ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO CELULAR E DE EXOSSOMOS, APÓS FOTOESTIMULAÇÃO DE TECIDO ADIPOSO COM LASER 1210 nm

Introdução: O enxerto de gordura autólogo é uma técnica bem estabelecida para restauração de volume e fins regenerativos [1][2][3][4]. O potencial regenerativo do tecido adiposo(TA) é atribuído à presença de células-tronco de origem mesenquimal(CTM) [2][3][5]. A fotobiomodulação (PBM) envolve a aplicação de luz policromática na região do infravermelho próximo (600-1200 nm), aumentando a viabilidade dos adipócitos, promovendo a neovascularização e reduzindo a inflamação[6].O laser 1210 nm se enquadra no espectro infravermelho próximo. Ele foi estudado por sua seletividade pelo TA [7] que, fotoestimulado apresenta CD105 [8], angiogênico[9], sendo utilizado para fechamento de ferida complexa em pé diabético, em sessão única, havendo inclusive, regeneração tendinosa, o que motivou estudos de caracterização celular e biologia molecular para elucidar este evento.

Métodos: trinta amostras de grupos controle(GC) e fotoestimulado(GF) foram submetidos a análise imunofenotípica da fração estromal vascular e das células cultivadas, utilizando-se anticorpos monoclonais contra CDs14-29-31-34-44-45-73-90-105-106-OCT3/4-ALDH1-HLA-I-HLA-II e seus respectivos mAbs de controle. Os grupos foram submetidos a análise de ciclo celular(CC). [10, 11, 12] Foram realizadas extração e caracterização de exossomos de tecidos irradiados ou não e confirmados, através de microscopia eletrônica de transmissão. Foi utilizada microscopia confocal para CDs9-63 de parede de exossomos. [13, 14] Foram realizadas Reações em Cadeia de Polimerase(PCR) para identificar a expressão de RNAm nos diferentes exossomos.

Resultados: Foram demonstrados marcadores típicos de CTMs positivo para CDs90-73-44-105 e negativo para CDs14-31-106-34 medidos por citometria de fluxo. Análise de variância com teste T não pareado foram aplicados entre GC e GF, mostrando diferença significativa com $p<0,0001$ para os diversos marcadores. No CC, 85,29% das células do GC encontravam-se na fase G1, enquanto no GF, 88,33% das células estavam nas fases S-G2. Os exossomos exibiram variação de 30-100nm. As células irradiadas têm maior expressão dos CDs9-63 . Os testes de PCR identificaram os fatores de crescimento(FT): PDGF-TGFb-EGF-FGF2-VEGF-IGF-105, que comparados ao GC demonstraram diferença significativa $p<0,0001$. O menor acréscimo ocorreu com TGF(2,36x) e o maior com VEGF(9,18x).

Discussão: O presente estudo demonstra que a fotoestimulação com laser 1210 nm proporciona importante incremento de CTMs e variedade de exossomos, estimulando várias funções regenerativas. A maior expressão dos CDs9-63, proteínas envolvidas na adesão, migração e sinalização celular reforça o papel dos exossomas. Na modulação do CC, as fases S-G2 têm maior expressão. A fase S é fundamental para a replicação do DNA, enquanto na fase G2, a célula continua a crescer e se preparar para a divisão celular, demonstrando maior atividade metabólica e de síntese proteica.

Conclusão: A fotoestimulação do TA influencia positivamente o CC, promovendo a viabilidade dos adipócitos, estimulando a expressão de CTMs com liberação heterogênea de exossomos e FT, reduzindo a inflamação e incentivando a neovascularização, o que é crucial para a sobrevivência e saúde dos enxertos de gordura. A fotoestimulação promove efeito 'booster' no processo regenerativo. Novos estudos são necessários para aprofundamento do entendimento dos processos de biologia molecular e padronização metodológica para fotoestimulação do TA com fins regenerativos.

