

Expressão da IL-6, MMP-9, MMP-13 e agrecan em condrócitos saudáveis expostos a acetoneido de triancinolona ou plasma rico em plaquetas

Heloisa Einloft Palma^[a], Miguel Gallio^[a], Roberta Carneiro da Fontoura Pereira^[b], Gabriele Biavaschi Silva^[a], Camila Cantarelli^[a], Kalyne Bertolin^[a], Patrícia Wolkmer^[c], Julien Wergutz, Alexandre Krause^[a], Karin Érica Brass^[a], Flávio De La Côte^[a]

^[a] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil

^[b] Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Injuí, RS, Brasil

^[c] Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS, Brasil

*Autor correspondente
e-mail: heinloft@hotmail.com

Resumo

Na cartilagem saudável, os condrócitos mantêm a expressão de colágeno e proteoglicanos e são sensíveis a fatores de crescimento e citocinas que aumentam ou reduzem a síntese de matriz. Na osteoartrite (OA), a decomposição da matriz é acompanhada por alterações fenotípicas dos condrócitos. As citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF α), desempenham papel fundamental na OA, aumentando a expressão de metaloproteinases (MMP) e diminuindo a síntese de macromoléculas, incluindo o colágeno tipo II e o agrecano. Sabe-se que a MMP-9 e MMP-13 são importantes na destruição da cartilagem articular, especialmente por degradação de colágeno. A expressão de IL-6, que é induzida pela IL-1, também faz parte do processo de degradação articular. Para reduzir os efeitos clínicos causados pela OA, o acetoneido de triancinolona (TA) e o plasma rico em plaquetas (PRP) são utilizados com frequência por via intra-articular. Os pacientes da medicina esportiva necessitam de rápido retorno ao seu nível funcional e o PRP pode acelerar essa recuperação. Já o TA é considerado benéfico ao ambiente articular, sendo que os animais tratados se mostram menos claudicantes e com níveis mais baixos de proteínas no líquido sinovial. Devido ao uso bem difundido desses agentes nos casos de OA e com a finalidade de avaliar os possíveis efeitos deletérios do TA e do PRP, optou-se por realizar os tratamentos sobre um cultivo de condrócitos, avaliando a expressão gênica dos fatores produzidos pelos condrócitos. Articulações metacarpofalangeanas de cinco equinos adultos, clínica e radiograficamente saudáveis, foram usadas. Fragmentos de cartilagem foram colhidos sob ambiente asséptico e sofreram digestão enzimática com pronase e colagenase em tubos Falcon, sendo essa reação interrompida com meio de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 60U/mL de penicilina, 60 μ g/mL de estreptomina e 2mmol/L de glutamina.



As células foram cultivadas em garrafas, encubadas a 37°C em uma estufa com 5% de CO₂. Após um período de 21 dias, quando as células tinham confluência de 90%, elas foram transferidas às placas de cultivo celular. Após nova confluência de 90%, em três dias, realizou-se o tratamento das mesmas por 30 minutos como segue: G1 - controle condrócitos; G2 - condrócitos + PRP (500.000 plaquetas/poço); G3 - condrócitos + TA (0,06mg/mL), sendo que os testes foram repetidos cinco vezes. As células destinadas à realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram encaminhadas para o processo de extração de RNA, realizado com o reagente TRIzol®. Após esse procedimento, as amostras foram analisadas para expressão gênica da IL-6, agrecano, MMP-9 e MMP-13. Uma alíquota celular foi encaminhada para realização de testes de viabilidade pelos métodos de azul de trypan e por citometria de fluxo. O PRP foi preparado após coleta de sangue total em bolsa de coleta com CPDA-1 da veia jugular de um equino saudável, que foi usado em todos os preparos para a realização deste estudo. As amostras foram centrifugadas para obtenção do PRP de acordo com técnicas já bem estabelecidas pelo nosso laboratório. Optou-se por usar um filtro de leucócitos a fim de remover células inflamatórias no momento da aplicação. Os dados foram analisados por teste de ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey, sendo significativo quando $p < 0,05$. Observou-se alta viabilidade celular nos três grupos quando comparados ao grupo controle, em uma média de mais de 98% de células viáveis. Não foram observadas diferenças na produção de MMP-9, MMP-13, IL-6 e agrecano entre os tratamentos com TA ou PRP. Sugere-se que a exposição de condrócitos normais ao TA e ao PRP não resultou em um aumento na síntese de MMPs, IL-6 e agrecano, não tendo sido associados com efeitos deletérios para as culturas de condrócitos.

Palavras-chave: Metaloproteinases. IL-6. Agrecano.