



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE  
MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA -  
UNESP**

**Márcio Eduardo de Melo Viveiros**

**Efeito anti-inflamatório da triancinolona e do  
plasma rico em plaquetas em células de  
epicondilite lateral do cotovelo – estudo *in vitro***

Tese apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Campus de Botucatu,  
para obtenção do título de  
Doutor junto ao Programa de  
Pós Graduação em Cirurgia e  
Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Artioli Schellini

**Botucatu  
2020**

Márcio Eduardo de Melo Viveiros

Efeito anti-inflamatório da triancinolona e do plasma rico em plaquetas  
em células de epicondilite lateral do cotovelo - estudo *in vitro*

Tese apresentada à  
Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, Campus de  
Botucatu, para obtenção  
do título de Doutor junto  
ao Programa de Pós  
Graduação em Cirurgia e  
Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Artioli Schellini

Botucatu  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Viveiros, Marcio Eduardo de Melo.

Efeito anti-inflamatório da triancinolona e do plasma rico em plaquetas em células de epicondilite lateral do cotovelo : estudo in-vitro / Marcio Eduardo de Melo Viveiros. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Silvana Artioli Schellini  
Capes: 40101186

1. Cotovelos - Doenças. 2. Cotovelo de tenista.  
3. Citocinas. 4. Inflamação. 5. Triancinolona.

Palavras-chave: Citocinas; Epicondilite lateral do cotovelo; Inflamação; PRP; Triancinolona.

## DEDICATÓRIA

*A minha esposa Magda, esta tese é dedicada a você, cada letra de cada palavra, tem a sua ajuda e colaboração, sem você este trabalho nunca seria possível, obrigado por estar comigo nesta caminhada.*

*As minhas filhas Letícia e Gabriela, pela compreensão e carinho com a ausência dos Pais para idas ao laboratório nos fins de semana, férias, Natal e Ano Novo e por nos acompanhar muitas vezes.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Silvana Artioli Schellini, minha orientadora, por acreditar que eu conseguiria realizar este estudo, pela ajuda na condução desta tese e, seus valiosos conselhos.

A Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho e toda sua equipe, pelo uso do Laboratório de Epigenética, pela imprescindível ajuda e orientação na condução dos experimentos e na análise dos resultados.

A Profa. Dra. Márcia Guimarães Silva e toda equipe do Departamento de Patologia, pela imprescindível ajuda na realização e dos experimentos e na análise dos resultados

Aos Profs. da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da UNESP pela confiança depositada no meu trabalho, pela ajuda e conselhos na confecção desta tese.

Aos colegas do Grupo de Ombro e Cotovelo da Disciplina de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da UNESP, pela ajuda na seleção, nas cirurgias e no acompanhamento dos pacientes envolvidos neste estudo

## RESUMO

VIVEIROS, M. E. M. **Efeito anti-inflamatório da triancinolona e do plasma rico em plaquetas em células de epicondilite lateral do cotovelo - estudo *in vitro***. 2020. 48 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

A epicondilite lateral do cotovelo (ELC) é uma tendinopatia comum. Entretanto, tanto sua patogênese, quanto seu tratamento, são ainda controversos.

**Objetivo:** Avaliar a produção das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  pelas células derivadas de ELC e comparar o efeito anti-inflamatório da triancinolona acetinado e do plasma rico em plaquetas (PRP) sobre a secreção das citocinas em cultivo celular.

**Métodos:** foram estabelecidas culturas celulares a partir de fragmentos da lesão de portadores de ELC obtidos durante procedimentos operatórios, a partir dos quais se estabeleceram culturas celulares. Células de terceira passagem destes cultivos foram estudadas quanto à produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ , por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). As células em cultivo foram submetidas ao tratamento com 1, 10 e 100  $\mu$ M de triancinolona nos tempos 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas e também ao PRP, nos tempos 48, 72 e 96 horas. Os resultados foram comparados com células de ELC não tratadas, consideradas como grupo controle. Os resultados foram submetidos a análise estatística.

**Resultados:** as citocinas IL-6 e a IL-8 foram produzidas em altas concentrações pelas células de ELC. A triancinolona a 1, 10 e 100  $\mu$ M, quando comparada aos controles, levou a redução significativa na produção de IL-6 e IL-8 nos tempos 48, 72 e 96

horas, acrescentando-se o tempo 12 horas para a IL-8. O PRP comparativamente aos controles, causou elevação significativa da produção de IL-6 nos tempos 72 e 96 horas e da IL-8 nos tempos 48,72 e 96 horas. Na comparação à triancinolona, nas três concentrações, o PRP levou a aumento significativo de IL-6 nos tempos 72 e 96 horas e de IL-8 nos tempos 48,72 e 96 horas. Houve aumento significativo da produção de IL-10 com o uso da triancinolona a 100  $\mu$ M, no tempo 48 horas comparativamente aos controles. A produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  não apresentou alterações significativas quando as culturas foram tratadas com triancinolona ou PRP.

**Conclusão:** As células de ECL produzem IL-6 e IL-8, comprovando a natureza inflamatória desta afecção. A triancinolona mostrou-se eficaz na inibição da produção de IL-6 e IL-8 nas concentrações 1, 10 e 100  $\mu$ M partir de 48 horas, em comparação aos controles. O PRP levou a um maior efeito inflamatório, elevando significativamente os níveis de IL-6 e IL-8 em relação aos controles.

Palavras chave: epicondilite lateral do cotovelo; triancinolona, PRP, citocinas, inflamação.

## ABSTRACT

VIVEIROS, M. E. M. **Anti-inflammatory effect of triamcinolone and platelet-rich plasma on lateral epicondylitis derived cells *in vitro***. 2020. 48 p. Thesis (Doctoral) - Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

**Background:** lateral elbow epicondylitis is a common musculoskeletal condition, however, pathogenesis and treatment of this condition still controversial.

**Objective:** to evaluate the production of inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  by lateral elbow epicondylitis derived cells and to compare the anti-inflammatory effect of triamcinolone acetone with platelet rich plasma (PRP) on the production of these cytokines in cell culture.

**Methods:** Third passage cells from primary cultures of lateral elbow epicondylitis were assessed for the production of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  by immunoenzymatic assay (ELISA), comparing the treatment with 1, 10 and 100  $\mu$ M triamcinolone to controls at the time points 6, 12, 18, 24, 48, 72 and 96 hours and, comparing to PRP at 48, 72 and 96 hours.

**Results:** the cytokines IL-6 and IL-8 were produced in high concentrations by LEE cells. Triamcinolone at 1, 10 and 100  $\mu$ M, when compared to controls, led to a significant decrease in the production of IL-6 and IL-8 at 48, 72 and 96 hours, adding the time point 12 hours for IL-8. When compared to the controls PRP caused, a significant increase in the production of IL-6 at 72 and 96 hours and IL-8 at 48, 72 and 96 hours. In comparison to triamcinolone, within the three concentrations, PRP

led to a significant increase of IL-6 at 72 and 96 hours and of IL-8 at 48, 72 and 96 hours. There was a significant increase in IL-10 production with the use of 100  $\mu$ M triamcinolone, at 48 hours compared to controls. The production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  did not show significant changes when the cultures were treated with triamcinolone or PRP.

**Conclusion:** LEE cells produce IL-6 and IL-8, proving the inflammatory nature of this condition. Triamcinolone was effective in inhibiting the production of IL-6 and IL-8 at concentrations 1, 10 and 100  $\mu$ M after 48 hours, compared to controls and PRP, which led to a greater inflammatory effect, significantly increasing IL-6 and IL-8 levels compared to controls.

