recrutamento de pacientes e locais de desenvolvimento

Este trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) do HCPA, sendo aceito sob o protocolo número 150239 (ANEXO 2).

Durante o desenvolvimento deste estudo, foram recrutados 9 doadores de líquido sinovial, cães de ambos os sexos (5 fêmeas e 4 machos), de raças variadas, com idade entre 9 meses e 6 anos, pesando entre 21,8 e 40kg (média de 28,81kg) provenientes da rotina hospitalar do Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV), localizado na Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e de clínicas particulares em Porto Alegre.

Dentre os cães selecionados, 6 pacientes foram previamente diagnosticados com afecções articulares e recrutados para a obtenção das amostras de líquido sinovial das articulações com OA. Os 3 doadores restantes, após avaliação prévia, sem quaisquer afecções articulares, foram inclusos no experimento para a obtenção das amostras de líquido sinovial das articulações saudáveis.

Todos os animais foram previamente submetidos à avaliação clínica geral e ortopédica, análises sanguíneas [hemograma, dosagem de alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina e albumina] e radiografias das articulações afetadas.

As alíquotas de líquido sinovial das articulações com OA foram analisadas no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias (LACVet) e no Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFRGS.

O preparo dos líquidos sinoviais coletados, assim como a obtenção de ADSC caninas, as irradiações celulares e os cultivos experimentais foram realizados no LEDC do HCPA.

As PBMC contendo linfócitos, utilizadas na etapa de proliferação celular, foram obtidas através da coleta de sangue periférico de uma doadora canina, hígida, previamente submetida à avaliação clínica geral e análise sanguínea (hemograma, dosagem de ALT, FA, uréia, creatinina e albumina). A proliferação dessas células foi mensurada por citometria de fluxo na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do HCPA.

Todas as amostras de líquido sinovial utilizadas no experimento foram obtidas após consentimento dos tutores, que assinaram um Termo de Autorização de Coleta de Líquido sinovial (ANEXO 1).

4.2 Coletas de líquido sinovial

As coletas de líquido sinovial dos pacientes com osteoartrite foram realizadas durante o período transoperatório desses cães, submetidos às cirurgias de Avanço da Tuberosidade Tibial (TTA) como tratamento para RLCC e colocefalectomia como tratamento para displasia coxofemoral (DCXF).

A obtenção de líquido sinovial dos doadores sem afecção articular ocorreu após a indução anestésica, durante o período pré-operatório de cães submetidos à cirurgia de ovariectomia eletiva.

As artrocenteses de joelho foram realizadas com agulha calibre 40x12, acoplada à seringa de 10mL, inserida na porção lateral ao ligamento patelar e distal à patela (FIGURA 1). Nas coletas da articulação coxofemoral lançou-se mão do mesmo material, e com o membro abduzido e rotacionado medialmente foi feita a inserção da agulha na porção dorsal ao trocânter maior, com inclinação da mesma, ventral e caudalmente.

Após as punções de líquido sinovial das articulações com OA, 300 μ L de cada coleta foram transferidos para tubo contendo anticoagulante ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) e encaminhados para análise físico-química. O restante do líquido sinovial foi armazenado em *ependorf* estéril, centrifugado e congelado para os cultivos experimentais; e a seringa utilizada na coleta foi encaminhada para análise microbiológica.



Figura 1. Artrocentese de líquido sinovial incolor, em articulação fêmoro-tíbio-patelar de cão sem afecção articular.

4.3 Análise de líquido sinovial e preparo das amostras

As análises de líquido sinovial incluíram avaliação de aspectos físicos (como volume, coloração e viscosidade), contagem celular total (IDEXX Pro Cyte Dx[®] Hematology Analyzer) e diferencial (esfregaços corados com solução de coloração hematológica Wright), concentração total de proteínas (espectrofotometria CM200 Wienerlab) e cultivo bacteriológico.

No intuito de se diminuir a adesão celular (provocada pela viscosidade do líquido sinovial) e melhorar a acurácia das contagens celulares, foram realizadas diluições com hialuronidase (80UI/mL of Hyaluronidase Enzyme in a HEPES buffered HTF Medium HSA and Gentamicin), na proporção de 1:1, e posterior incubação a 37°C por 10 minutos.

As culturas bacteriológicas foram realizadas através de semeadura do conteúdo da seringa de coleta em ágar sangue, à temperatura de incubação 36°C, durante um período de 72 horas para o crescimento das seguintes espécies *Staphylococcus intermedius* e *Streptococcus* spp.

Os líquidos sinoviais coletados foram centrifugados a 500g (1600rpm), durante 3 ciclos de 5 minutos, identificados e congelados a -80°C para a realização da etapa de cultivo de ADSC em meios contendo líquido sinovial.

4.4 Cultivo de ADSC

As ADSC caninas previamente isoladas, cultivadas, caracterizadas e congeladas em estudo anterior (YANESELLI, 2015), foram descongeladas em passagem 3 (P3), expandidas em uma passagem, cultivadas em meio DMEM-Low Glucose, com concentração de 20% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina e mantidas a 37°C com 5% de CO₂ e alta umidade de ar. Diariamente foram avaliados crescimento celular e morfologia e a cada 48 horas procederam-se as trocas do meio de cultivo.

4.4.1 Determinação dos antígenos de superfície celular

Para as análises de imunofenotipagem realizadas em estudo prévio (YANESELLI, 2015), utilizou-se a técnica de citometria de fluxo. As células foram lavadas com solução *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) composta por solução tampão salina sem Ca⁺⁺ ou Mg⁺⁺, 0,5 EDTA e 0,5% SFB, tripsinizadas e ressuspendidas em FACS. Em seguida, as células foram centrifugadas a 400g por 5 minutos, ressuspendidas em FACS e foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os seguintes anticorpos: 10µL anti-CD44 conjugado com alofococianina (clone IM7, Leinco Technologies Inc., St Louis, MO, USA), 10µL anti-CD45 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (CD45RO, clone UCHL1, Acris Antibodies, San Diego, CA, USA) e 20µL de anti-CD90 conjugado com ficoeritrina (THY1, clone 5E10, antibodies-online, Atlanta, GA, USA). A aquisição de dados foi feita através de FACS Canto II (BD Bioscience) totalizando o mínimo de 5000 eventos por amostra. Posteriormente os dados foram analisados através de software Flow Jo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

4.4.2 Diferenciação de ADSC *in vitro*

Para a realização da diferenciação celular, as ADSC foram plaqueadas a uma densidade de $9,4 \times 10^3$ células por poço em uma placa de 24 poços, em duplicata. Após 24-48 horas em meio de crescimento sem antibiótico deu-se início à indução de diferenciação *in vitro* em meio de cultivo apropriado (YANESELLI, 2015).

Diferenciação adipogênica: foram adicionados ao meio de crescimento 5µM isobutimetilxantina (Sigma), 60µM indometacina (Sigma), 1µM dexametasona (Sigma) e 5µg/mL insulina (Sigma). As células foram mantidas durante 21 dias em indução com troca de meio a cada 3-4 dias. Após esse período, foram fixadas com solução de

paraformaldeído 4% durante 15 minutos. Foi avaliada a presença de depósitos lipídicos através da coloração OilRed O (Sigma).

Diferenciação condrogênica: foram adicionados ao meio de crescimento 50µM ácido ascórbico (Sigma), 10ng/mL TGF-β (Sigma), 6,25µg/mL de insulina. As células foram mantidas durante 21 dias em indução com troca de meio a cada 3-4 dias. Após esse período, foram fixadas com formaldeído e submetidas à coloração Alcian Blue, para detectar a presença de matriz cartilaginosa.

Diferenciação osteogênica: foram adicionados ao meio de crescimento 1µM dexametasona, 10mM β-glicerofosfato (Sigma) e 50µM ácido ascórbico (Sigma). As células foram mantidas durante 21 dias em indução com troca de meio a cada 3-4 dias. Após esse período, foram fixadas e submetidas à coloração Alizarin Red S (Sigma), para detecção de matriz mineralizada.

4.5 Fototerapia de ADSC com *laser* de baixa potência

A metodologia escolhida para a realização das irradiações de ADSC, com *laser* de baixa potência, baseou-se em resultados obtidos em trabalho anteriormente realizado pelo grupo de pesquisa do LEDC-HCPA.

Todas as irradiações foram realizadas com o aparelho de *laser* Endophoton® (KLD Biosistemas Ltda., Amparo, SP, Brasil). A densidade de energia utilizada no comprimento de onda de 904nm foi 3J/cm², sendo pré-determinados 5 pontos de irradiação, por poço, na placa de cultura de 12 poços. Para padronização das irradiações, foi utilizado um *grid*, confeccionado em experimento anterior (PIGNONE, 2015), de acordo com o tamanho do *spot* da caneta de *laser* (0,035cm²), o qual era posicionado acima da tampa da placa de cultura no momento da irradiação.

Além disso, todas as placas de cultura dos grupos irradiados foram colocadas sobre um suporte, chamado de *template*, o qual foi confeccionado, também em experimento anterior, pelo setor de Engenharia Biomédica do HCPA. A aplicação do *laser* ocorreu com a caneta do aparelho imóvel posicionada abaixo da placa de cultura, sempre com a mesma distância de 2mm entre a placa e o *spot*. Para não haver interferência nos pontos de aplicação pré-determinados, foi utilizado um campo semi-escuro delimitando a área de irradiação, minimizando assim a reflexão da luz (FIGURA 2). Essas ferramentas e premissas foram estabelecidas a fim de padronizar as condições de aplicação do *laser* nas células.

A força de irradiação do aparelho utilizado foi de 50mW, com tempo de exposição de 18 segundos e modo de irradiação contínuo. Foram realizadas três aplicações do *laser* de AsGa (arseneto de gálio), nas ADSC, com intervalo de 6 horas. Dois grupos foram submetidos a *déficit* nutricional de 2% de SFB, 24 horas antes da primeira irradiação, visando uma melhor resposta à terapia obtida. Os ensaios com a adição dos diferentes líquidos sinoviais foram realizados 24 horas após a primeira irradiação.



Figura 2. Placa de cultivo sobre o *template* (⇒) . Acima da placa de cultivo observa-se o *grid* (⇐) para padronização das irradiações. A caneta do aparelho (⇐) permanece imóvel e posicionada abaixo da placa de cultura. O campo semi-escuro (⇨) delimita a área de irradiação, minimizando a reflexão da luz.

4.6 Delineamento experimental

Para as condições experimentais, após as culturas de ADSC atingirem cerca de 80-90% de confluência, as células em passagem 4 (P4) foram plaqueadas (dia 1) em placa de 12 poços, a uma densidade de 1×10^4 células por poço, contendo meio DMEM-Low Glucose com concentração de 20% de SFB, sendo utilizados 3 poços para cada grupo experimental.

No segundo dia foram realizadas as trocas dos meios DMEM-Low Glucose, com diferentes concentrações de soro fetal bovino (20% ou 2%), de acordo com o grupo experimental.

No terceiro dia dos grupos G1 (ADSC 20% SFB +LSOA) e G5 (ADSC 20% SFB + LSS), trocas de meio de cultivo e adição de líquido sinovial foram efetuadas (na proporção de 700µL para 300µL, respectivamente), seguidas de incubação por 72 horas. Mantendo essa mesma concentração de SFB, foram realizados grupos (controle) sem irradiações e sem acréscimo de líquido sinovial (G6), irradiados e com líquido sinovial (G2) e irradiados sem acréscimo de líquido sinovial (G7).

No grupo G4 (ADSC 2% SFB IRRADIADAS + LSOA), devido à necessidade de 24 horas de déficit nutricional prévio à FTBP, no terceiro dia foram realizadas trocas de meio e irradiações, sendo a adição de líquido sinovial feita no dia seguinte (dia 4), nas mesmas proporções já descritas e seguida de incubação por 72 horas. Sob essa mesma concentração de SFB, foram realizados grupos (controle) irradiados e sem acréscimo de líquido sinovial (G9), sem irradiação e com líquido sinovial (G3) e não irradiados sem adição de líquido sinovial (G8).

