



APLICAÇÃO DA ENGENHARIA DE TECIDOS NO REPARO DE CARTILAGEM ARTICULAR EM CÃES

Gabriela Cabanas Tobin¹
Maria Inês Witz²
Karine Gehlen Baja³
Maiele Dornelles Silveira⁴
Nance Beyer Nardi⁵

Resumo

A terapia celular e principalmente a engenharia de tecidos têm sido intensamente exploradas nos últimos anos para o reparo da cartilagem articular. Este estudo tem como objetivo desenvolver uma combinação envolvendo células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTTAs) e hidrogel para uso em estudo clínico de reparo de cartilagem articular em cães. CTTAs foram coletadas de cães saudáveis, cultivadas e caracterizadas. As células foram combinadas a vários tipos de biomateriais e avaliadas *in vitro*. Foi definido para uso no projeto o hidrogel de ácido hialurônico (Synvisc, Novartis, SP). Quatorze cães com displasia coxofemoral já foram incluídos no estudo - seis receberam CTTAs, quatro CTTAs associadas a Synvisc, e quatro controles placebo. Análises clínicas e radiológicas são realizadas aos 30, 60 e 90 dias. O projeto foi aprovado pelo CEUA da ULBRA (nº 2016.82). CTTAs caninas foram isoladas e cultivadas, mostrando morfologia, proliferação e capacidade de diferenciação características deste tipo celular. As células combinadas a Synvisc proliferaram e foram capazes de diferenciar em tecido cartilaginoso. O estudo clínico até o presente momento mostrou que os cães tratados com terapia intra-articular de CTTAs associadas ao hidrogel Synvisc apresentam melhores resultados e em menor tempo (60 dias), com melhoras significativas em vários parâmetros ao fim do tratamento. O grupo tratado só com células apresentou melhora evidente aos 90 dias, e o grupo placebo teve agravamento dos sinais clínicos. O menor tempo para observação da melhora nos pacientes do estudo clínico se deve ao Synvisc que incrementa a ação das CTTAs, antecipando a melhora do paciente.

Palavras chave: células-tronco; biomaterial; condrogênese; synvisc; displasia.

INTRODUÇÃO

A terapia celular e principalmente a engenharia de tecidos têm sido intensamente exploradas nos últimos anos para o reparo da cartilagem articular, com emprego de várias combinações de biomateriais, células e moléculas sinalizadoras (CHUAH, 2017). As células-tronco mesenquimais (CTMs) são as células originais mesodérmicas presentes em todos os tecidos e capazes de diferenciação *in vitro* e *in vivo* em diferentes tipos celulares (DA SILVA MEIRELLES, 2016). Seu potencial terapêutico é principalmente explicado pela produção de moléculas bioativas que promove uma regeneração do microambiente do tecido lesado. As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTTAs) são uma população de CTMs que recebe especial atenção devido a sua facilidade de coleta, abundância e potencial para regeneração (MARX, 2014).

1 Aluno do curso de graduação em Medicina Veterinária – Bolsista PIBIC/CNPq – gabrielactobin@gmail.com

2 Professora do curso de graduação em Medicina Veterinária - witzmi@gmail.com

3 Professora do curso de graduação em Medicina Veterinária – karinegehlen@yahoo.com.br

4 Doutoranda do PPGBioSaúde, técnica da CellMed Medicina Veterinária - maiele@cellvet.com.br

5 Professora do PPGBioSaúde - nance.nardi@ulbra.br

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma combinação envolvendo CTTAs e hidrogel para uso em estudo clínico de reparo de cartilagem articular em cães. A displasia coxofemoral canina é caracterizada por instabilidade e luxação ou subluxação de quadris, sendo uma patologia hereditária ortopédica que afeta cães de todas as raças e com diferentes graus causando dor e claudicação. Estes resultados trarão uma contribuição para esta patologia específica, o estabelecimento de competência na engenharia de tecidos e a possível expansão para outras patologias humanas.