Keywords: lateral elbow epicondylitis, triamcinolone, PRP, cytokines, inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema anatômico dos músculos extensor radial longo do carpo, extensor radial curto do carpo e extensor comum dos dedos .....	02
<b>Figura 2:</b> Histologia dos extensores do cotovelo.....	04
<b>Figura 3:</b> Tecido angiofibroblástico da ELC .....	06
<b>Figura 4:</b> (A) Microscopia da ELC e (B) tendão normal .....	11
<b>Figura 5:</b> (A) Células fusiformes migrando à partir do explante de epicondilite lateral (B) Células em proliferação; (C) e (D) células em confluência .....	31
<b>Figura 6:</b> Detalhes da morfologia das células em cultivo .....	32
<b>Figura 7:</b> Distribuição da viabilidade celular no ensaio do MMT .....	33
<b>Figura 8:</b> Cinética da produção de IL-6 pelas células de ELC após exposição à triancinolona, PRP e controles.....	34
<b>Figura 9:</b> Cinética da produção de IL-8 pelas células de ELC após exposição à triancinolona, PRP e controles .....	35
<b>Figura 10:</b> Cinética da produção de IL-8 pelas células de ELC no período de 6 a 48 horas após exposição à triancinolona, PRP e controles (gráfico de colunas) .....	36
<b>Figura 11:</b> Produção de IL-6, IL-8, IL-10, IL1- $\beta$ e TNF- $\alpha$ produzidas pelas células de ELC relativas aos grupos controles .....	37
<b>Figura 12:</b> Níveis de IL-6 produzidos pelas células de ELC expostas à triancinolona, PRP e controles .....	38
<b>Figura 13:</b> Níveis de IL-8 produzidos pelas células de ELC expostas à triancinolona, PRP e controles .....	39
<b>Figura 14:</b> Níveis de IL-10 produzidos pelas células de ELC expostas à triancinolona, ao PRP e controles .....	40
<b>Figura 15:</b> Níveis de IL1- $\beta$ produzidos pelas células de ELC expostas à triancinolona, ao PRP e controles .....	40
<b>Figura 16:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ produzidos pelas células de ELC expostas à 1, 10 e 100 $\mu$ M de triancinolona, ao PRP e controles .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

**ELC** - epicondilite lateral do cotovelo

**bFGF** - fator de crescimento básico de fibroblastos

**C7, C8** – raiz do nervo radial

**cm** – centímetro

**DMEM/F12** - *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*

**DMSO** - *dimethyl sulfoxide*

**ECD** – extensor comum dos dedos

**EGF** - fator de crescimento epidermal

**ELISA** – ensaio de imuno absorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**ERCC** - extensor radial curto do carpo

**ERCC** - músculo extensor radial curto do carpo

**ERLC** – extensor radial longo do carpo

Fig. – figura

**IFN- $\gamma$**  - interferon gama

**IGF-1** - fator de crescimento insulina-*like*

**IL** - interleucina

**IL-10** - interleucina-10

**IL-1 $\beta$**  - interleucina-1 $\beta$

**IL-6** - interleucina-6

**IL-8** - interleucina-8

**L** – litros

**LCA** - ligamento cruzado anterior

**mL** – mililitros

**mm<sup>2</sup>** – milímetros quadrados

**MMPs** – metaloproteinases de matriz

**MTT** - 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

**nm** – nanômetro

**NPH** - protamina neutra de Hagedorn

**OD** – densidade óptica (*optical density*)

**P** - probabilidade de significância

**PBS** – *phosphate buffered saline solution*

**PDGF** - fator de crescimento derivado de plaquetas

**pg** – picogramas ( $10^{-12}$ g)

**PRP** – plasma rico em plaquetas

**rpm** – rotações por minuto

**SFB** - soro fetal bovino

**TC** – *tissue culture*

**TGF- $\beta$**  - fator de crescimento transformador  $\beta$

**TGF- $\beta$**  - fator transformador de crescimento  $\beta$   $\mu$

**TNF- $\alpha$**  - fator de necrose tumoral  $\alpha$

**UI** – unidade internacional de medida

**UNESP** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

**VEGF** - fator de crescimento endotelial vascular

**$\mu$ g** - microgramas

**$\mu$ L** – microlitros

$\mu\mathbf{M}$  – micromolar

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Anatomia normal do cotovelo.....	1
1.2. Estrutura e função articular do cotovelo.....	2
1.3. Embriologia.....	3
1.4. Anatomia microscópica.....	3
1.5. Suprimento sanguíneo e linfático .....	4
1.6. Inervação.....	4
1.7. Variantes Fisiológicas .....	5
1.8. Epicondilite lateral do cotovelo.....	5
1.8.1. Definição .....	5
1.8.2. Histórico .....	6
1.8.3. Epidemiologia.....	7
1.8.4. Etiologia e patogenia .....	7
1.8.4.1. Citocinas.....	8
1.8.5 Histologia .....	10
1.8.6 Classificação clínica da ELC .....	11
1.8.7 Quadro clínico.....	12
1.8.8 Diagnóstico diferencial .....	12
1.8.9 Tratamento .....	12
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Desenho do estudo.....	19
3.2. Descrição da amostra .....	19
3.3. Variáveis estudadas .....	20
3.4. Método de coleta dos explantes de ELC .....	20
3.4.1. Técnica cirúrgica.....	20
3.4.2 Coleta do material de estudo.....	22
3.5. Processamento do material de estudo.....	22
3.5.1. Cultivo celular .....	22
3.5.2 Processamento do PRP.....	24
3.6. Estratégia de estudo.....	25
3.6.1. Padronização do tempo de exposição à triancinolona pelo estudo da cinética de produção das citocinas inflamatórias .....	26
3.7. Padronização das concentrações de triancinolona com efeito anti-inflamatório .....	28
3.8. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Cultivo celular primário.....	31
4.2. Teste de viabilidade do MTT .....	32
4.3. Cinética de produção das citocinas inflamatórias .....	33
4.3.2. Cinética da produção de IL-8 .....	35
5. DISCUSSÃO .....	42
5.1. Considerações à respeito da metodologia aplicada.....	42

5.1.2. Cultivo celular .....	43
5.1.3. Tratamentos estudados.....	43
5.2. Análise dos resultados .....	44
5.2.1. Estudo da viabilidade celular.....	44
5.2.2. Cinética de produção das citocinas sob efeito da triancinolona e do PRP .....	46
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
8.ANEXO .....	73
8.1 Parecer Consubstanciado CEP.....	73

## INTRODUÇÃO

A epicondilite lateral do cotovelo (ELC) é uma condição musculoesquelética comum, inicialmente descrita em 1882 (Morris, 1882). No entanto, até os dias atuais sua etiopatogenia não está completamente esclarecida e necessita ser revisada, assim como seu tratamento, para o qual ainda não há um consenso.

Com a atual descoberta dos mecanismos de ação das citocinas inflamatórias, novos horizontes se abrem para a elucidação da patogênese e avaliação do melhor tratamento desta condição tão comum na prática clínica ortopédica.

### 1.1. Anatomia normal do cotovelo

O músculo extensor radial curto do carpo (ERCC) (Fig. 1) é um dos sete músculos extensores superficiais do compartimento posterior do antebraço, juntamente com o músculo braquiorradial, extensor radial longo do carpo, extensor comum dos dedos, extensor do quinto dedo, extensor ulnar do carpo e ancônio. Quatro destes sete músculos compartilham uma origem tendinosa única no epicôndilo lateral: extensor radial curto do carpo, extensor carpo ulnar, extensor do dedo mínimo e extensor comum dos dedos.

O ERCC é o principal extensor do punho, se originando do epicôndilo lateral do úmero por um tendão comum compartilhado com outros músculos. Insere-se na base do terceiro metacarpo no lado radial da superfície dorsal e compartilha uma bainha sinovial comum com o extensor radial longo do do carpo.