Os grupos G7, G8 e G9 foram realizados com 96 horas de incubação objetivando-se o mesmo período entre plaqueamento e congelamento que os outros grupos com as mesmas concentrações de SFB. Além disso, devido a possível liberação de citocinas ao meio condicionado, após as irradiações não foram realizadas novas trocas de meio de cultivo.

Além dos grupos anteriormente citados, procedeu-se ainda, na etapa seguinte, de proliferação celular de PBMC, a execução de um grupo (controle) somente com líquido sinovial (G10).

O fluxograma dessa etapa do experimento segue ilustrado nas figuras 3 e 4 e o delineamento experimental de cada um dos grupos, segue descrito nas tabelas 1 e 2.

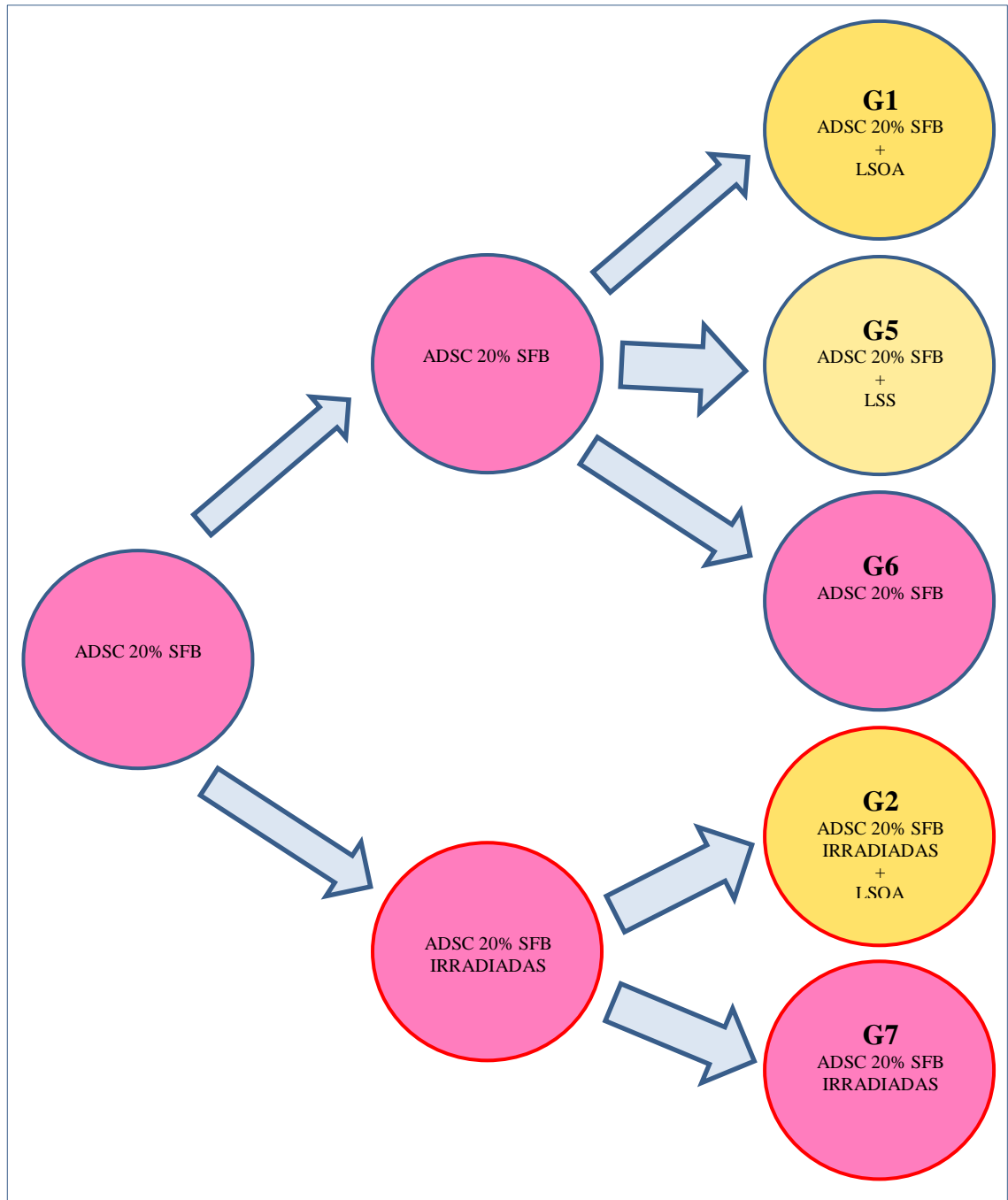


Figura 3. Fluxograma dos grupos de ADSC em meio contendo 20% de SFB.

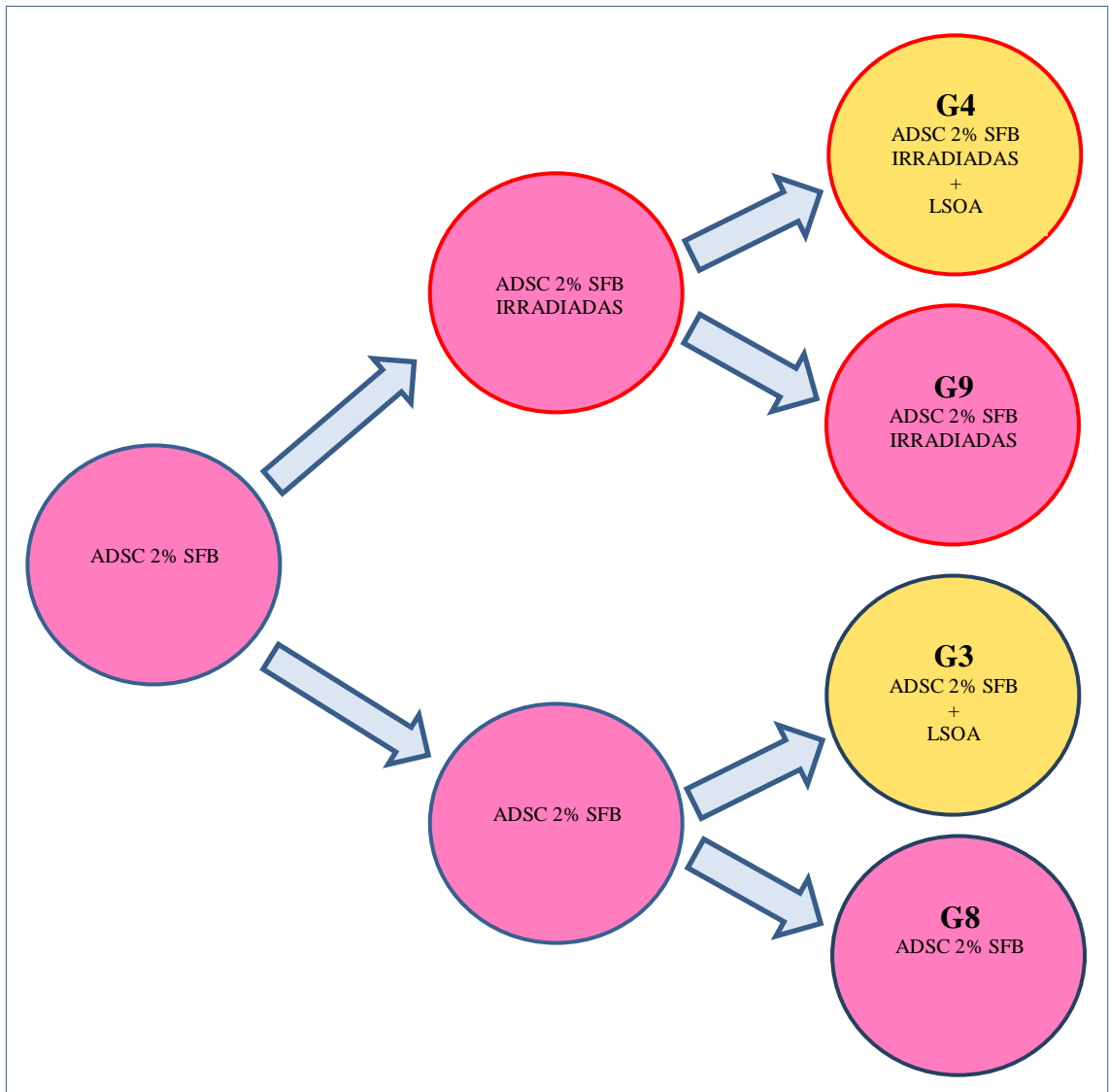


Figura 4. Fluxograma dos grupos de ADSC em meio contendo 2% de SFB.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS ADSC EM MEIO 20% SFB					
G1) ADSC 20% SFB + LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOARTRÍTICO					
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB + Líquido sinovial osteoartrítico	24hs	48hs	72hs: Centrifugação e congelamento
G5) ADSC 20% SFB + LÍQUIDO SINOVIAL SAUDÁVEL					
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB + Líquido sinovial saudável	24hs	48hs	72hs: Centrifugação e congelamento
G6) ADSC 20% SFB					
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB	24hs	48hs	72hs: Centrifugação e congelamento
G2) ADSC 20% SFB IRRADIADAS + LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOARTRÍTICO					
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB + Irradiações	Adição de líquido sinovial osteoartrítico	24hs	48hs	72hs: Centrifugação e congelamento
G7) ADSC 20% SFB IRRADIADAS					
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 20% SFB + Irradiações	24hs	48hs	72hs	96hs: Centrifugação e congelamento

Tabela 1: Delineamento experimental dos grupos de ADSC cultivadas em meio contendo 20% SFB.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DOS GRUPOS ADSC EM MEIO 2% SFB						
G4) ADSC 2% SFB IRRADIADAS + LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOARTRÍTICO						
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 2% SFB	Troca de meio 2% SFB + Irradiações	Adição de líquido sinovial osteoartrítico	24hs	48hs	72hs: Centrifugação e congelamento
G9) ADSC 2% SFB IRRADIADAS						
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 2% SFB	Troca de meio 2% SFB + Irradiações	24hs	48hs	72hs	96hs: Centrifugação e congelamento
G3) ADSC 2% SFB + LÍQUIDO SINOVIAL OSTEOARTRÍTICO						
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 2% SFB	Troca de meio 2% SFB	Adição de líquido sinovial osteoartrítico	24hs	48hs	72hs: Centrifugação e congelamento
G8) ADSC 2% SFB						
Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Plaqueamento: 1x10 ⁴ ADSC em meio 20% SFB	Troca de meio 2% SFB	Troca de meio 2% SFB	24hs	48hs	72hs	96hs: Centrifugação e congelamento

Tabela 2: Delineamento experimental dos grupos de ADSC cultivadas em meio contendo 2% SFB.

4.7 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Para obtenção das células mononucleares de sangue periférico, foram extraídos 12mL de sangue total de um paciente canino, fêmea, com 2 anos de idade e saudável. A coleta foi realizada por meio da venopunção jugular, utilizando tubos a vácuo (Vacuette), contendo o anticoagulante EDTA. Imediatamente após a coleta, as amostras foram encaminhadas, sob refrigeração, ao LEDC-HCPA, para proceder-se a separação da fração mononuclear.

As amostras de sangue total foram divididas em 4 tubos cônicos de 15mL e diluídas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS, pH 7,2), na proporção de 1:1. Em seguida, o sangue diluído de cada tubo foi depositado em um novo tubo, sobre uma solução de Ficoll (Life Technologies) na proporção de 2:1, sendo a suspensão adicionada pela parede do tubo, evitando desta forma, a mistura das frações. Em seguida procedeu-se a centrifugação a 400g por 35 minutos, com aceleração e desaceleração lenta.