REFERÊNCIAS:

1.Adipose Grafting for Volume and Scar Release. Le JM, Bosworth JW, Honeywell B, Ananthasekar S, Collawn SS. Annals of Plastic Surgery. 2021;86(6S Suppl 5):S487-S490. doi:10.1097/SAP.0000000000002873.

2.Fat Grafting as Regenerative Surgery: A Current Review. Firriolo JM, Condé-Green A, Pu LLQ. Plastic and Reconstructive Surgery. 2022;150(6):1340e-1347e. doi:10.1097/PRS.0000000000009710.
3.Fat Grafting for Treatment of Facial Scars. Klinger M, Klinger F, Caviggioli F, et al. Clinics in Plastic Surgery. 2020;47(1):131-138. doi:10.1016/j.cps.2019.09.002.
4.Fat Grafting in Aesthetics. Dayal A, Bhatia A, Hsu JT. Clinics in Dermatology. 2022 Jan-Feb;40(1):35-44. doi:10.1016/j.clindermatol.2021.08.010.
5.Systematic Review of the Therapeutic Roles of Adipose Tissue in Dermatology. Walocko FM, Eber AE, Kirsner RS, Badiavas E, Nouri K. Journal of the American Academy of Dermatology. 2018;79(5):935-944. doi:10.1016/j.jaad.2018.06.010.
6.Photobiomodulation With Polychromatic Light (600-1200nm) Improves Fat Graft Survival by Increasing Adipocyte Viability, Neovascularization, and Reducing Inflammation in a Rat Model. Sert G, Kucukguven A, Zırh EB, et al. Lasers in Surgery and Medicine. 2022;54(2):268-280. doi:10.1002/lsm.23457.
7.Anderson RR, Farinelli W, Laubach H, Manstein D, Yaroslavsky AN, Gubeli J 3rd, Jordan K, Neil GR, Shinn M, Chandler W, Williams GP, Benson SV, Douglas DR, Dylla HF. Selective photothermolysis of lipid-rich tissues: a free electron laser study. Lasers Surg Med. 2006 Dec;38(10):913-9. doi: 10.1002/lsm.20393. PMID: 17163478.
8.Centurion P, Savitzky MJ. Separation,aspiration, and fat equalization: SAFE liposuction concepts for comprehensive body contouring. Plast Reconstr Surg. 2017;140(1):234e-235e. doi: 10.1097/PRS.0000000000003456]
9.Centurion P. Rediscovering the-involuted-regenerative system? Aesthetic Plast Surg. 2022;46(3):1510-1512. doi: 10.1007/s00266-021-02585-w
10. Cell Cycle Progression and Synchronization: An Overview. Wang Z. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). 2022;2579:3-23. doi:10.1007/978-1-0716-2736-5_1.
11. Synchronization of HeLa Cells to Various Interphases Including G1, S, and G2 Phases. Wee P, Wang RC, Wang Z. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). 2022;2579:87-97. doi:10.1007/978-1-0716-2736-5_7.
12. Synchronization of Cultured Cells to G1, S, G2, and M Phases by Double Thymidine Block. Wang RC, Wang Z. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). 2022;2579:61-71. doi:10.1007/978-1-0716-2736-5_5.
13. Ai Y, Guo C, Garcia-Contreras M, Sánchez B LS, Saftics A, Shodubi O, Raghunandan S, Xu J, Tsai SJ, Dong Y, Li R, Jovanovic-Talisman T, Gould SJ. Endocytosis blocks the vesicular secretion of exosome marker proteins. Sci Adv. 2024 May 10;10(19):eadi9156. doi: 10.1126/sciadv.adi9156. Epub 2024 May 8. PMID: 38718108; PMCID: PMC11078179
14. Duke LC, Cone AS, Sun L, Dittmer DP, Meckes DG Jr, Tomko RJ Jr. Tetraspanin CD9 alters cellular trafficking and endocytosis of tetraspanin CD63, affecting CD63 packaging into small extracellular vesicles. J Biol Chem. 2025 Mar;301(3):108255. doi: 10.1016/j.jbc.2025.108255. Epub 2025 Feb 3. PMID: 39909378; PMCID: PMC11919600.