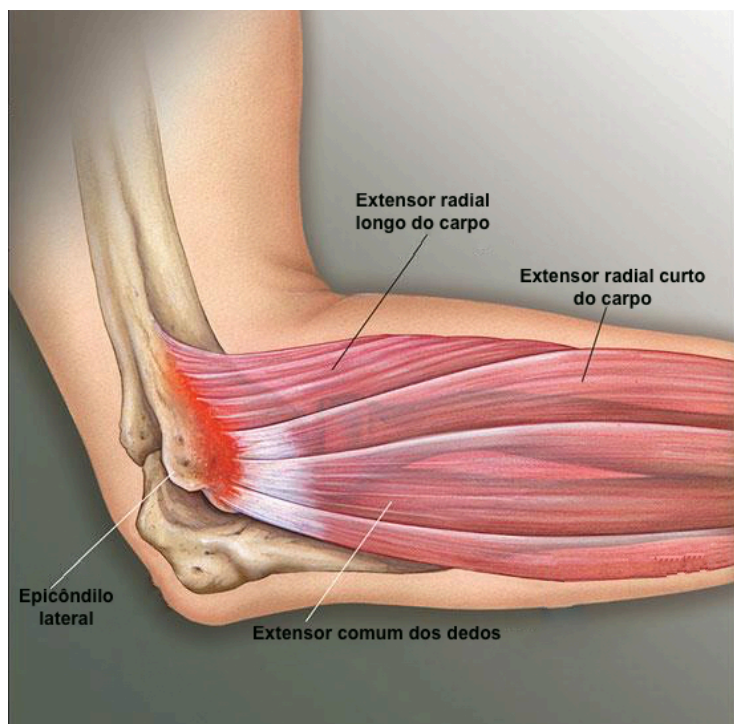


Figura 1 - Esquema anatômico dos músculos extensor radial longo do carpo, extensor radial curto do carpo e extensor comum dos dedos.

Fonte: Reproduzido e modificado de *The Body Almanac*. © *Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos*, 2003.

## 1.2. Estrutura e função articular do cotovelo

O ERCC trabalha em conjunto com o extensor radial longo do carpo para estender e abduzir o punho. Em comparação com o extensor radial longo do carpo, o ERCC é mais curto e é parcialmente coberto por ele. Anatomicamente, os músculos abductor longo do polegar e o extensor curto do polegar passam superficialmente pelo tendão do ERCC. Este músculo passa profundamente pelo ligamento dorsal do carpo (retináculo extensor), dentro do segundo compartimento extensor do punho, na superfície dorsal da mão. É possível palpar esse músculo durante a extensão e abdução do punho contra a resistência, enquanto a mão estiver pronada.

### **1.3. Embriologia**

A musculatura do membro superior se origina de mioblastos das células dorsolaterais do somito que circunda os ossos na quarta semana de desenvolvimento intrauterino. Essas células se desenvolvem em uma massa de tecido que dá origem aos compartimentos extensor (dorsal) e flexor (ventral) do membro. Uma vez formado, o ramo flexor primário adentra no mesênquima, dando origem às divisões anterior e posterior. A divisão posterior inerva o compartimento extensor, incluindo nervos como o nervo radial. O ramo profundo do nervo radial (C7, C8), surge para suprir o extensor radial curto do carpo.

### **1.4. Anatomia microscópica**

O exame microscópico do tecido normal do ERCC confirma a anatomia macroscópica, na qual os tendões do extensor radial curto do carpo e do comum dos dedos são indistinguíveis na origem ósseo-tendinosa e parecem estar interligados. Em alguns casos, estes músculos podem ter seus tendões divididos por uma faixa extremamente fina de gordura e tecido conjuntivo frouxo. Histologicamente, os tendões dos músculos extensor radial curto do carpo e comum dos dedos não podem ser identificados separadamente. A coloração tricrômica de Masson mostra que eles são uma estrutura única do epicôndilo lateral (Fig. 2). As origens dos músculos extensor radial longo do carpo e do extensor ulnar do carpo se mostram separados da origem do músculo extensor comum dos dedos por tecido conjuntivo e gordura. A cápsula articular da aponeurose do músculo extensor dos dedos e do extensor radial longo do carpo é separada por uma camada de tecido fibroso denso.

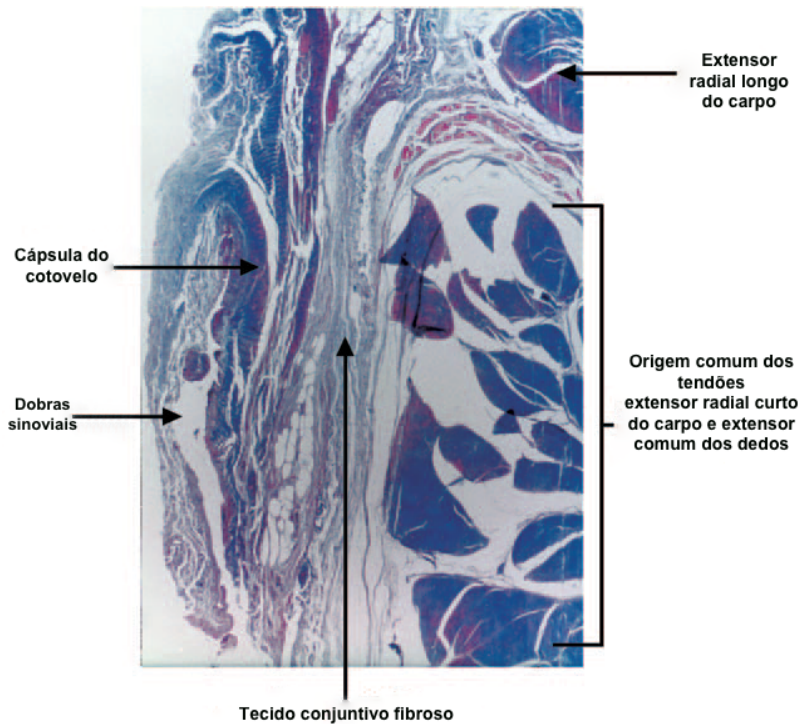


Figura 2 - Histologia dos extensores do cotovelo (coloração tricrômico de Masson).

Fonte: *J Bone Joint Surg [B]* 1999;81-B:926.

### 1.5. Suprimento sanguíneo e linfático

O ERCC recebe suprimento sanguíneo principalmente da artéria radial, com suprimento adicional do ramo colateral radial da braquial profunda. A partir da artéria radial, o extensor radial curto recebe primeiro um ramo da artéria radial recorrente. Então, mais abaixo no antebraço, o músculo recebe um ramo adicional da artéria radial.

### 1.6. Inervação

Os fascículos nervosos que suprem o músculo ERCC surgem do ramo profundo do nervo radial, imediatamente antes de o nervo passar profundamente ao músculo supinador (C7, C8).

## **1.7. Variantes Fisiológicas**

Há poucas variações anatômicas do ERCC. Yang *et al.* (2018) demonstraram que o ERCC pode se originar da fáscia do extensor comum dos dedos, ao invés de sua origem usual que é no epicôndilo lateral, mantendo sua inserção original na base do terceiro metacarpo. Os mesmos autores identificaram outra variação anatômica que envolve uma origem única dos músculos extensor curto do carpo e do extensor radial longo do carpo.

Também existem variantes envolvendo os músculos acessórios do extensor radial longo e curto do carpo. Gümüşalan (1997) relatou um músculo acessório medial à origem do músculo extensor radial curto do carpo, que se continua pelo antebraço, até se inserir no segundo osso metacarpiano.