Ao término da centrifugação, a camada de PBMC (formando um halo levemente mais denso, localizado na interface criada com a centrifugação), foi removida e transferida para outro tubo, sendo adicionado PBS na proporção de 1:2, para lavagem das células e retirada de resíduos. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 100g por 10 minutos. Esta etapa de lavagem foi repetida mais uma vez. O procedimento realizado para a obtenção de PBMC está ilustrado na figura 5.

Após a obtenção das PBMC, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS e foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer, para se determinar a quantidade do marcador CFSE a ser utilizada para avaliar a proliferação celular.

Foram separadas alíquotas sem marcação, para a confecção de grupos controle antes e após o período de incubação.

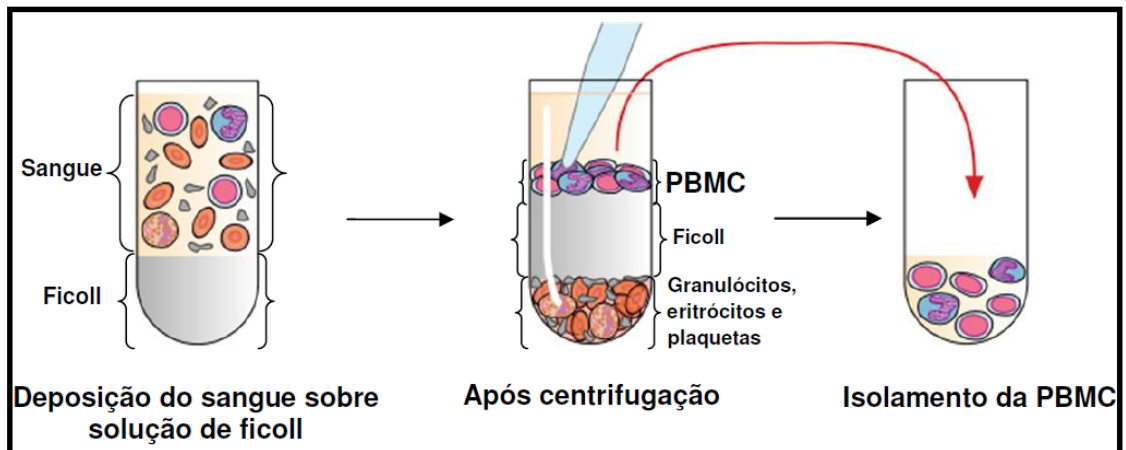


Figura 5: Ilustração do procedimento realizado para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (SILVA R. F., 2011).

4.8 Marcação das células PBMC com CFSE

Após a contagem em câmara de Neubauer, foi realizada a marcação celular com CFSE (kit CellTrace™ Life Technologies), sendo utilizado 1µL do marcador (5µM), para cada mL de suspensão de PBMC (até 10^6 células). As amostras foram incubadas por 20 minutos a 37°C, conforme as recomendações do fabricante.

Ao término da incubação, as células foram transferidas para tubos contendo meio RPMI 1640 suplementado com 1% penicilina e estreptomicina; 10% SFB, para a inativação do marcador. Após 5 minutos em repouso, foi realizada centrifugação a 100g, durante 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI 1640 suplementado, e realizada nova contagem celular em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento em placa de 24 poços a uma densidade de 5×10^4 células por poço, sendo mantida a proporção de 10 PBMC para cada ADSC anteriormente cultivada no meio condicionado (SILVA, C. L., 2009).

4.9 Indução da proliferação de PBMC caninas com ConA

Após a marcação das células com CFSE e plaqueamento nas condições descritas anteriormente, procedeu-se a indução da proliferação celular de PBMC com a adição de ConA (5µg/mL). Em seguida, os diferentes meios condicionados foram adicionados e realizou-se incubação por um período de 5 dias sob temperatura de 37°C e 5% de CO₂.

4.10 Análise da proliferação de PBMC em meios condicionados

Ao término do cultivo celular, cada poço foi transferido para um *eppendorf* e procedeu-se a leitura das amostras, através da citometria de fluxo, no intuito de se avaliar a proliferação celular de PBMC submetidas aos diferentes meios condicionados de ADSC.

Após ajuste de detectores para a correta captação da fluorescência emitida pela amostra, foi feita a aquisição de dados em citômetro de fluxo Attune Acoustic Focusing Cytometer (com laser de 488nm e 405nm, Thermo Fisher Scientific) e posterior análise através de software Attune.

A partir de um *gate* estabelecido na população de interesse (linfócitos) em gráfico de pontos FSC X SSC (Forward Scatter, tamanho *versus* Side Scatter, granulidade ou complexidade interna), foi criado um histograma (BL1), fixado o ponto de positividade (final da curva de uma amostra não marcada) e determinado assim, a porcentagem de células marcadas com CFSE e induzidas nas amostras teste dos dias 0 e 5.

5 RESULTADOS

5.1 Correlação entre as informações clínicas, radiográficas e análises de líquido sinovial

Quanto às suas características físicas, os pacientes com afecções articulares eram de raças variadas, ambos os sexos (2 fêmeas e 4 machos), com idade entre 9 meses e 6 anos e pesando entre 21,8 e 32kg (média de 26,8kg). Enquanto que os cães sem afecções articulares, eram também de raças variadas, sendo 3 fêmeas, com idade até 2 anos e pesando entre 25,4 e 40kg (média de 32,8kg).

Os sinais clínicos observados nos pacientes com problemas articulares foram claudicação, dificuldade de locomoção e/ou ao levantar e dor durante a manipulação das articulações afetadas. Destes animais, 4 foram diagnosticados com RLCC e os outros 2 apresentavam DCXF bilateral grave. Dos quatro pacientes com RLCC, 3 apresentavam sinais crônicos (de 2 a 4 meses), e imagens radiográficas compatíveis com processos de degeneração articular foram observadas nas articulações acometidas pela ruptura ligamentar. O paciente restante (com RLCC) apresentava sinais clínicos recentes (há uma semana), não sendo observados sinais radiográficos de OA. Dos dois pacientes com DCXF, ambos manifestavam sinais crônicos (de 2 meses a 3 anos), com luxação e OA severa nas imagens radiográficas do quadril. Um dos pacientes com RLCC, apresentava também DCXF moderada e um dos pacientes com DCXF foi diagnosticado ainda com OA bilateral femorotibiopatelar.

Portanto, dos 6 pacientes com afecções articulares, 5 (3 com RLCC e 2 com DCXF) apresentavam sinais crônicos e imagens radiográficas compatíveis com OA; enquanto um (RLCC) apresentava sinais recentes de claudicação, sem imagens de OA nas radiografias, mas com análise de líquido sinovial compatível com a enfermidade.

As amostras de líquido sinovial dos processos de afecções crônicas foram hipocelulares com contagem do número de células nucleadas totais até 1380 células/ μ L, sendo essa população composta por linfócitos reativos (6 – 21%) e macrófagos ativados (78 – 94%) apresentando debris intracitoplasmáticos. Na amostra de um dos pacientes displásicos foi observada ainda, a presença de neutrófilos (3%). Enquanto que, no processo de claudicação recente, por ruptura de ligamento cruzado, a amostra de líquido sinovial era hiper celular, com contagem do número de células nucleadas totais de 2060 células/ μ L, sendo essa população composta por linfócitos reativos (22%) e

macrófagos ativados (78%) com debris intracitoplasmáticos, eritrofagocitose e leucofagocitose.

Em todas as amostras de líquido sinovial analisadas foram visualizadas células nucleadas, dispostas em fileiras (“windrowing”), além de fundo das lâminas com conteúdo proteináceo denso discretamente basofílico, e não foi observada presença de microorganismos intra ou extracelulares.

Em relação à análise bacteriológica, não houve crescimento microbiano após 72 horas de cultivo em nenhuma das amostras.

O volume de líquido sinovial coletado das articulações com afecção variou de 0,6 – 6mL totais em cada paciente (média de 1,98mL), correspondendo a uma variação de 0,02 a 0,25mL/kg. Nas coletas das articulações saudáveis, o volume obtido foi de 0,3 – 0,6mL (média de 0,46mL), correspondendo a variação de 0,01 a 0,02mL/kg. De cinco pacientes saudáveis, submetidos à anestesia inalatória e castração, dois foram descartados do experimento, devido à dificuldade de obtenção de líquido sinovial na coleta. Na tabela 3 estão expressos os dados referentes a essas correlações.

A coloração do líquido sinovial coletado das articulações com afecções articulares foi amarelo palha e a coloração do líquido das articulações saudáveis foi incolor. (FIGURA 6).

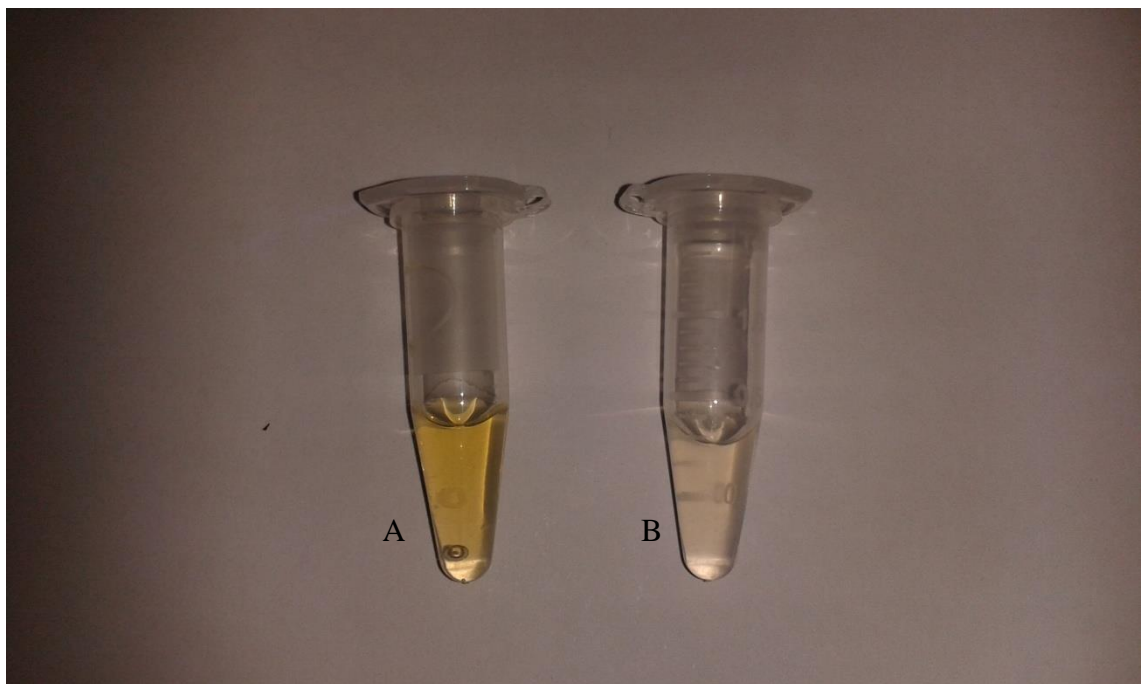


Figura 6. A) Líquido sinovial osteoartítico (coloração amarelo palha); B) Líquido sinovial saudável (incolor).