METODOLOGIA

CTTAs foram coletadas de cães saudáveis, a partir de tecido adiposo de três cães doadores, colocadas em cultivo e caracterizadas quanto a morfologia, potencial de proliferação e diferenciação. A quantidade de células coletadas do tecido adiposo de cães variou de 2 a 10×10^5 células por mL de tecido. Para avaliação da morfologia, as células postas em cultura foram analisadas em microscópio óptico em cada passagem. Para a avaliação da proliferação as células foram contadas em cada passagem, e para a diferenciação elas foram incluídas em meios indutores específicos para condrogênese, osteogênese e adipogênese.

As células foram combinadas a vários tipos de biomateriais, com avaliação da viabilidade, proliferação e condrogênese das células nestas combinações. As CTTAs foram semeadas entre as passagens 3 e 6 com os hidrogeis, sendo definido para o estudo clínico o hidrogel de ácido hialurônico (Synvisc, Novartis, SP).

Os construtos células + biomaterial foram mantidos por 28 dias em cultura, sendo posteriormente coradas as matrizes com Alcian Blue (que colore proteoglicanos) para detecção de matriz cartilaginosa.

No estudo clínico em andamento, quatorze cães com displasia coxofemoral já foram incluídos - 6 receberam CTTAs, 4 CTTAs associadas a Synvisc, e 4 controles com tratamento placebo (Tabela 1). Análises clínicas e radiológicas são realizadas aos 30, 60 e 90 dias. O projeto foi aprovado pelo CEUA da ULBRA (nº 2016.82).

Tabela 1. Dados gerais dos pacientes.

Paciente	Raça	Sexo	Idade	Peso	Tratamento
Kiara	Pitbull	Fêmea	5 anos	26 kg	CTTAs
Atena	Border collie	Fêmea	7 meses	13 kg	CTTAs
Tchê	Cimarrow	Macho	1 ano	32 kg	CTTAs
Pandora	Rottweiler	Fêmea	1 ano	37,6	CTTAs
Alana	Pastor Alemão	Fêmea	4 anos	45 kg	CTTAs
Piton	Pastor alemão	Macho	1 ano	30 kg	CTTAs + Synvisc
Pirata	SRD	Macho	7 meses	8,6 kg	CTTAs + Synvisc
Owen	Golden Retriever	Macho	2 anos	36 kg	CTTAs + Synvisc
Max	SRD	Macho	3 anos	53 kg	CTTAs + Synvisc
Lola	Pastor alemão	Fêmea	5 anos	33 kg	Placebo
Bono	Border collie	Macho	3 anos	30 kg	Placebo, Células*
Simba	Labrador	Macho	11 meses	30 kg	Placebo
Jade	Golden Retriever	Fêmea	3 anos	35 kg	Placebo

*Paciente Bono, após completar 90 dias de tratamento placebo, recebeu aplicação de células, sendo a partir de então avaliado também como participante do grupo células.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CTTAs caninas foram isoladas e cultivadas, mostrando morfologia, proliferação e capacidade de diferenciação características deste tipo celular. Mantiveram sua morfologia fibroblastoide típica de célula-tronco mesenquimal (Figura 1A, B). As células proliferaram bem em cultura (Figura 1C).

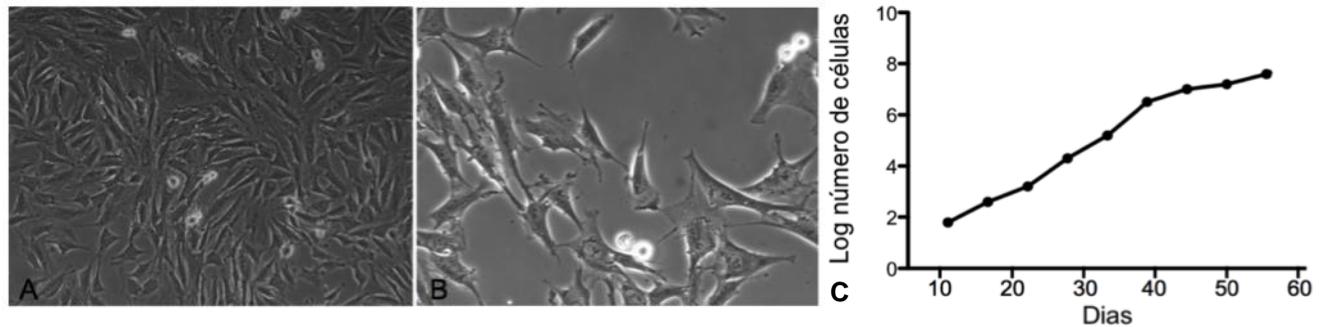


Figura 1 - (A, B) Aspecto fibroblastoide de cultura de CTTAs caninas em passagem 3, observadas sob contraste de fase (A, aumento 100x; B, aumento 200x). (C) Cinética de cultivo das CTTAs de cães.