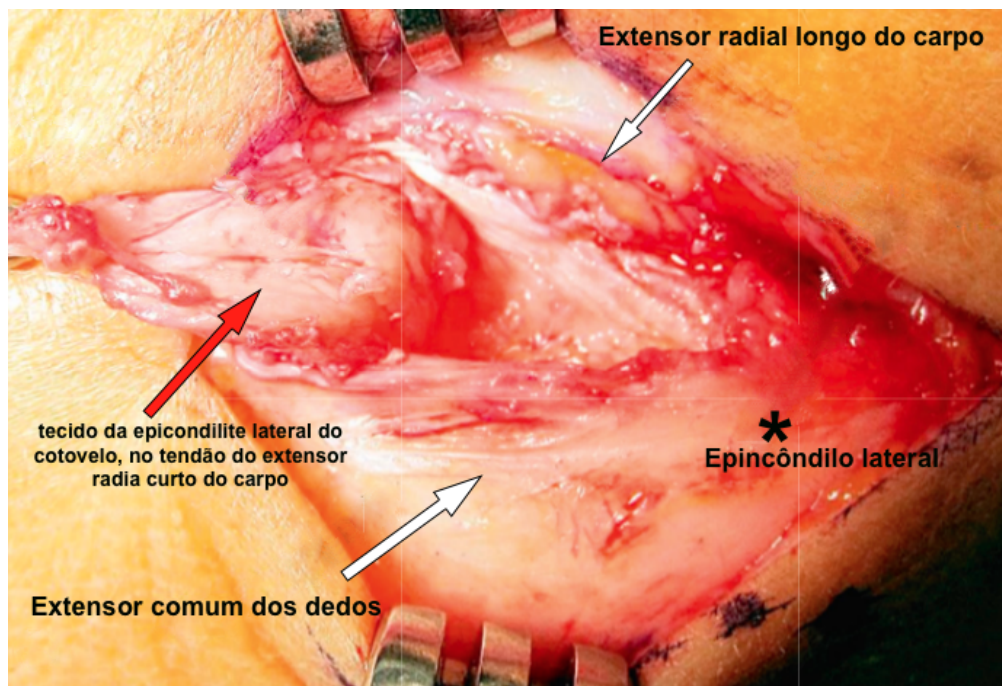
## **1.8. Epicondilite lateral do cotovelo**

### **1.8.1. Definição**

A ELC é também chamada popularmente de *tennis elbow* (cotovelo do tenista) por ter sido inicialmente descrita em praticantes deste esporte na Inglaterra, por Morris (1882). Porém, esta é uma condição que não se restringe apenas aos tenistas, podendo afetar outros esportistas que não usam raquetes, como beisebol, esgrima e natação. Ocupações manualmente intensas e com movimentos repetitivos podem causar estresse aos músculos extensores do punho, com risco aumentado de desenvolver ELC (Nirschl & Pettrone, 1979).

A ELC consiste no crescimento de um tecido angiofibroblástico do tendão do músculo extensor radial curto do carpo (Fig. 3), no epicôndilo lateral, causando dor à movimentação do cotovelo quando executa o movimento de extensão junto com a extensão do punho.

Apesar de ser considerada autolimitada, com 89% dos pacientes se recuperando no decorrer de um ano, os casos refratários de ELC são muito bem conhecidos por se arrastarem por vários anos, geralmente associados à incapacidade funcional e ao trabalho.



**Figura 3** - Tecido angiofibroblástico da ELC (seta vermelha), no tendão do músculo extensor radial curto do carpo.

Fonte: Reproduzido e modificado de Nirschl R. Lateral Epicondylitis. *In* Morrey's The Elbow and It's Disorder 5<sup>o</sup>. Ed.

### 1.8.2. Histórico

O histórico da ELC é bem controverso. A ELC foi descrita inicialmente por Morris, em 1882, em cotovelos de jogadores de tênis (Morris, 1882). Em 1936, Cyriax revisou o tratamento da ELC, relatando ser o tendão do ERCC a estrutura anatômica chave no desenvolvimento da ELC (Cyriax, 1936). Goldie (1964) e Coonrad & Richard (1973) encontraram um tecido alterado sem localização anatômica precisa, acreditando que alteração semelhante poderia ocorrer em qualquer outro tendão extensor. Somente em 1979, Nirschl publicou informações específicas identificando a ELC como uma alteração patológica primária da origem do ERCC, localizada no epicôndilo lateral (Nirschl, 1979).

### **1.8.3. Epidemiologia**

A ELC é uma condição musculoesquelética comum que afeta igualmente homens e mulheres, acometendo as faixas etárias produtivas, entre 35 e 50 anos (Bisset & Vicenzino, 2015). A incidência de ELC na prática clínica em geral é de 4 a 7 casos a cada 1.000 pacientes por ano (Hamilton, 1986). A prevalência da ELC é de até 14,5% em indivíduos com trabalhos extenuantes, como a indústria de carnes e peixes. Como é uma condição debilitante, associada a alta morbidade, muitas vezes ocasiona ausência prolongada ao trabalho, com custos enormes (Harrington *et al.*, 1998; Walker-Bone *et al.*, 2005).

### **1.8.4. Etiologia e patogenia**

A ELC é considerada como o resultado do uso mecânico recorrente e excessivo, sobrecarregando a porção lateral do cotovelo e excedendo sua tolerância, de forma que o tendão não consegue se auto reparar, levando à múltiplas micro roturas que resultam em laceração e sangramento. O processo de reparação cicatricial pode levar vários meses (Bhabra *et al.*, 2016).

Até 1979, a ELC era considerada um processo inflamatório, uma tendinite, como a que ocorre em qualquer tendão extensor. Porém, nos Estados Unidos foi realizada a análise histológica do tecido da ELC, identificando-se hiperplasia da matriz extra celular, desorganização celular, invasão de fibroblastos, angiogênese e ausência de células inflamatórias, o que foi denominado de "hiperplasia angiofibroblástica" (Nirschl, 1979). A partir disso, foi sugerida a troca do termo "epicondilite" para "tendinose angiofibroblástica" (Nirschl, 1979).

Um extenso estudo do tecido da ELC utilizando imunohistoquímica e microscopia eletrônica reforçou os achados anteriores de Nirschl sobre a ausência de processo

inflamatório, mantendo a afecção como uma doença degenerativa do tendão, ou uma tendinose (Kraushaar & Nirschl, 1999).

#### **1.8.4.1. Citocinas**

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que são rapidamente sintetizadas e secretadas por diversos tipos celulares após estimulação. Essas moléculas agem em células alvo adjacentes de forma aditiva, sinérgica ou antagonista, podendo atuar nas células que as secretam (ação autócrina), nas células próximas (ação parácrina) ou, em alguns casos, em células distantes (ação endócrina). As citocinas são mediadores intercelulares que têm um efeito específico nas interações e comunicações entre as células, regulando o crescimento, sobrevivência e diferenciação celular (Nicolini *et al.*, 2006).

O termo citocina, do grego *cito* que significa célula e *cininas* hormônios, foi introduzido em 1974 (Cohen *et al.*, 1974). Foi proposto para substituir o termo linfocina, introduzido no final dos anos 60, para identificar proteínas solúveis derivadas de linfócitos que possuíam efeitos imunológicos, já que os linfócitos não são a única fonte dessas proteínas. O sistema de nomenclatura interleucina (IL) foi proposto para simplificar a lista crescente de citocinas identificadas, porém essa nomenclatura causa confusão já que essas citocinas não são somente produzidas pelos leucócitos, como o nome sugere, e afetam muitos outros tipos celulares (Cameron & Kelvin, 2013).

As citocinas estão envolvidas na comunicação das células do sistema imunológico para gerar uma forte resposta coordenada e auto limitada contra um fator desencadeante alvo. Embora muitas formas de comunicação do sistema imunológico ocorram por meio da interação célula-célula, a secreção de citocinas permite a rápida propagação da sinalização imune de maneira eficiente.

Com o avanço na compreensão do processo inflamatório e do papel das IL, o conceito da patogenia da ELC vem se alterando. Han *et al.* (2012) defendem que a ELC seja um processo inflamatório, demonstrando a presença de neuropeptídeos, que estariam envolvidos na patogênese da ELC, agindo nas terminações nervosas dos tenócitos da lesão; a liberação destes neuropeptídeos afetaria a permeabilidade vascular e iniciaria reações imunes e pró-inflamatórias locais, um processo inflamatório conhecido como inflamação neuronal.