Tabela 3. Dados coletados referentes à avaliação clínica, radiográfica e análise de líquido sinovial

Afecção articular/ Período de tempo	RX	Volume de líquido sinovial	Contagem celular total e diferencial	Presença de outras afecções articulares
RLCC (MPD) há 2 meses.	Sinais de OA	1,5mL	430 células/ μ L: 11% linfócitos reativos; 89% macrófagos ativados; debris intracitoplasmáticos nos macrófagos.	DCXF moderada (MPE).
DCXF bilateral há 3 anos.	Sinais de OA severa com luxação bilateral	1,3mL	500 células/ μ L: 6% linfócitos reativos; 94% macrófagos ativados; debris intracitoplasmáticos nos macrófagos.	Osteoartrose joelho (bilateral).
RLCC (MPD) há um ano, com recidiva de instabilidade há 4 meses.	Sinais de OA	0,6mL	1380 células/ μ L: 21% linfócitos reativos; 79% macrófagos ativados; debris intracitoplasmáticos nos macrófagos.	-
RLCC (MPE) há 7 dias.	Sem sinais de OA	1,5mL	2060 células/ μ L: 22% linfócitos reativos; 78% macrófagos ativados; eritrofagocitose; leucofagocitose; debris intracitoplasmáticos nos macrófagos.	-
DCXF bilateral há 2 meses.	Sinais de OA severa com luxação unilateral	6mL	220 células/ μ L: 10% linfócitos reativos; 87% macrófagos ativados; 3% neutrófilos; debris intracitoplasmáticos nos macrófagos.	-

Tabela 3 continuação. Dados coletados referentes à avaliação clínica, radiográfica e análise de líquido sinovial

Afecção articular/ Período de tempo	RX	Volume de líquido sinovial	Contagem celular total e diferencial	Presença de outras afecções articulares
RLCC (MPE) há 2 meses.	Sinais de OA	1mL	680 células/ μ L: 20% linfócitos reativos; 80% macrófagos ativados; debris intracitoplasmáticos nos macrófagos.	-
-	Sem sinais de OA	0,6mL	-	-
-	Sem sinais de OA	0,3mL	-	-
-	Sem sinais de OA	0,5mL	-	-

5.2 Morfologia de ADSC caninas em meios contendo líquido sinovial

Após 24 horas da adição de líquido sinovial aos diferentes meios de cultivo foi observada alteração na morfologia celular de ADSC, com aumento de confluência celular em todos os grupos. Essa mudança foi aparentemente mais evidente nos grupos contendo líquido sinovial proveniente das articulações com OA e permaneceu durante todo o período de incubação das ADSC com líquido sinovial (72 horas) (FIGURA 7).

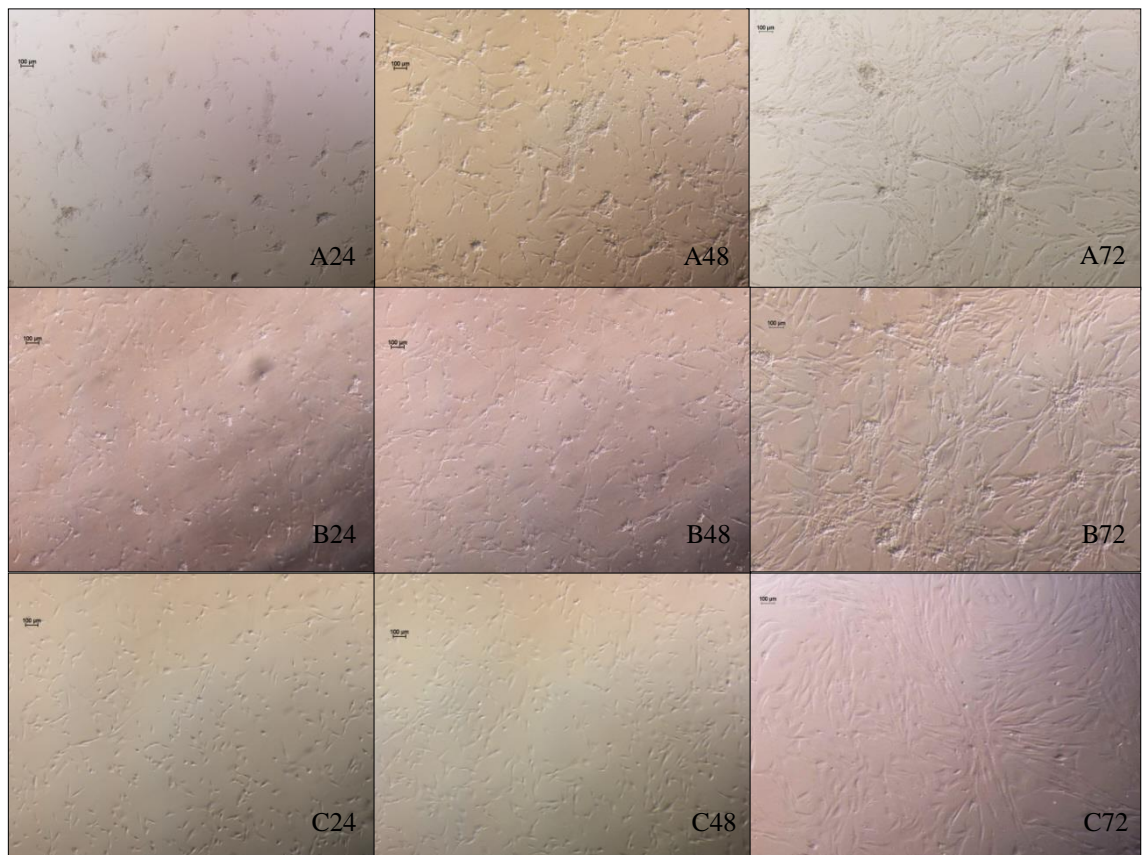


Figura 7. Fotos comparativas de diferentes grupos de cultivo após 24, 48 e 72 horas de incubação: **A)** ADSC em meio contendo líquido sinovial osteoartrítico **B)** ADSC em meio contendo líquido sinovial sem afecção articular; **C)** ADSC em meio 20% SFB, sem adição de líquido sinovial.

5.3 Análise de marcação e indução proliferativa de PBMC caninas com CFSE e ConA

Na análise por citometria de fluxo, foi observado que, cerca de 80% das células [estabelecidas, através de um *gate* na população de interesse (linfócitos)], foram marcadas com CFSE (FIGURA 8). Além disso, na indução proliferativa utilizando-se ConA, houve um aumento de 30% no número de eventos (células) detectados em 5 dias de incubação (FIGURA 9).

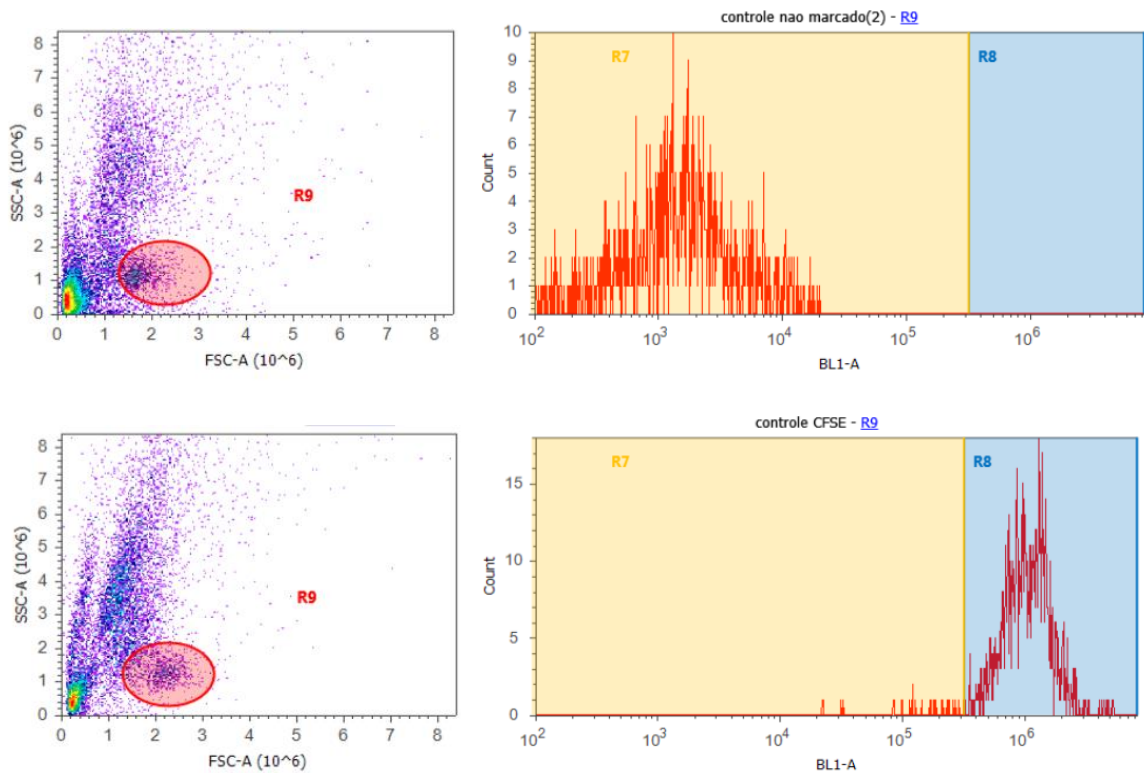


Figura 8. A partir de um *gate* (R9) estabelecido na população de interesse (linfócitos), foi criado um histograma (BL1-A), e fixado o ponto de positividade de uma amostra não marcada (controle não marcado), determinando-se assim, o percentual de 80% de células marcadas com CFSE (controle CFSE).

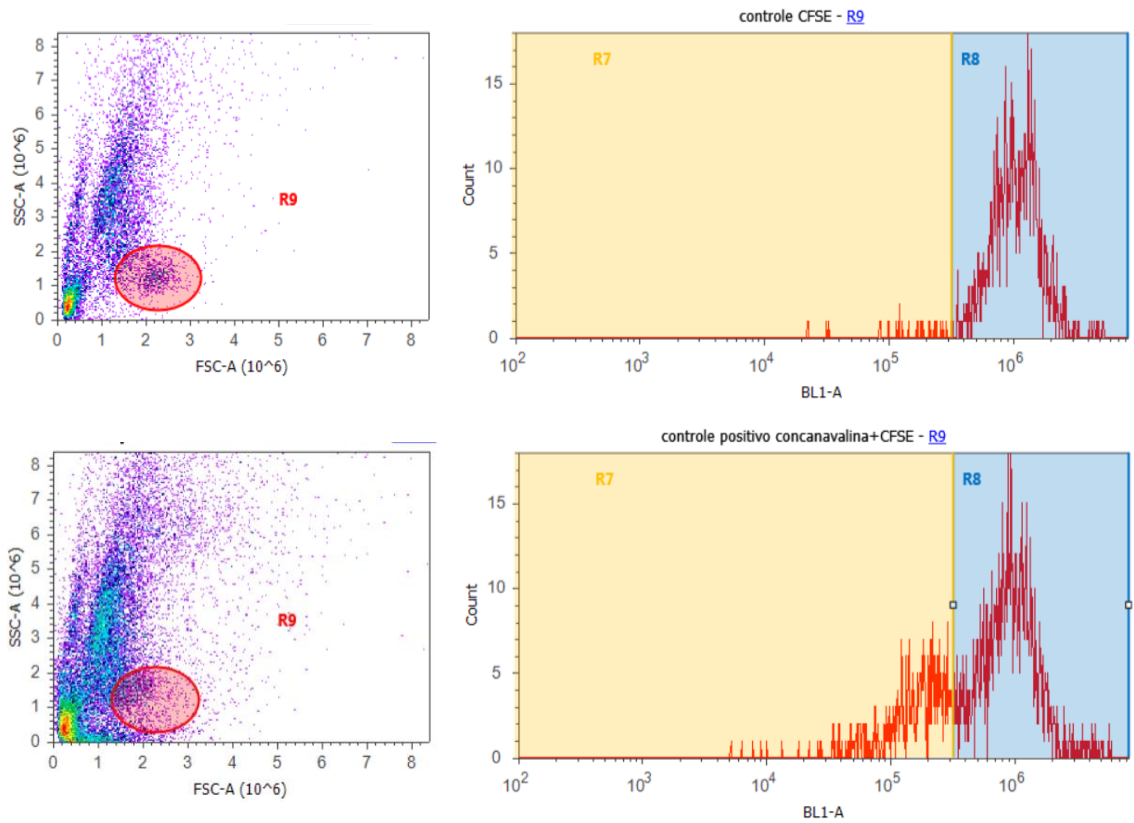


Figura 9. Com a indução proliferativa de PBMC, utilizando ConA, foi observado aumento de 30% no número de eventos (células) detectados (R7), após 5 dias de incubação.