A capacidade de diferenciação das CTTAs foi confirmada por reação com os corantes específicos para cada linhagem (Figura 2).

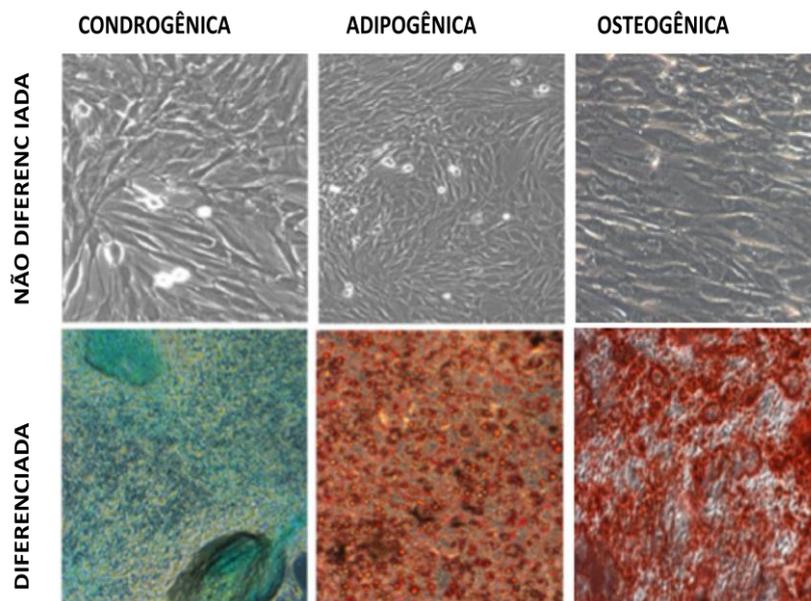


Figura 2 - Potencial de diferenciação das CTTAs de cão em linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica. Aumento original x100.

Estes resultados confirmam que as células isoladas mantêm as características de morfologia, proliferação e diferenciação características das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo, conforme descrito na literatura (MARX, 2014).

As células combinadas a Synvisc foram capazes de diferenciar em tecido cartilaginoso, conforme avaliado por reação com Alcian Blue (Figura 3) e análise histológica (Figura 4). Estes resultados in vitro são importantes por confirmar o potencial condrogênico

deste biomaterial, que já é empregado terapeuticamente (BOUTEFNOUCHET, 2017) e pode ser assim empregado em engenharia de tecidos combinado às células-tronco mesenquimais.

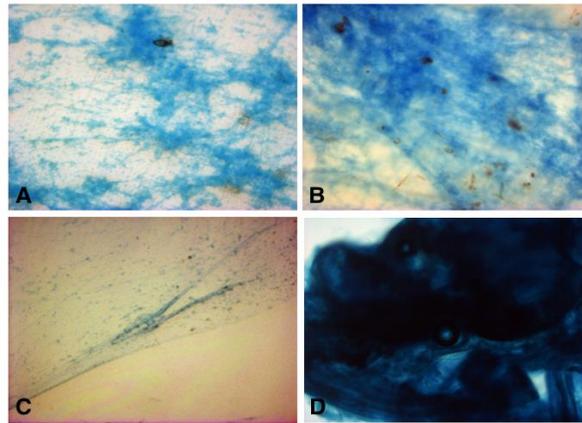


Figura 3. Matriz cartilaginosa formada pela células + Synvisc, coloração com Alcian Blue. (A) Cultivo sem meio indutor. (B) Cultivo com meio indutor. (C) Synvisc sem presença das células,. (D) Detalhe de estrutura. Aumento 200x (A e B), 100x (C e D).