Atualmente, a descoberta do mecanismo de ação das citocinas inflamatórias trouxe novos conceitos sobre a inflamação. Uma afecção pode ter origem inflamatória quando mediada por citocinas, mesmo não se encontrando células mononucleares inflamatórias na lesão. As citocinas são pequenas proteínas secretadas pelas células e têm um efeito específico nas interações e comunicações intercelulares, podendo ser pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias são frequentemente produzidas em cascata, com uma citocina estimulando células-alvo a produzirem citocinas adicionais, estando envolvidas na regulação positiva da reação inflamatória (Schulze-Tanzil *et al.*, 2011).

Estudos recentes indicam um forte componente inflamatório para a patogênese das tendinopatias, sendo as células inflamatórias e citocinas importantes reguladoras das proteínas da matriz extracelular do tendão (Schulze-Tanzil *et al.*, 2011; Medzhitov, 2018). Citocinas como as IL, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), juntamente com fatores de crescimento, como o fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), são liberados pelas células estromais e imunorreguladoras do tendão em resposta à lesão tecidual e ao estresse mecânico (Legerlotz *et al.*, 2012; Millar *et al.*, 2017). Estas substâncias alteram o fenótipo das células locais. A persistência da inflamação crônica traz como resultado, a produção excessiva e inadequada da matriz de proteínas, com conseqüente fibrose (Millar *et al.*, 2017).

Os ligamentos do tendão são compostos por tecido conjuntivo denso com potencial intrínseco muito limitado para a regeneração. Portanto, a reparação em resposta a mecanismos que envolvem a degeneração são um complexo desafio clínico. O estresse mecânico ao tendão com frequência, intensidade e duração constantes, leva a alterações moleculares no mesmo, causando a liberação de citocinas pro-inflamatórias, as quais podem ser produzidas por vários tipos celulares, como os próprios fibroblastos dos tendões ou mesmo condrócitos. Estas citocinas irão ativar vias de sinalização intracelular para a liberação de mediadores inflamatórios, prostaglandinas, fatores angiogênicos, como o “vascular endothelial growth factor” (VEGF) e ativação da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), os quais estão sabidamente envolvidos na degradação da matriz do tendão e sua degeneração (Archambault *et al.*, 2002; Tsuzaki *et al.*, 2003).

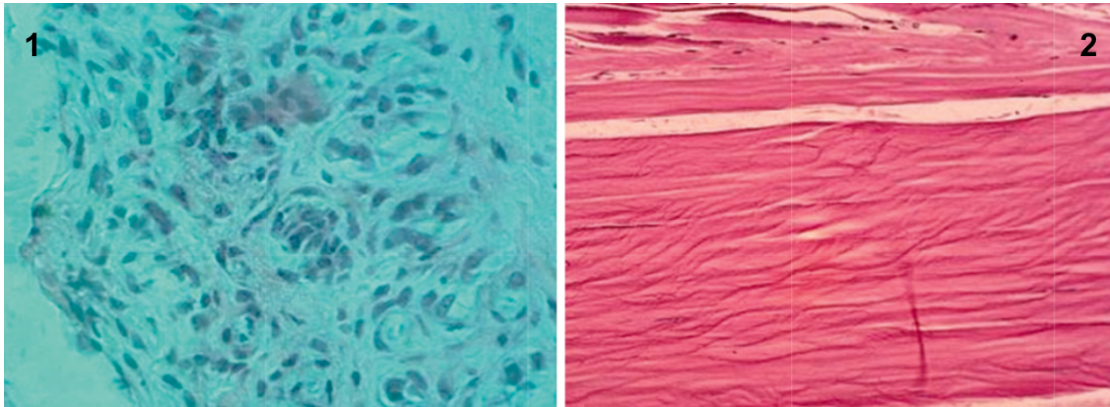
Portanto, a degeneração contínua pode resultar da ação de citocinas inflamatórias mediadas pelos fibroblastos do próprio tecido conjuntivo agredido, mesmo na ausência de células inflamatórias no local (MacNaul *et al.*, 1990; Murphy *et al.*, 1985).

Desta forma, a teoria da patogênese não inflamatória da ELC necessita ser revista.

A predisposição genética também parece desempenhar um papel. Indivíduos portadores do alelo BstUI A1 e alelo DpnII B2 do gene COL5A1 possuem alta probabilidade de desenvolver sintomas de ELC (Keijsers *et al.*, 2018).

### **1.8.5 Histologia**

Histologicamente a ELC é caracterizada pela ausência de células inflamatórias e de alteração da orientação das fibras da matriz extracelular, com a presença de uma degeneração fibrovascular, composta por fibroblastos imaturos e tecido vascular (Fig. 4) (Kraushaar & Nirschl, 1999).



**Figura 4** - (A) Microscopia do tecido da ELC com tecido angiofibroblástico que apresenta elementos vasculares e fibroblásticos imaturos, sem a presença de células inflamatórias (Vimentina 400x). (B) Tendão normal com fibras colágenas organizadas (Hematoxilina/Eosina, 100x).

**Fonte:** J Bone Joint Surg Am.1999; 81(2): 259-78.

### 1.8.6 Classificação clínica da ELC

Segundo Nirschl, a ELC pode ser dividida em 7 fases, definidas pela sintomatologia (Nirschl, 1973):

- Fase 1: dor leve após atividade física que desaparece em 24 horas;
- Fase 2: dor leve antes de atividade física, que melhora após o aquecimento, não estando presente durante a atividade física. Porém, a dor retorna ao término da atividade e persiste por até 48 horas;
- Fase 3: dor presente antes da atividade física, com melhora parcial com o aquecimento, sendo mínima durante a atividade e não afeta o desempenho esportivo ou laboral;
- Fase 4: similar à fase 3, porém mais intensa, com alteração do desempenho esportivo e/ou laboral específico, sem alterações das outras atividades da vida diária;
- Fase 5: dor mais intensa que na fase 4, com alteração das atividades esportivas e laborais, afetando as atividades da vida diária. Porém, não há aumento da dor para a realização de atividades diárias;

- Fase 6: dor constante que persiste durante o repouso, piora com as atividades simples, afetando muito as atividades domésticas;
- Fase 7: dor constante que atrapalha o sono e é intensificada com atividades leves.

### **1.8.7 Quadro clínico**

A dor da ELC é localizada no epicôndilo lateral do cotovelo. Porém, pode se estender a 0,5 cm de diâmetro do mesmo, podendo haver aumento de volume leve e alterações locais, como aumento de calor e vermelhidão, encontradas mais nas fases de inflamação aguda. No exame clínico, os testes mais utilizados são os testes de Mills que consiste na extensão do cotovelo com flexão forçada do punho e do teste de Cozen que é realizado com o cotovelo fletido em 90° e o paciente realiza extensão do punho contra a resistência da mão do examinador; em ambos os testes, a dor da ELC é reproduzida (Mota Filho, 2017).

### **1.8.8 Diagnóstico diferencial**

Os diagnósticos diferenciais da ELC são a Síndrome da compressão do túnel radial ou Síndrome do nervo interósseo posterior, afecção que apresenta também dor lateral no cotovelo, porém é mais sentida na massa muscular dos extensores. Na artrose radio-capitular a dor é na região lateral do cotovelo, intensificada com o movimento de pronação e supinação do antebraço e na cervico-braquialgia a dor é em toda a face lateral do braço, não se restringindo ao epicôndilo lateral (Nirschl, 2018).

### **1.8.9 Tratamento**

Não há um tratamento definido para a ELC (Ahmad *et al.*, 2013; Bishai *et al.*, 2016). A maior parte dos casos de ELC tem comportamento autolimitado, com melhora após 6 meses a um ano de tratamento conservador (Lai *et al.*, 2018).

Existe um grande número de opções terapêuticas, como fisioterapia, uso de órteses, drogas anti-inflamatórias, ondas de choque extracorpóreo (Buchbinder *et al.*, 2006), laser, (Dingemanse *et al.*, 2014), uso de radiofrequência percutânea (Lin *et al.*, 2011), acupuntura, toxina botulínica (Placzek *et al.*, 2007), injeções de corticosteróide (Wolf *et al.*, 2011), injeção de sangue autólogo (Krogh *et al.*, 2013; Kazemi *et al.*, 2010), PRP (Mishra *et al.*, 2006; Peerbooms *et al.*, 2010, Chiavaras *et al.*, 2014) e injeção de tenócitos autólogos (Wang *et al.*, 2015).