5.4 Análise de inibição proliferativa de PBMC caninas em meios condicionados

Na análise de inibição proliferativa de PBMC caninas submetidas aos meios condicionados provenientes dos cultivos de ADSC com líquido sinovial (osteoartrítico e saudável) e ADSC em 20% de SFB sem líquido sinovial, observou-se ausência de eventos (células) aos cinco dias de cultivo. Além disso, quando submetidas aos meios condicionados dos cultivos de ADSC irradiadas sem líquido sinovial em 20% de SFB, 2% de SFB e sem irradiação em 2% de SFB observou-se inibição proliferativa de PBMC em diferentes percentuais (FIGURA 10). Os valores encontrados estão expressos na tabela 4.

Tabela 4. Inibição proliferativa de PBMC após adição de ConA e diferentes meios condicionados.

Grupo	% de aumento no número de eventos após adição de ConA	% de inibição proliferativa de PBMC com ConA e meios condicionados
ADSC 20% IRRADIADAS	30%	23%
ADSC 2% IRRADIADAS	30%	22%
ADSC 2%	30%	17%

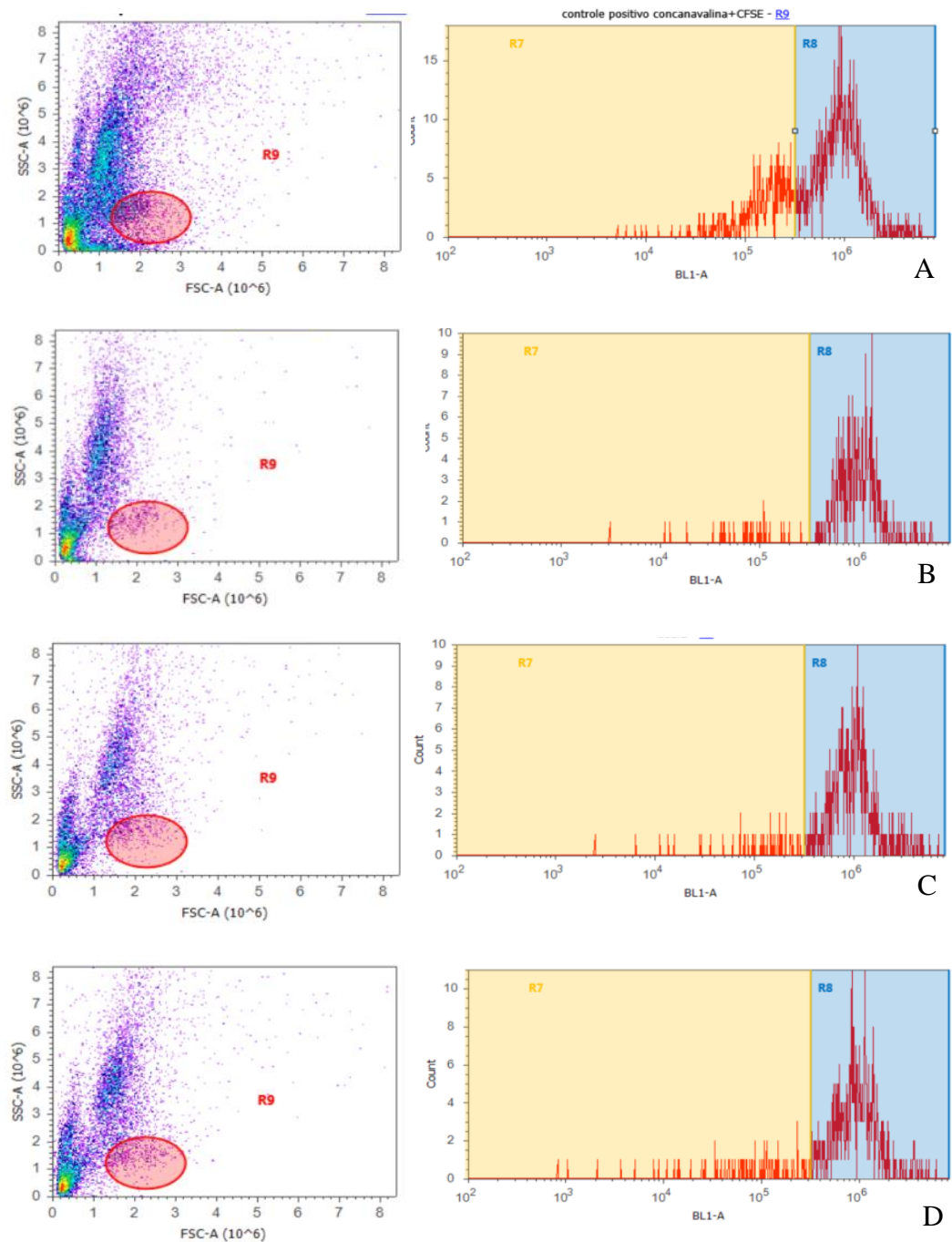


Figura 10. **A)** Aumento de 30% no número de eventos (células) detectados, após 5 dias de incubação, com ConA (R7). **B)** Inibição da proliferação de 23% de PBMC caninas, aos 5 dias de incubação, com ConA e meio condicionado de ADSC irradiadas em 20% de SFB (R7). **C)** Inibição da proliferação de 22% de PBMC caninas, aos 5 dias de incubação, com ConA e meio condicionado de ADSC irradiadas em 2% de SFB (R7) **D)** Inibição da proliferação de 17% de PBMC caninas, aos 5 dias de incubação, com ConA e meio condicionado de ADSC sem irradiação em 2% de SFB (R7).

6 DISCUSSÃO

A amostragem desse estudo foi realizada aleatoriamente e estimada baseando-se em um trabalho realizado com humanos na Holanda. Nessa pesquisa, os autores avaliaram os efeitos do líquido sinovial de articulações com OA e artrite reumatóide na expressão dos efeitos imunomodulatórios de células-tronco mesenquimais, utilizando 6 pacientes com osteoartrite, 6 pacientes com artrite reumatóide e 3 pacientes sem alterações articulares (LEIJS et al., 2012).

Quanto à predisposição para osteoartrite, Fossum (2008) relata que cães de ambos os sexos, qualquer idade ou raça podem ser acometidos, sendo que a maioria dos cães apresentados para o tratamento de lesão em ligamento cruzado cranial são jovens, ativos e de raças grandes, assim como também é maior a incidência de DCXF em cães de grande porte, fatos que concordam com as características dos animais aqui participantes.

Todos os sinais clínicos observados nos pacientes em questão estão em concordância com a ampla literatura descrita, que relata que o sinal clínico mais comum da OA é a claudicação (BOJRAB, 2005; FOSSUM, 2008; PERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009), que pode ser aguda ou crônica, persistente ou intermitente. Além disso, a palpação da articulação pode desencadear dor e a maioria dos animais possui intolerância a exercícios, podendo haver histórico prévio de afecção articular como DCXF e ruptura do ligamento cruzado (FOSSUM, 2008).

Um dos animais com RLCC em membro pélvico direito apresentava DCXF moderada em membro pélvico esquerdo e um dos cães com DCXF bilateral manifestava ainda osteoartrose femorotibiopatelar bilateral. Segundo Piermattei (2009), o uso anormal dos membros, decorrentes de mal-alinhamento, defeitos de conformação ou condições congênitas, leva à osteoartrite secundária. Outro autor complementa que a DAD é o resultado de forças anormais atuando sobre uma articulação normal, ou de forças normais atuando sobre articulação anormal (BOJRAB, 2005). Portanto é possível que, nesses pacientes, a mobilidade articular anormal, em decorrência da DCXF, tenha resultado em aumento das cargas fisiológicas exercidas sobre as articulações fêmoro-tíbio-patelares. Segundo Denny e Butterworth (2006), uma das causas de degeneração precoce do ligamento cruzado em cães jovens de raças grandes, pode estar relacionada com a conformação do membro traseiro. Esses mesmos autores relatam ainda que, defeitos genéticos podem aparecer na constituição do líquido sinovial, diminuindo a

concentração do ácido hialurônico e conseqüentemente a viscosidade do fluido, gerando menor coesão entre as superfícies articulares e resultando em uma articulação frouxa.

Ainda que nem sempre os sinais clínicos apresentados correspondam aos achados radiográficos na osteoartrite (DENNY; BUTTERWORTH, 2006; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009), nos pacientes em questão, todos que manifestavam sinais crônicos da afecção, apresentavam também imagens radiográficas compatíveis com degeneração articular e análise de líquido sinovial correspondente. Em concordância com Bojrab (2005) e Fossum (2008), que relatam que as alterações radiográficas, em sua maioria, estão associadas à cronicidade da afecção, um dos pacientes apresentava sinais recentes de claudicação e RLCC, sem indícios de degeneração articular nas radiografias, porém com análise de líquido sinovial compatível à enfermidade. Um desses autores complementa ainda, que pode haver osteoartrite e lesão significativa da cartilagem muito antes de alterações serem evidenciadas em radiografias (FOSSUM, 2008).

O número total de células nucleadas em líquido sinovial normal pode variar de 300 a 3000 células/ μ L, geralmente não excedendo 2000 células/ μ L (BOJRAB, 2005; FOSSUM, 2008). Na DAD a contagem total de células nucleadas geralmente está normal ou discretamente aumentada, com predomínio de células mononucleares (linfócitos e macrófagos) (COWELL, 2009), das quais mais de 10% estão moderada a intensamente vacuolizadas ou com atividade fagocítica (COWELL, 2009), conforme visto nas presentes análises. A fagocitose serve como indicativo de necrose celular e morte tecidual, já a população de polimorfonucleares (neutrófilos) geralmente e conforme, visto aqui, constitui menos de 5% nessa afecção, porém em outras moléstias articulares, esse número aumenta drasticamente (BOJRAB, 2005).

Em estudo realizado por Borges et al (1999), conclui-se que a composição celular total e diferencial do líquido sinovial, da articulação afetada por ruptura de ligamento cruzado de cães, apresenta contagem superior e diferente a da articulação normal, embora dentro dos padrões fisiológicos citados na literatura. De acordo com os resultados aqui expostos, observa-se que, comparando lesões recentes com lesões crônicas, esse discreto aumento na contagem celular, também pode ocorrer. Fato que pode ser explicado conseqüentemente à presença de um processo inflamatório recente, como a ruptura do ligamento cruzado (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

A disposição celular em fileiras (“windrowing”) observadas nas análises de líquido sinovial, é normalmente vista nas amostras desse material e está relacionada

com a viscosidade do líquido sinovial. São exceções as situações em que há baixa contagem celular, pois nesses casos o enfileiramento pode não ser evidente, mesmo com a viscosidade normal (BIOQUÍMICA). Segundo o mesmo autor, o fundo proteináceo granular róseo é comumente observado em esfregaços de líquido sinovial normal, e às vezes alterado. Bojrab (2005) relata que o grau de basofilia reflete aumento na atividade proliferativa das células, denotando hiperplasia do revestimento da membrana sinovial. Já Tatarunas e colaboradores (2004) relatam que essa coloração está relacionada com o teor de ácido hialurônico presente no líquido sinovial.

A ausência de crescimento bacteriano, observada após cultivo das amostras de líquido sinovial, é relatada por diversos autores como fator importante no diagnóstico diferencial de artropatias sépticas (BOJRAB, 2005; DENNY; BUTTERWORTH, 2006; TODHUNTER; JOHNSTON, 2007; FOSSUM, 2008; PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2009).

Os dados obtidos no presente estudo, referentes aos volumes de líquido sinovial coletados, condizem com a literatura relatada. Segundo esses autores, o volume de líquido sinovial obtido em articulações normais de cães oscila entre 0,05 e 0,5mL e afecções traumáticas, degenerativas e inflamatórias podem promover o seu aumento (TATARUNAS; MATERA; FRANCHINI, 2004; BOJRAB, 2005), devido a sinovite decorrente da afecção (FOSSUM, 2008). Piermattei (2009) associa o derrame sinovial à queda no estado polimerizado do ácido hialurônico (principal glicosaminoglicano do líquido sinovial, altamente polimerizado e que previne a entrada de proteínas séricas de alto peso molecular no líquido), e ao aumento na permeabilidade capilar da subsinóvia decorrente da sinovite.