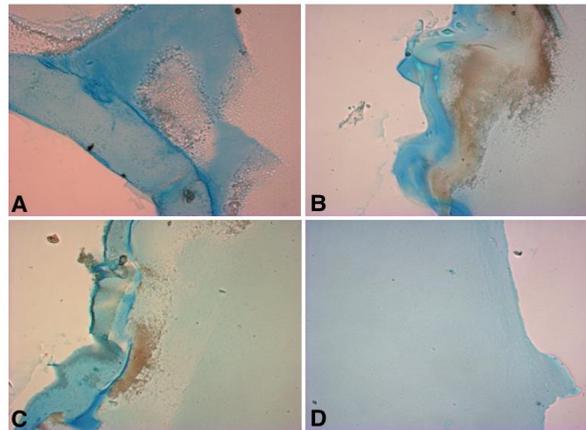


Figura 4. Análise histológica, coloração com Alcian Blue. (A - C) Células mais Synvisc, matriz cartilaginosa produzida pelas células diferenciadas. (D) controle (Synvisc sem células). Aumento 100x.

O estudo clínico com os cães acompanhados até o presente momento mostrou que os cães tratados com terapia intra-articular de CTTAs associadas ao hidrogel Synvisc apresentam melhores resultados e em menor tempo (60 dias), com melhoras significativas em vários parâmetros ao fim do tratamento. Um dos parâmetros observados em que houve significativa melhora, foi a atrofia muscular, sendo que ao fim do tratamento alguns pacientes estavam classificados com atrofia zero, significando o retorno de suas atividades físicas com a diminuição da dor ao movimento.

O grupo tratado só com células apresentou melhora evidente aos 90 dias, e o grupo placebo teve agravamento dos sinais clínicos. As avaliações mais positivas dos proprietários foram no grupo do Synvisc + CTTAs, onde em menor tempo (alguns em menos de 1 mês) notavam seus cães mais dispostos e realizando suas atividades normais com mais facilidade.

Vários estudos têm demonstrado o potencial das células-tronco do tecido adiposo no tratamento da displasia coxofemoral em cães (BLACK, 2008; VILAR, 2014; MARX, 2014), mas não temos conhecimento do uso de engenharia de tecidos para esta finalidade, sendo assim este estudo original neste aspecto.

CONCLUSÕES

A combinação de CTTAs caninas e hidrogel de ácido hialurônico tem ótimo potencial condrogênico, proporcionando a diferenciação das células com a síntese de uma matriz cartilaginosa abundante. O menor tempo para observação da melhora nos pacientes do estudo clínico se deve ao Synvisc que incrementa a ação das CTTAs, antecipando a melhora do paciente com significativo aumento na qualidade de vida. Este estudo será continuado até serem avaliados seis pacientes em cada um dos grupos.

AGRADECIMENTOS

Este estudo tem financiamento do CNPq e FAPERGS (FINEP/Tecnova-RS).

REFERÊNCIAS

BLACK, L.L. *et al.* Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. **Vet Ther**, v. 9, n. 3, p. 192-200, 2008.

BOUTEFNOUCHET, T. *et al.* Hylan GF-20 viscosupplementation in the treatment of symptomatic osteoarthritis of the knee: clinical effect survivorship at 5 years. **Knee Surg Relat Res**, v. 29, n. 2, p. 129-36, 2017.

CHUAH, Y.J. *et al.* Hydrogel based cartilaginous tissue regeneration: recent insights and technologies. **Biomater Sci**, v. 5, n. 4, p. 613-31, 2017.

DA SILVA MEIRELLES, L. *et al.* Mesenchymal stem cells and their relationship to pericytes. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 21, p. 130-156, 2016.

MARX, C. *et al.* Acupoint injection of autologous stromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat hip dysplasia in dogs. **Stem Cells Int**, v. 2014, Article ID 391274, 6 pages. Aug. 2014.

VILAR, J.M. *et al.* Assessment of the effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells in osteoarthritic dogs using a double blinded force platform analysis. **BMC Vet Res**, v. 10, n. 1, p. 143, 2014.