A falha do tratamento clínico representa a indicação mais comum de tratamento cirúrgico, que inclui métodos abertos ou artroscópicos. Porém, não há consenso sobre a melhor técnica cirúrgica (Dunn *et al.*, 2008).

- **Uso de corticosteroides**

De forma semelhante ao cortisol, seus análogos sintéticos exercem efeitos após ligação aos receptores de glicocorticoides (GR) presentes no citoplasma celular. O complexo hormônio-receptor se transloca para o núcleo, onde modifica a transcrição gênica diretamente, ligando-se aos elementos responsivos ao glicocorticoide (GRE), localizados na região promotora dos genes-alvo, ou indiretamente, interagindo com outros fatores de transcrição, tais como o *activator protein-1* (AP-1) e o fator pró-inflamatório NF-kB, impedindo que os mesmos tenham acesso aos seus sítios de ligação no ácido desoxirribonucleico (DNA). Por esse mecanismo de ação, ocorre redução ou supressão da transcrição de genes que codificam citocinas, mas não apresentam GRE em suas regiões promotoras. Além dos efeitos descritos

acima, conhecidos como mecanismos genômicos, os corticoides também exercem efeitos não genômicos, caracterizados por apresentarem rápido início de ação e não dependerem da transcrição gênica ou tradução de proteínas (Sherer *et al.*, 2014).

Dentre os efeitos não genômicos, está a interação direta dos esteroides lipofílicos com as membranas celulares, modificando suas propriedades físico-químicas e afetando a atividade de proteínas associadas às membranas. A estabilização da membrana dos lisossomos é um exemplo deste efeito. Desta forma, os corticosteroides são capazes de coordenar a transcrição de vários genes anti-inflamatórios e metabólicos (Lien *et al.*, 2013).

- **Triancinolona**

A triancinolona é um glicocorticoide sintético derivado do cortisol. Os primeiros relatos do uso de corticosteroides como agentes terapêuticos anti-inflamatórios foram feitos por Hench *et al.* (1949), para o tratamento da artrite. Hollander *et al.* (1951) descreveu pela primeira vez a possibilidade do uso de injeções intra-articulares de corticosteroides. No entanto, os corticosteroides apresentam efeitos colaterais significativos, pelo fato do cortisol, um hormônio natural, exercer seus efeitos por ligação a dois receptores: o receptor glicocorticoide e o receptor mineralocorticoide. O primeiro controla os efeitos anti-inflamatórios e metabólicos, enquanto o receptor mineralocorticoide controla o metabolismo da água e eletrólitos. Para reduzir estes efeitos mineralocorticoides, foram efetuadas alterações na estrutura do cortisol, adicionando-se um grupo fluoreto na posição alfa C9 e introduzindo uma dupla ligação entre C1 e C2, causando uma grande potencialização dos efeitos dos receptores glicocorticoides e diminuindo o efeito dos mineralocorticoides (Parente, 2001). À estrutura modificada do cortisol, 16-alfa-hidroxil-9-alfafluoroprednisolona foi dado

o nome de triancinolona (Zuckner *et al.*, 1958). Foram, ainda, realizadas modificações estruturais na triancinolona, adicionando-se grupos acetonídeos ao C-16 e C-17, aumentando a capacidade de dissolução em lipídeos (lipofilicidade) do medicamento, resultando em duas formas: triancinolona acetona e triancinolona hexacetona. A diferença entre elas é que a acetona é o metabólito ativo da hexacetona (Sherer *et al.*, 2014).

A injeção local de corticoide é o tratamento clássico para a ELC desde que injeções de hidrocortisona foram realizadas, tendo todos os pacientes apresentado melhora (Stein *et al.*, 1953). Nevelös *et al.* (1980) foram os primeiros a usar a triancinolona em infiltrações, avaliando 72 pacientes portadores de ELC, obtendo resultados satisfatórios em 82,2% dos casos. Binder e Hazleman (1983) revisaram os tratamentos de 125 pacientes com ELC, observando que somente 10% dos pacientes permaneceram sintomáticos por mais de 1 ano, com os melhores resultados nos pacientes que receberam injeções locais de corticoide. Krogh *et al.* (2013), em estudo sistemático de meta-análise, comparou a efetividade de vários tratamentos injetáveis para ELC avaliados por 17 estudos clínicos randomizados e concluiu que ensaios nos quais poderia se embasar sobre as recomendações de tratamento com terapias de injeção para ELC apresentavam escassez de evidências e eram parciais, refletindo a ausência de consenso no tratamento da ELC (Krogh *et al.*, 2013).

- **PRP**

O PRP é uma preparação de plasma autólogo enriquecido com uma concentração de plaquetas maior do que normalmente está contido no sangue total e seu uso terapêutico fundamenta-se no fato de que uma alta concentração de plaquetas seria capaz de fornecer e liberar quantidades supra fisiológicas de fatores essenciais de crescimento e citocinas, com estímulo regenerativo, levando à reparação dos tecidos. Os principais fatores de crescimento

liberados pelo PRP envolvidos na cicatrização são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento insulina-*like* (IGF-1) (Wu *et al.*, 2016). O efeito da quase totalidade destes fatores de crescimento é estimular a síntese de colágeno, a angiogênese e a quimiotaxia, porém estes últimos efeitos são sabidamente antagônicos ao resultado desejado no tratamento da ELC e demais afecções inflamatórias. Entretanto, seus defensores relatam que o efeito de uma injeção de PRP é capaz de manter o paciente sem os sintomas da ELC por até 12 meses, enquanto a injeção de corticosteroide apresenta o mesmo resultado em apenas 51% dos casos. O efeito mais duradouro do PRP seria devido à remodelação de um novo tendão, capaz de persistir e responder melhor aos traumas mecânicos (Wu *et al.*, 2016).

## **Justificativa para realização do estudo**

Do que aqui foi exposto a respeito da ELC depreende-se que ainda há pontos importantes que aguardam definição, tanto com relação a patogênese, como com relação ao tratamento desta importante afecção.

Devido aos vários fatores de risco presentes no ambiente do portador de ELC, testes *in vitro* poderiam auxiliar no entendimento da doença, assim como melhor definir o papel das drogas utilizadas no tratamento com aplicação diretamente sobre as células do tendão.

Desta forma, utilizando testes *in vitro* pretende-se comprovar se realmente o processo inflamatório está ausente na ELC, conforme sugerido pelos exames histológicos da lesão. Caso exista produção de citocinas inflamatórias pelas células derivadas da ELC, um quadro inflamatório poderia ocorrer mesmo sem a presença de células polimorfonucleares no local, esclarecendo a patogênese da afecção.

Outrossim, estudos *in vitro* poderão comparar a eficácia do tratamento tradicional utilizando corticosteroide com o tratamento com o uso do PRP.

Desta forma, justifica-se a realização deste estudo.

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo teve por objetivos:

- Avaliar o índice de produção basal das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  pelas células derivadas de ELC em cultivo celular, por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).
- Comparar o efeito anti-inflamatório da triancinolona e do PRP sobre a secreção das citocinas produzidas pelas células derivadas de ELC em cultivo celular.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Desenho do estudo**

Foi desenvolvido um estudo prospectivo, longitudinal, casualizado, envolvendo portadores de ELC, de Agosto de 2017 à Agosto de 2019, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

O protocolo da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina -UNESP (Parecer número 2.903.373) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido.

Foram incluídos indivíduos adultos, portadores de ELC diagnosticada pelo exame clínico e de imagem (radiografia simples e ultrassonografia).

Os critérios de exclusão foram a presença de outras doenças ortopédicas ou reumatológicas associadas e tratamento percutâneo ou cirúrgico para a ELC há menos de 6 meses.