A coloração do líquido sinovial, nas amostras coletadas, variou de incolor (em articulações saudáveis) a amarelo-palha (em afecções articulares), conforme relatado por Tatarunas e colaboradores (2004), que dizem que o líquido sinovial normal é transparente, claro, altamente viscoso e livre de material floculento, enquanto que a alteração na sua coloração sinaliza contaminação sanguínea ou afecção articular. Segundo Pedersen (1978) e Perman (1980), a coloração amarela é decorrente de pigmentos de hemoglobina devido à hemorragia prévia, e tal fenômeno é chamado xantocromia. A hemorragia crônica e conseqüente quebra de eritrócitos leva à formação de compostos de bilirrubina e uma coloração amarela escura ou âmbar claro (TATARUNAS; MATERA; FRANCHINI, 2004). Outros autores associam a coloração

amarelo-palha também à articulações saudáveis (BOJRAB, 2005; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Até o presente momento, dois trabalhos foram publicados no intuito de se avaliar os resultados da interação entre o líquido sinovial osteoartrítico e células-tronco *in vitro* (LEIJS et al., 2012; KIEFER et al., 2015). Um dos estudos avalia os efeitos do líquido sinovial na expressão de fatores imunomodulatórios por MSC humanas (LEIJS et al., 2012) e o outro a viabilidade de ADSC após exposição a líquido sinovial osteoartrítico canino (KIEFER et al., 2015). Nenhum dos trabalhos existentes avalia essa relação com ADSC irradiadas com *laser* de baixa potência.

Segundo resultados de Kiefer e colaboradores (2015), após 2 horas em cultivo com *pool* de líquido sinovial osteoartrítico canino, ADSC perderam a aderência ao plástico, sendo a avaliação realizada por um período de até 12 horas de observação. Além disso, os autores relatam menor viabilidade de ADSC, quando expostas a líquido sinovial osteoartrítico por 12 horas, não sendo observadas diferenças entre a viabilidade de células expostas ao meio de cultivo quando comparadas a líquido sinovial de articulações saudáveis (controle). É sugerido que um período maior de exposição possa resultar em menor viabilidade celular nesse ambiente *in vitro*, devido à ausência de nutrientes fornecidos pelos sinoviócitos e metabólitos existentes na fisiologia normal da articulação.

No estudo em questão, os períodos de avaliação foram 24, 48 e 72 horas; ocasiões nas quais, também foi observada alteração morfológica celular, porém em todos os grupos contendo líquido sinovial e aparentemente mais acentuada em líquido sinovial osteoartrítico. No decorrer das horas, aderência e aumento de confluência nas culturas pôde ser observado, indicando assim, não só a possibilidade de readaptação dessas células ao microambiente oferecido, como ainda a manutenção da capacidade proliferativa.

Segundo Vieira et al., 2010 a perda de adesão celular à placa de cultivo não é uma medida válida para avaliar viabilidade celular, porém pode levantar questionamentos sobre alterações na homeostase existente na cultura. Estudos demonstram os efeitos imunomodulatórios de ADSC e a importância que o microambiente em que se encontram, tem papel fundamental em seu desempenho (CROP et al., 2010; MELIEF et al., 2013). Sabe-se que uma articulação com osteoartrite tende a ser um microambiente desfavorável para a saúde e viabilidade celular local, pois o líquido sinovial contém mediadores que promovem a inflamação,

causando a destruição da cartilagem e ou induzindo apoptose (FERNANDES et al., 1999; BRUIN et al., 2007) de sinoviócitos e condrócitos (VOS et al., 2000). Nesse contexto, a interação de ADSC com as células presentes nas articulações não é bem caracterizada *in vitro* (KIEFER et al., 2015). No entanto existem evidências do potencial imunomodulatório de ADSC injetadas intra-articular, de modo que as células presentes no líquido sinovial não ameacem sua viabilidade (MELIEF et al., 2013). Além disso, o período de tempo que ADSC precisam estar presentes e viáveis no local da lesão não foi estabelecido, mas é provável que seja variável e dependente do estado da doença, da resposta individual do paciente e do efeito terapêutico desejado (KIEFER et al., 2015).

No presente estudo, o fato de ter-se utilizado uma substância heterogênea; proveniente da mistura de líquidos sinoviais, contendo células de diferentes pacientes, pode ter colaborado na alteração morfológica observada em ADSC. Entretanto para minimizar esse problema, antes da homogeneização dos líquidos sinoviais, foi realizada centrifugação de cada amostra, descartando-se dessa maneira, a maior quantidade de células presentes no líquido. Além disso, antes de ser adicionado ao cultivo de ADSC, o *pool* de líquidos sinoviais foi filtrado. Ainda assim, para se desconsiderar completamente esse viés, indica-se a filtração dos líquidos sinoviais antes de se promover a mistura, ou até mesmo ensaios utilizando amostras individuais ao invés de *pool*. Nesse trabalho isso não foi possível, devido ao grande volume de material necessário para a realização de todos os grupos instituídos. Sob outro aspecto, considera-se interessante o desenvolvimento de estudos investigando os efeitos do co-cultivo de células do líquido sinovial com ADSC. Devido à etapa seguinte a ser realizada no presente estudo; com a avaliação dos efeitos que os fatores liberados pelas ADSC exercem sob a proliferação celular contendo linfócitos; o cultivo concomitante do grupo celular já existente no líquido sinovial coletado, inviabilizaria essa análise. O resultado de inibição de proliferação obtido traria o viés sobre quais fatores seriam responsáveis por essa inibição (se aqueles liberados por ADSC ou pelas células do próprio líquido sinovial coletado).

O aumento da confluência celular, observado no estudo em questão, é indicativo de que, nesses períodos de tempo, as ADSC presentes no ambiente de cultivo, mantêm sua capacidade de proliferação. Considera-se a possibilidade de que a alteração homeostática em presença de líquido sinovial possa resultar em perda de aderência celular e diminuição de viabilidade de ADSC inicialmente (conforme relatado por

Kiefer et al., 2015), seguida de readaptação, diferenciação e proliferação nesse microambiente.

Diversos autores têm demonstrado que, ainda que se desconheça o exato mecanismo de ação, os pacientes têm demonstrado melhora clínica, após aplicação intra-articular dessas células em osteoartrite (VILAR et al., 2013; CUERVO et al., 2014; VILAR et al., 2014). No entanto, se o objetivo de uma aplicação celular for ter células viáveis transplantadas dentro de uma articulação; coloca-las em um ambiente tóxico pode ser contraproducente, minimizar o efeito potencial dessa terapia (Kiefer et al., 2015), ou até mesmo trazer estímulos ainda mais deletérios à articulação já comprometida. Por esse motivo, no intuito de trazer maiores esclarecimentos frente aos resultados obtidos, indica-se a análise da diferenciação das culturas de ADSC em outras linhagens, assim como estudos de viabilidade sob as condições propostas.

A indução da proliferação de PBMC caninas com ConA e marcação CFSE utilizada no estudo em questão baseou-se em dados anteriormente descritos utilizando essa metodologia para avaliação de proliferação dessas células na espécie canina (KIM et al., 2010; KRALOVA; LEVA; TOMAN, 2010; PASSARELLI, 2011; NAFE; DODAM; REINERO, 2014; SOARES, 2014). Existe ampla variedade de estudos com a utilização desse método em outras espécies (MACIEL, 2002; ASQUITH et al., 2006; EVRARD et al., 2010; QUAH; PARISH, 2010; SILVAR. F., 2011; ZANETTE et al., 2015). Entretanto, o que se observa é uma grande distinção de protocolos, dependentes de diversas variáveis experimentais.

A concentração de CFSE necessária para marcação de PBMC é distintamente descrita na literatura, que também relata a segurança desse agente em relação à toxicidade celular, quando utilizado nas recomendações do fabricante (até 10 μ M). No presente estudo, a concentração utilizada (1 μ L/mL; 5mM), baseando-se em estudos anteriores (PASSARELLI, 2011; SOARES, 2014), promoveu a marcação de 80% das células da população de interesse.

Foram encontrados dois trabalhos realizados em caninos, utilizando CFSE e ConA concomitantemente, sendo as concentrações de ConA, distintas para cada trabalho e variando entre 10 e 100 μ g/mL (PASSARELLI, 2011; SOARES, 2014). No presente estudo, foi utilizada a concentração de 5 μ g/mL de ConA, embasando-se em trabalho realizado por Nafe e colaboradores (2014), que descreve essa concentração, como sendo ótima, para indução da proliferação de PBMC caninas, após testar diferentes concentrações desse mitógeno (2,5 a 20 μ g/mL). Esses autores encontram

resultados que variam de 49-70% de proliferação, dependendo da amostra de PBMC individual de cada paciente, para um período de incubação de três dias.

Maciel (2002) relata que a concentração ótima para atividade mitogênica máxima de lectina sobre PBMC é dependente de fatores individuais do doador (tipo celular estudado), da concentração de lectina utilizada e do período de incubação para avaliação. Segundo este trabalho, não é observada indução de proliferação suficiente para avaliação, após 24 horas de incubação. Entretanto a proliferação é induzida nos períodos de 48 e 72 horas de cultivo, não havendo diferenças significativas na proliferação desses dois tempos avaliados.

Além da análise de marcação e indução da proliferação de PBMC, concomitantemente avaliou-se a proliferação de PBMC sob os meios condicionados. Por esse motivo, optou-se por um período de cinco dias de incubação, tendo como base os dados relatados por Leijts et al. (2012). Embora os autores utilizem diferentes indutores para a proliferação, esse é o único relato até o momento que avalia os resultados do cultivo de meios condicionados de células tronco e líquido sinovial sob a proliferação de linfócitos. A concentração de 5µg/mL de ConA, utilizada nesse estudo, foi responsável por 30% de aumento na taxa proliferativa de PBMC em cinco dias de incubação. Considera-se que, outros períodos de tempo, possam ser responsáveis por aumentos nessas taxas de proliferação.

Nos estudos de Leijts et al. (2012), os autores relatam inibição da proliferação celular de PBMC humanas, após cultivos dessas células em meios condicionados de MSC, aos cinco dias de incubação. Eles utilizam uma proporção de 20% de líquido sinovial para 80% de meio de cultivo de MSC, durante um período de 48 horas. Em suas conclusões relatam que aumentos nessa proporção de líquido sinovial, por maiores períodos de incubação, possam simular melhor o ambiente articular *in vivo*. No presente estudo, utilizou-se a proporção de 30% de líquido sinovial para 70% de meio de cultivo de ADSC, durante o período de 72 e 96 horas de incubação, respeitando-se o mesmo período entre plaqueamento e congelamento para os grupos com as mesmas concentrações de SFB. Diferentemente dos resultados observados por esses autores, na etapa de inibição da proliferação de PBMC, embora tenha-se utilizado o mesmo período de incubação, não foram registrados eventos pelo citômetro de fluxo, aos cinco dias de cultivo, em todos os grupos contendo meios condicionados com líquido sinovial (LSOA e LSS) e ADSC 20% SFB. Curiosamente nesses grupos, o período de incubação (sem trocas de meio) foi 72 horas. Enquanto que, nos grupos em que o período de incubação

das ADSC foi 96 horas, os meios condicionados provenientes desses cultivos promoveram inibição da proliferação de PBMC.

O aumento na concentração de líquido sinovial dos cultivos, de 20% (Leijds et al., 2012) para 30% no presente estudo, poderia ser responsável por gerar toxicidade celular em PBMC resultando na ausência dessas células pela leitura do citômetro de fluxo. No entanto, essa possibilidade não é esclarecedora quanto a ausência de PBMC também submetidas aos meios condicionados do cultivo de ADSC 20% SFB sem líquido sinovial.