O material de estudo foi obtido durante a realização de procedimento cirúrgico para tratamento da afecção. Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, seguindo técnica cirúrgica previamente padronizada, assim como o mesmo método de colheita de material para o estudo.

#### **3.2. Descrição da amostra**

As amostras foram obtidas de seis pacientes consecutivos, com média de idade de 44,8 anos (mínimo de 35 anos; máximo de 54 anos), distribuídos igualmente quanto ao sexo.

Todos os pacientes estavam nas fases 6 e 7, segundo os critérios de Nirschl (Nirschl, 1973).

### **3.3. Variáveis estudadas**

- Proliferação de células derivadas de ELC;
- Viabilidade das células derivadas de ELC expostas à diferentes concentrações de triancinolona acetinado, a fim de se estabelecer a faixa de concentração do corticosteroide que tenha atividade anti-inflamatória e não tenha efeito citotóxico;
- Cinética da produção das citocinas mais frequentemente envolvidas nos processos inflamatórios IL-6 e IL-8, pelas células de ELC expostas ao acetato de triancinolona em cinco concentrações (0.01, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu$ M) ou ao PRP. As avaliações foram feitas em cinco tempos para a triancinolona (6, 12, 18, 24 e 48 horas) e três tempos de estudo para o PRP (12, 24 e 48 horas);
- Efeito sobre a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  após o tratamento com 1, 10 e 100  $\mu$ M de acetato de triancinolona nos tempos 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas e ao PRP, nos tempos 48, 72 e 96 horas.

### **3.4. Método de coleta dos explantes de ELC**

#### **3.4.1. Técnica cirúrgica**

Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião, seguindo-se a técnica operatória de Nirschl, descrita a seguir:

- O paciente é posicionado em decúbito dorsal horizontal, sob anestesia geral ou bloqueio do plexo braquial.
- Esvaziamento sanguíneo do membro superior

- Um torniquete é posicionado no terço superior do braço usando faixa de *smarch*.
- Incisão da pele de cerca de 4 a 5 cm imediatamente anterior ao epicôndilo lateral.
- Excisão e afastamento do tecido subcutâneo e da fáscia superficial, localizando-se a interface entre o ERLC e a borda anterior da aponeurose extensora. Uma fenda palpável está presente nessa interface, pois a fáscia sobre o extensor longo é fina e a borda anterior da aponeurose é firme e espessa.
- Incisão entre o ERLC e a aponeurose do ECD, estendendo-se desde o epicôndilo lateral até imediatamente próximo à linha articular.
- O ERLC e a aponeurose do ECD são afastados, e imediatamente abaixo está a origem do extensor radial curto do carpo (ERCC). Nesse momento, já se identifica o tecido da epicondilite, que é um tecido de aparência grosseira, geralmente acinzentado, opaco, edemaciado e friável, podendo-se encontrar a origem do ERCD rompida. O tecido normal do tendão, por outro lado, é brilhante, firme e possui um tom levemente branco nacarado. O tecido doente, geralmente abrange toda a origem do extensor curto, podendo chegar até da aponeurose do ECD.
- A excisão de todo o tecido doente na origem do extensor curto é realizada em bloco, que tem a forma triangular, com a base distal ao epicôndilo lateral. O tamanho típico do tecido, em geral, é de 2X1 cm.
- Liberação de toda origem do tendão ERCC a partir do epicôndilo lateral e da borda anterior da aponeurose do ECD. Se a aponeurose do ECD estiver comprometida, todo o tecido doente também será removido, mas não o tendão normal. A liberação da aponeurose normal do ECD a partir do epicôndilo é desnecessária. Uma vez que o tecido doente é adequadamente ressecado, um defeito ficará presente na área anterior da origem do tendão do ERCC.

- Para a melhora do suprimento vascular, pequenos orifícios são perfurados na região do epicôndilo lateral, na área da inserção do ERCC. Fechamento do tendão do ERLC e da aponeurose do ECD com suturas absorvíveis de fio trançado 1.0 (Vicryl<sup>®</sup> 1.0, Ethicon, Somerville, Nova Jersey, EUA), deixando-se solta a origem do ERCC.
- Sutura do subcutâneo com fio absorvível trançado 2.0 (Vicryl<sup>®</sup> 2.0, Ethicon, Somerville, Nova Jersey, EUA), e da pele com fio inabsorvível mono filamento 4.0 (Mononylon<sup>®</sup> 4.0, Ethicon, Somerville, Nova Jersey, EUA) e curativo oclusivo.
- Em seguida, o torniquete é solto. Para evitar a formação de hematomas e fístulas, o membro superior deve ser imobilizado com uma tala gessada axilo-palmar, por duas semanas.

### **3.4.2 Coleta do material de estudo**

Os fragmentos do tecido da ELC foram removidos durante os procedimentos cirúrgicos e imediatamente acondicionados em tubos de 15mL de polipropileno com fundo cônico para centrifuga, estéreis, identificados e mantidos em contato com gelo, em caixa de isopor, sendo transportados em período inferior a três horas para o Laboratório de Epigenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP de Botucatu, para processamento.

## **3.5. Processamento do material de estudo**

### **3.5.1. Cultivo celular**

#### **- Cultivo celular primário**

Em condições estéreis, na capela de fluxo laminar, as amostras foram cortadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 1mm<sup>2</sup> com tesouras tipo *Westcott* estéreis. Estes explantes foram colocados em frascos de poliestireno estéreis de 25mm<sup>2</sup>/75 mL para cultivo de células, contendo 2ml de meio nutriente *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient*

*Mixture* F-12 (DMEM/F12), (LGC Biotecnologia, Brasil) enriquecido com 5 mL/L de vitaminas TC *Minimal Eagle* (Thermo Fisher, EUA), 0,01 U/ml de insulina recombinante humana NPH (Fundação Oswaldo Cruz, Brasil), 15 µg/mL de Glutathione (Thermo Fisher, EUA), 100 UI/mL de Penicilina, 40 µg/mL de Gentamicina, 2 µg/mL de Anfotericina-B (Thermo Fisher, EUA) e suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, Brasil). Os frascos com os explantes foram mantidos em incubadora a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, em atmosfera úmida.

A adição de meio DMEM/F12 com 20% de SFB foi feita a cada três dias, com acompanhamento e exames das culturas sob microscópio de inversão, para a observação da morfologia e comportamento celular (aderência, migração e proliferação) até que se obtivesse um número satisfatório de células em cultura, definido pela observação de células com alta atividade mitótica, em semi confluência, ocupando aproximadamente 2/3 da capacidade do frasco, quando então, prosseguiu-se com o subcultivo das culturas.

#### **- Subcultivo celular**

Para o subcultivo, os explantes e todo o meio nutritivo foram removidos do frasco com pipeta Pasteur. A seguir, o mesmo foi lavado com 1mL de tripsina 0,25% (Thermo Fisher, EUA) por duas vezes, sendo então adicionado mais 1mL de tripsina e o frasco foi mantido durante 3 a 5 minutos na incubadora à 37°C. O desprendimento celular foi verificado com o microscópio de inversão e a enzima inativada com a adição de 0,5mL de SFB, sendo realizada pipetagem cuidadosa por várias vezes, em varredura. Foi adicionado 5 mL de meio DMEM/F12 com 20% de SFB.

Esta suspensão celular foi, a seguir, dividida em duas partes iguais, deixando-se metade no mesmo frasco e outra metade em um novo frasco estéril de 25mm<sup>2</sup>. Ambos foram

colocados novamente na incubadora e o meio nutritivo foi acrescentado a cada três ou quatro dias, até atingirem a semi-confluência, quando, então, foram novamente subcultivados até a terceira passagem.

### **3.5.2 Processamento do PRP**

Durante o procedimento cirúrgico, foram coletados 8,5 mL de sangue periférico por punção de veia ante cubital dos portadores de ELC, em quatro tubos à vácuo contendo citrato de sódio como anticoagulante. Os tubos foram levados imediatamente ao Laboratório de Epigenética para seu processamento, acondicionados em *racks* em caixa de isopor, à temperatura ambiente.