A utilização de *pool* de alíquotas sinoviais e PBMC de diferentes doadores pode levantar a hipótese de reações celulares entre células alógenas. Entretanto, após serem coletados, os líquidos sinoviais foram centrifugados e antes de sua adição aos cultivos de PBMC, os meios condicionados foram filtrados. Apesar disso, para se descartar completamente essa interferência, a filtração dos líquidos sinoviais pode ser realizada após a coleta ou previamente a homogeneização das alíquotas em *pool*, ou ainda, lançar-se mão de amostras individuais ao invés de *pool*. No presente estudo, isso não foi possível devido ao grande volume de líquido sinovial necessário para as análises realizadas. Ainda assim, salienta-se que essa hipótese não esclarece tampouco, a ausência de PBMC quando em meios condicionados de ADSC 20% SFB sem líquido sinovial.

Com o aumento do período de cultivo das células tronco, de 48 horas (Leijds, 2012) para 72 ou 96 horas, foi observado, aparentemente maior confluência celular nos grupos contendo líquido sinovial e ADSC 20% SFB. Considerando maior proliferação e conseqüentemente consumo nutricional, é possível que menor quantidade de nutrientes estivessem presentes nos meios condicionados desses grupos, aos quais as PBMC foram submetidas. Dessa forma, a ausência de PBMC nesses grupos, seria justificada pelo déficit nutricional dos meios. Contudo, para descartar esse viés, foram realizados grupos controles para os cultivos de PBMC e realizadas leituras em citometria de fluxo nos dias 0 e 5.

Não descarta-se porém que, devido à suposta saturação nutricional dos meios e confluência presente, sem espaços para proliferação, tanto nos grupos contendo líquido sinovial, quanto no grupo ADSC 20% SFB sem líquido sinovial, essas células tenham liberado maior quantidade de citocinas, quiçá deletérias, como conseqüência à condição do microambiente. O efeito dessas citocinas nos meios condicionados desses grupos pode ter atuado sobre PBMC, promovendo a ausência dessas células na leitura por

citometria de fluxo, ao quinto dia de incubação. Para a confirmação dessa hipótese, considera-se esclarecedora a mensuração das citocinas imunomodulatórias, expressas por ADSC sob essas condições. Além disso, protocolos com a redução do tempo de incubação das culturas de ADSC, além de enriquecimento do meio e redução do período de incubação de PBMC devem ser reconsiderados.

Até o presente momento não existem publicações relatando os efeitos dos meios condicionados de ADSC irradiadas sob a inibição proliferativa de PBMC caninas e por esse motivo, a discussão nesse aspecto se torna limitada.

Os dados observados entre os grupos restantes revelam maior inibição da proliferação de PBMC em grupos contendo meios condicionados de ADSC cultivadas em 20% SFB e previamente irradiadas (23% de inibição); seguidos de grupos de ADSC em 2% SFB irradiadas (22% de inibição) e ADSC 2% SFB sem irradiação (17% de inibição). Através desses resultados, sugere-se que, a menor quantidade de PBMC nos grupos irradiados, seja resultante do estímulo originado pela fototerapia, e conseqüentemente, pelos fatores imunomodulatórios secretados pelas ADSC, após as irradiações.

Estudos prévios tem reportado resultados expressivos da fototerapia com laser *in vitro*, para o aumento da proliferação celular, aumento da atividade mitocondrial e conseqüentemente aumento da produção de ATP, síntese de RNA e DNA das células irradiadas (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; GARCEZ; RIBEIRO; NUNEZ, 2012). Além disso, a irradiação com fototerapia de baixa potência em resposta aos efeitos celulares que promovem, anteriormente descritos, é responsável por secretar um amplo painel de fatores de crescimento, citocinas e interleucinas, exercendo assim atividade imunomoduladora (PEPLOW et al., 2011), potencializando os efeitos das células-tronco irradiadas (ALGHAMDI; KUMAR; MOUSSA, 2012; GIANNELLI et al, 2013; PEPLOW et al., 2011). No entanto, grande parte dos estudos até então realizados, avaliam os efeitos da fototerapia *in vitro*, sob a proliferação de células-tronco mesenquimais. Não havendo portanto, dados comparativos para a menor quantidade de PBMC dos meios condicionados do cultivo de ADSC irradiadas.

Sendo assim, para confirmação dessas hipóteses sugere-se a realização de ensaios avaliando a proliferação de ADSC, assim como a análise dos fatores imunomodulatórios secretados por essas células, quando submetidas aos diferentes microambientes, e ainda a utilização de maior enriquecimento de meio para PBMC.

Devido aos semelhantes resultados obtidos entre os grupos de ADSC irradiadas, nos ensaios de proliferação de PBMC, sugere-se que ambas as terapias sejam eficazes no intuito de promover maior atividade imunomodulatória. Contudo o grupo de ADSC 20% SFB, previamente irradiadas requer um dia a menos de cultivo, quando comparado ao grupo ADSC em concentração de 2% SFB e irradiação.

7 CONCLUSÕES

Com os dados obtidos no presente estudo é possível sugerir que, ADSC submetidas a microambientes contendo líquido sinovial (osteoartrítico e saudável) ou 20% de soro fetal bovino, se proliferam de forma mais acentuada do que quando comparadas às outras condições experimentais. Além disso, sugere-se que estímulos oriundos da FTBP sob ADSC, sejam eficazes no intuito de promover maior atividade imunomodulatória, como pode ser detectado através da menor quantidade de PBMC nos grupos irradiados, quando comparados ao grupo 2% sem irradiação. No entanto, devido ao pequeno número amostral e ao grande conjunto de variáveis presentes nesse estudo, indica-se novos trabalhos de avaliação proliferativa de ADSC sob essas condições, assim como a mensuração dos fatores imunomodulatórios secretados por essas células, quando submetidas aos diferentes microambientes, lançando-se mão de maior enriquecimento de meio para PBMC e reduções dos períodos de incubação.

Através da avaliação dos dados referentes às informações clínicas, radiográficas e análises de líquido sinovial, considera-se que processos agudos e crônicos de afecção articular podem apresentar diferentes contagens celulares, assim como coloração e volume de líquido sinovial podem ser indicativos de enfermidade. Salienta-se a importância da análise desse material em todos os pacientes submetidos a cirurgias, no intuito de gerar maior quantidade de dados comparativos entre os tipos e contagens celulares presentes nas diversas afecções diagnosticadas.

Quanto ao cultivo de ADSC em meio contendo líquido sinovial conclui-se que, quando expostas a meios contendo líquido sinovial osteoartrítico, as ADSC caninas modificam sua morfologia, de forma aparentemente mais acentuada do que quando submetidas a meios com líquido sinovial saudável. Além disso, a mudança nesse microambiente não implica em diminuição de confluência celular, indicando proliferação gradativa de ADSC durante um período de 72 horas de avaliação. Considera-se relevante a realização de novos estudos com análise detalhada do tipo de diferenciação observada nas culturas de ADSC, além da viabilidade celular sob essas condições.

Em relação à marcação e indução da proliferação de PBMC caninas com ConA e marcação CFSE, conclui-se que, as concentrações utilizadas mostraram-se adequadas para os propósitos experimentais. Sugere-se testar novas concentrações de ConA

associadas à marcação CFSE, em outros períodos de tempo, no intuito de se avaliar a taxa ótima de proliferação de PBMC caninas com a referida lectina.

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.

ASQUITH, B., et al. Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyl fluorescein acetate succinimidyl Ester (CFSE). **Proceedings of the Royal Society**. v. 273, p. 1165-1171, 2006.

BAGLIONI, S., et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. **The FASEB Journal**. v. 23, p. 3494-3505, 2009.

BASSO, F. G., et al. In vitro Wound Healing Improvement by Low-Level Laser Therapy Application in Cultured Gingival Fibroblasts. **International Journal of Dentistry**. p. 1-6, 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.

BOJRAB, M.J. **Técnicas Atuais em Cirurgia de Pequenos Animais**.3ª Ed., São Paulo: Roca, 2005.

BORGES, A. P. et. al. Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, 1999.

BRAUN, H. J.; GOLD, G. E. Diagnosis of Osteoarthritis: Imaging. **Bone**. v.51, n.2, p. 1-27, 2012.

BRUIN, T., et al. Cytokine mRNA expression in synovial fluido f affected and contralateral stifle joints and the left shoulder joint in dogs with unilateral disease of the stifle joint. **American Journal of Veterinary Research**. v. 68, n. 9, p. 953-961, 2007.

BUDONI, M., et al. The Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stromal Cells on B Lymphocytes Is Mediated by Membrane Vesicles. **Cell Transplantation**. v. 22, p. 369-379, 2013.

CALDAS, I. S., **Impacto do tratamento com Benznidazol na evolução da doença de Chagas experimental – análise imunopatológica e funcional**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Ouro Preto – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Ouro Preto, 2011.

CAMPAGNARO, B. P., **Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão 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.

CONVISSAR, R.A. **Princípios e Práticas do Laser na Odontologia**. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier, 2011.

COWELL, R. L., et al. Análise de Líquido Sinovial. In: **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3ª Edição, Editora MedVet, São Paulo, 2009.

CRESTANI, M.V.; TELÖKEN, M.A.; GUSMÃO, P. D. F. Impacto femoroacetabular: uma das condições precursoras da osteoartrose do quadril. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v.41, n.8, p.285-293, 2006.

CROP, M. J. et. al. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 162, p. 474-486, 2010.

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.

DENNY, H. R.; BUTTERWORTH, S. J. **Cirurgia ortopédica em cães e gatos**. 4ª Ed. São Paulo: Roca, 2006.

DIAS, I. F. L., et al. Efeitos da luz em sistemas biológicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v. 30, n. 1, p. 33-40, 2009.

EDUARDO, F. P., et al. Stem Cell Proliferation Under Low Intensity Laser Irradiation: A Preliminary Study. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 40, p. 433-438, 2008.

EGLOFF, C.; HÜGLE, T.; VALDERRABANO, V. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. **Swiss Medical Weekly**. v.142, p.1-14, 2012.

EVRARD, B. et al. CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: Use for quality control. **Transfusion and Apheresis Science**. v. 42, p. 11-19, 2010.

FERNANDES, J., et al. In Vivo Transfer of Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene in Osteoarthritic Rabbit Knee Joints. **American Journal of Pathology**. v. 154, n. 4, p. 1159-1169, 1999.

FILHO, G. M. P., **Avaliação da proliferação de linfócitos T CD8⁺ por células dendríticas desafiadas com pró-oxidantes**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do São Paulo – Instituto Butantan. São Paulo, 2010.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

GANGJI, V.; MAERTELAER, V. D.; HAUZEUR, J. P. Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. **Bone**. p. 1-4, 2011.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; NÚÑEZ, S. C. **Laser de baixa potência – princípios básicos e aplicações clínicas na odontologia**. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier. 2012.

GIANNELLI, M., et al. Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diodo laser: effects and mechanisms of action. **Journal of Cellular Physiology**. v. 228, n.1, p. 172-181, 2013.

HARVEY, A. K.; ILRUBEY, P. S.; CHANDRASEKHAR, S. Transforming growth factor-beta inhibition of interleukin-1 activity involves regulation of interleukin-1 receptors on chondrocytes. *Experimental Cell Research*, v. 195, p. 376-385, 1991.

HELMARK, I. C., et al. Exercise increases interleukin-10 levels both intraarticular and peri-synovially in patients with knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. **Arthritis Research & Therapy**. v. 12, p. 1-11, 2010.

IMAMURA, M., et al. Serum Levels Proinflammatory Cytokines in Painful Knee Osteoarthritis and Sensitization. **International Journal of Inflammation**., p. 1-8, 2015.

IMANISHI, Y., et al. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.44, p. 662–671, 2008.

JIANG, Y., et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, 2002.

JONES, B.; MCTAGGART, S. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: From culture to clinic. **Experimental Hematology**, v. 36, p.733–741, 2008.

JOUGLIN, M., et al. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. **Veterinary Research**, v.31, n. 5, p. 507-515, 2000.

JUNG, D. I., et al. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 285, p. 67-77, 2009.

KAMM, J. L.; NIXON, A. J.; WITTE, T. H. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthritic equine carpi. **Equine Veterinary Journal**, v.42, n.8, p. 693-699, 2010.

KARU TI. Primary and secondary mechanisms of action of monochromatic visible and near infrared radiation on cells. In: **The Science of Low-power Laser Therapy**. Gordon and Breach Science, Amsterdam, 1998.

KEALY, J. K.; MCALLISTER, H. Articulações. In: **Radiologia e Ultra-Sonografia do Cão e do Gato**. 3ª Ed. São Paulo: Manole, 2012, p. 259-297.

KIEFER, K. M., et. al. Canine adipose-derived stromal cell viability following exposure to synovial fluid from osteoarthritic joints. **Veterinary Record Open**, v. 2, p. 1-7, 2015.

KIM, H. S., et. al. Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 40, p. 265-270, 2010.

KRALOVA, S.; LEVA, L.; TOMAN, M. Changes in lymphocyte function and subsets in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 74, p. 124-129, 2010.

KRAMPERA, M., et. al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3722-3729, 2003.

LE BLANC, K., et. al., HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **ExpHematol**, v. 31, p. 890-896, 2003.

LEIJS, 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.

LI, W. T.; LEU, Y. C.; LUNG, J. L.; Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Photomedicineand Laser Surgery**, v.28, n.1, 2012.

LINS, R. D. A. U., et. al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n. 6, p. 849-855, 2010.

LOESER, R. F., et. al. Osteoarthritis: A Disease of the Joint as na Organ. **Arthritis Rheumatology**, v. 64, n. 6, p. 1697-1707, 2013.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**. v. 243, p. 147 – 154. 2000.

MACIEL, E. V. M., **Determinação do efeito mitogênico das lectinas de Cratylia mollis sobre linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas. Recife, 2002.

MALDONADO, M., NAM, J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis. **Biomed Research International**. p. 10, 2013.

MALEK, S., et. al. Effect of analgesic therapy on clinical outcome measures in a randomized controlled trial using client-owned dogs with hip osteoarthritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, p. 17, 2012.

MARTINELLO, T., et. al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p.18-24, 2010.

MCCOLE, D. F. et al. Concanavalin A-stimulated proliferation of T cell subset-depleted lymphocyte populations isolated from Fasciolahepática-infected cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, n. 66, p. 289-300, 1998.

MELIEF, S. M.; ZWAGINGA, J. J.; FIBBE, W. E.; ROELOFS, H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. **Stem Cells Translational Medicine**. v. 2, p. 455-463, 2013.

MILLIS, D. L.; MARTINEZ, S. A. Enxertos ósseos. In: SLATTER D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 2007, 3ª Ed, v.2, p. 1875-1890

MOKARIZADEH, A.; et. al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. **Immunology Letters**, v. 147, p. 47-54, 2012.

MORAES, A. P. L., **Resposta ao uso intra-articular do plasma rico em plaquetas em equinos hípidos: aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2013.

NAFE, L. A.; DODAM, J. R.; REINERO, C. R. In-vitro immunosuppression of canine T-lymphocyte-specific proliferation with dexamethasone, cyclosporine, and the active metabolites of azathioprine and leflunomide in a flow-cytometric assay. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, p. 168-175, 2014.

NAM, J. et. al. Sequential Alterations in Catabolic and Anabolic Gene Expression Parallel Pathological Changes during Progression of Monoiodoacetate-Induced Arthritis. **PLOS one**, v. 6, p. 19, 2011.

NEUPANE, M. et. al. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue engineering Part A**, v. 14, p. 1007-1015, 2008.

NIEMEYER, P. et. al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. **Biomaterials**, v. 31, p. 3572-3579, 2010.

OLDERSHAW, R.; Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future. **International Journal Experimental Pathology**, v. 93, p. 389–400, 2012.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annu Ver Biomed Eng*. v. 12, p. 87-117, 2013.

PASSARELLI, D., **Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente a membranas eritrocitárias autólogas de cães recentemente**

imunizados. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade São Paulo - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2011.

PEDERSEN, N. C. Synovial fluid collection and analysis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 8, p. 495-499, 1978.

PEPLOW, P. V. et. al. Laser photobiomodulation of gene expression and release of growth factors and cytokines from cells in culture: a review of human and animals studies. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 29, n.5, p.285-304, 2011.

PEPTAN, I. A.; HONG, L.; MAO, J. J. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. **PlastReconstrSurg**, v. 117, n.5, p. 1462-70, 2006.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L.; DECAMP, C. L. Artrologia. In: **Ortopedia e tratamento de fraturas de pequenos animais**. 4ª Ed. São Paulo: Manole, 2009, p. 161-186.

PIGNONE, V. N., **Efeitos da fototerapia com laser de baixa potência em células-tronco mesenquimais de polpa dentária de rato Wistar**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Medicina Veterinária. Porto Alegre, 2015.

QUAH, B. J. C., PARISH, C. R. The use of CarboxyfluoresceinDiacetateSuccinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. **Journal of Visualized Experiments**. v. 44, p. 4, 2010.

RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering Part B-Reviews**, v. 15, p. 113–125, 2009.

RATAJCZAK, J. et. al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. v. 20, p. 847-856, 2006.

RHODES, J.M.; MILTON, J. D. Lectin methods and protocols. 1ª Ed. New Jersey, 1998.

RICHARDSON, L. E. et. al. Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 409-416, 2007.

RILEY, R. S., et. al. Principles an Applications of Flow Cytometry. **VCU Health Systems**, p.15, 2005.

ROSIS, R. G.; MASSABKI, P. S.; KAIRALLA, M. Osteoartrite: avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência. **Rev. Bras. Clín. Med.** v. 8, n. 2, p. 101-108, 2010.

SACHETTI, A. et. al. Perfil epidemiológico de idosos com osteoartrose. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. v. 9, n. 3, p. 212-215, 2010.

SILVA, C. L. Estudos Moleculares de Células Tronco Mesenquimais Cultivadas In Vitro. Tese (Doutorado em Oncologia), Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 2009.

SILVA, R. F., **Análise de parâmetros apoptóticos em linfócitos humanos e seu potencial para estimar a radiosensibilidade individual.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Tecnologia e Geociências. Pernambuco, 2011.

SINGH, J. A., Stem cells and other innovative intra-articular therapies for osteoarthritis: What does the future hold? **BMC Medicine**, v. 10, p. 44, 2012.

SOARES, R. D. O. A., **Ensaio clínico vacinal de Fase I e II para avaliação comparativa da toxicidade, imunogenicidade e potência das vacinas Leishmune, Leish-Tec, KMP-11 e LBSap contra leishmaniose visceral canina.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Ouro Preto – Laboratório de Imunopatologia. Ouro Preto, 2014.

STREM, B. M. et. Al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med**, v. 54, p. 132-141, 2005.

SUTTON, S. et. al. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v.179, p.10-24, 2009.

TAKEMITSU H et al. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.

TATARUNAS, A. C.; MATERA, J. M.; FRANCHINI, M. L. Análise de líquido sinovial em cães: revisão de literatura. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**. v. 7, n.1, p. 7-14, 2004.

TODHUNTER, R. J.; JOHNSTON, S. A. Osteoartrite. In: SLATTER D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 2007, 3ª Ed, v.2, p. 2208-2240

TOMIYOSHI, M. Y. et al. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer Cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 558-567, 2009.

VAN DER KRAAN, P. M., Osteoarthritis year 2012 in review: biology. **Osteoarthritis and Cartilage**. v. 20, p. 1447–1450, 2012.

VIEIRA, N. M. et al. Isolation, Characterization, and Differentiations Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. **Cell Transplantation**. v. 19, p. 279-289, 2010.

VILAR, J. M.; BATISTA, M.; MORALES, M.; SANTANA, A.; CUERVO, B.; RUBIO, M.; CUGAT, R.; SOPENA, J.; CARRILLO, J. M. Assessment of the effect of intraarticular injection os autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinde force platform analysis. **BMC Veterinary Research**. v. 4, n. 10, 2014.

VILAR, J. M.; MORALES, M.; SANTANA, A.; SPINELLA, G.; RUBIO, M.; CUERVO, B.; CUGAT, R.; CARRILLO, J. M. Controlled, blinded force platform analysis of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells associated to PRGF-Endoret in osteoarthritic dogs. **BMC Veterinary Research**. v. 9, p. 131, 2013.

VIOLINI, S. et al. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC Cell Biology**, v. 10, p. 29-33, 2009.

VOS, C. M. P. et al., Cytotoxicity by Matrix Metalloprotease-1 in Organotypic Spinal Cord and Dissociated Neuronal Cultures. **Experimental Neurology**. v. 163, p. 324-330, 2000.

YANESELLI, K. Caracterización de las células madre mesenquimales caninas derivadas de tejido adiposo (CMM-TA) extraídas de dos sitios anatómicos diferentes. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Universidad de la República – Facultad de Veterinaria, Uruguay, 2015.

YANESELLI, K. et al. Allogeneic stem cell transplantation for bone regeneration of a nonunion defect in a canine. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v. 4, p. 39–44, 2013.

ZANETTE, D. L. et al. Simvastatin Modulates Mesenchymal Stromal Cell Proliferation and Gene Expression. **PLOS one**. 2015.

ZIPORI, D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. **Stem Cells Concise Review**. v. 23, p. 719-726, 2005.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 211-228, 2001.

ANEXO 1**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE LÍQUIDO SINOVIAL DE
ARTICULAÇÃO COM OSTEOARTROSE**

Eu, _____,
tutor (a) do paciente _____, da espécie
_____, raça _____, do sexo
_____, pelagem _____ autorizo a realização
da coleta de líquido sinovial, do paciente acima caracterizado, para a realização de
projeto de pesquisa.

A punção de líquido sinovial, proveniente da articulação com osteoartrite, será
realizada durante o procedimento cirúrgico, sob anestesia geral inalatória, não
acarretando quaisquer riscos adicionais ao paciente.

Autorizo a realização da coleta de líquido sinovial a ser realizada pela Médica
Veterinária Karina Magano Guimarães, CRMV-RS 11985.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2015.

Assinatura do tutor (a):

Assinatura do Médico Veterinário:

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE LÍQUIDO SINOVIAL DE
ARTICULAÇÃO SAUDÁVEL**

Eu, _____,
tutor (a) do paciente _____, da espécie
_____, raça _____, do sexo
_____, pelagem _____ autorizo a realização
do procedimento de coleta de líquido sinovial, do paciente acima caracterizado, para a
realização de projeto de pesquisa.

A punção de líquido sinovial, proveniente da articulação saudável, será realizada durante o procedimento cirúrgico de ovariectomia eletiva ou orquiectomia eletiva, sob anestesia geral inalatória, não acarretando quaisquer riscos adicionais ao paciente.

Autorizo a realização da coleta de líquido sinovial a ser realizada pela Médica Veterinária Karina Magano Guimarães, CRMV-RS 11985.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2015.

Assinatura do tutor (a):

Assinatura do Médico Veterinário:

ANEXO 2



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

Projeto: 150239

Data da Versão do Projeto: 01/07/2015

Pesquisadores:

ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA
KARINA MAGANO GUIMARÃES
LAURA SILVEIRA AYRIES
GERMÃO FILIPE GRINGS
NICOLE ANDRÉA CORSELLINI HENCKES
HELCUISE RICHARDT MEDEIROS
CALVIN BRAGA GNOATTO
EMERSON ANTONIO CONTEBINI
KAMILA PAZZA

Título: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSITO (ADSCs), IRRADIADAS COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA, EM LÍQUIDO SINOVIAL PROVENIENTE DE OSTEOARTRITE: MODELO CANINO

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.


Blol. Michael Everton Andrade
Coordenador CEUA/HCPA

Porto Alegre, 15 de julho de 2015.