Na capela de fluxo laminar, sob condições estéreis, o sangue anti coagulado foi transferido para um tubo de 15 mL e centrifugado a 1.100 rpm, durante 10 minutos, sem freio.

Foram coletados 40% do plasma sobrenadante usando pipeta Pasteur, com cuidado para não serem também aspirados os leucócitos que ficaram em suspensão sobre as hemácias. Este plasma coletado foi, então, transferido para outro tubo de 15 mL e centrifugado novamente a 1.050 rpm por 10 minutos sem freio, para o descarte do resto das células brancas e hemácias.

O plasma superior (40% do total) foi novamente aspirado e transferido para outro tubo de 15 mL e centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos sem freio, para enriquecê-lo com plaquetas e todo o plasma sobrenadante foi coletado em outro tubo de 15 mL. O *pellet* foi, então, ressuspensão com somente 700 µL de plasma coletado. O PRP obtido desta forma induz menor efeito inflamatório por ser pobre em leucócitos (Yan *et al.*, 2017).

O PRP foi, então, transferido para micro tubos e congelado à -80°C até seu uso.

### 3.6. Estratégia de estudo

#### **- Determinação das concentrações não citotóxicas de triancinolona pelo estudo da viabilidade celular**

Esta etapa teve por objetivo verificar quais são as concentrações que não causam diminuição excessiva da viabilidade celular, a fim de se estabelecer a faixa de concentração ideal de triancinolona a ser utilizada no estudo da produção de citocinas inflamatórias, uma vez que a dose anti-inflamatória é sempre inferior àquela que causa diminuição da viabilidade celular.

Foram estudadas cinco concentrações de acetato de triancinolona comercialmente disponível (Valdequímica, São Paulo, Brasil): 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  diluídas em meio nutritivo DMEM/F12 completo, além do controle sem triancinolona. Para cada concentração testada, com seus respectivos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96 horas, foram semeadas em triplicatas  $5 \times 10^3$  células/mL de ELC de terceira passagem em placas para cultivo celular com 96 poços. As placas foram mantidas por 24 horas em estufa umidificada à  $37^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , para permitir a aderência celular.

Transcorridos cada intervalo de tempo, o meio nutritivo com a triancinolona foi retirado e as células lavadas com *fosfate-buffered saline solution* (PBS) por três vezes, sendo acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de meio nutritivo com 20% de SFB em cada poço da placa de cultivo. As placas foram levadas novamente à estufa umidificada à  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  por mais 48 horas e, então, submetidas ao teste do MTT.

#### **- Teste do MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)**

O MTT é um composto que, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de amarelo para um composto roxo

(formazan) e a produção deste reflete o estado funcional da cadeia respiratória das células em estudo, ou seja, a capacidade citotóxica das drogas testadas.

Para a realização do teste de viabilidade pelo MTT, as células permaneceram incubadas por 48 horas após a retirada da triancinolona e adição de novo meio nutritivo, que foi então removido e adicionado em cada poço 200  $\mu$ L de solução de MTT (Sigma Aldrich, EUA) a 0,5 mg/mL diluída em meio DMEM/F12 completo. As células foram novamente incubadas com esta solução por 4 horas, a 37°C. A solução de MTT foi, então, removida e adicionados 200  $\mu$ L de *dimethyl sulfoxide* (DMSO) em cada poço, que foi pipetado várias vezes, a fim de se dissolverem os cristais de formazan formados e uma nova incubação foi realizada por mais 5 minutos a 37°C para se dissolverem as bolhas de ar que se formaram com a pipetagem. Finalmente, a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro (Titertek Multiskan, EUA) a 570nm, tendo como referência o comprimento de onda de 630 nm, para se obter o sinal da amostra ( $OD_{570}-OD_{630}$ ), levando em consideração que a densidade óptica está diretamente relacionada à quantidade de células viáveis.

Para a determinação da viabilidade celular, a transmitância encontrada na amostra foi dividida pela transmitância do controle no mesmo tempo de avaliação.

### **3.6.1. Padronização do tempo de exposição à triancinolona pelo estudo da cinética de produção das citocinas inflamatórias**

Esta fase do estudo teve por objetivo a determinação dos tempos de maior variação nos níveis de produção das citocinas inflamatórias. O estabelecimento da cinética das citocinas foi utilizado para comparar o efeito anti-inflamatório com o uso da triancinolona e PRP.

Tendo por base extensa revisão da literatura, foram identificadas as citocinas mais frequentemente investigadas quanto ao desenvolvimento e progressão de doenças tendinosas, durante a sua cicatrização ou em resposta ao exercício, sendo elas: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$  (Tsuzaki *et al.*, 2003, Thilo *et al.*, 2010).

Para este estudo preliminar com a finalidade de padronização dos tempos em que ocorrem as maiores variações nos níveis das citocinas, foram dosadas apenas IL-6 e IL-8, tendo em vista serem elas as citocinas mais comumente envolvidas em processos inflamatórios.

Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células de ELC de terceira passagem por poço em placas de cultivo com 96 poços, que foram mantidas por 24 horas em incubadora para permitir a aderência celular. O meio nutritivo que permaneceu em contato com as células, ou meio condicionado, foi coletado nos tempos: 0 (T<sub>0</sub>), 1(T<sub>1</sub>), 4(T<sub>2</sub>), 8(T<sub>3</sub>), 12(T<sub>4</sub>), 24(T<sub>5</sub>), 48(T<sub>6</sub>) e 72(T<sub>7</sub>) horas, em triplicatas, para ser analisado quanto à produção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). À medida que os meios sobrenadantes foram sendo retirados, foram mantidos à temperatura de 2°C e após a retirada do meio do último tempo (T<sub>7</sub>), foram todos transportados imediatamente ao Laboratório de Imunopatologia da relação Materno-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina - UNESP, para a determinação dos níveis das citocinas pró-inflamatórias.

As placas de poliestireno com 96 orifícios de alta afinidade (MaxSorp, Nunc, Life, USA) foram sensibilizadas por 18 horas a 4°C, em câmara úmida, com anticorpo de captura para: IL-6 e IL-8 (R&D Systems, DuoSet, USA) diluído em tampão PBS, pH 7,2. Após a incubação, foram realizadas três lavagens da placa com solução de PBS pH 7,2 contendo *Tween* 20 a 0,05% (PBS-T). Esse procedimento foi repetido em todas as etapas de lavagem até a fase anterior à adição do substrato. O bloqueio dos sítios livres da placa foi realizado

com solução de PBS-T, contendo leite desnatado (Molico-Nestlé, São Paulo, Brasil), na concentração de 5% (PBST-M), durante três horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem da placa, foram adicionados na primeira coluna 100mL das citocinas recombinantes humanas: IL-6 e IL-8, nas concentrações indicadas pelo fabricante para obtenção da curva padrão. Nos demais orifícios foram distribuídos 100mL dos sobrenadantes das culturas, em duplicata, com posterior incubação por quatro horas, à temperatura ambiente. Após esse período e lavagem, foram adicionados 100mL de anticorpo de detecção: IL-6 e IL-8. As placas foram mantidas por três horas à temperatura ambiente. Em seguida à lavagem, foram adicionados 100mL de *Streptoavidina* na diluição 1:200 em cada orifício da placa e a reação incubada por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após o procedimento de lavagem, foram adicionados 100mL do substrato constituído de 12,5mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e suas densidades ópticas avaliadas em leitor automático de ELISA (Titertek Multiskan, EUA), em comprimento de onda de 492nm. As concentrações das citocinas no líquido sobrenadante foram calculadas com 10 mg de *Ortofenilenodiamina* (Sigma, EUA) e a reação incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. A reação foi interrompida por adição de 50mL de solução de ácido sulfúrico 2N e foram obtidas as densidades com as diferentes citocinas recombinantes humanas IL-6 e IL-8. As concentrações de citocinas foram expressas em pg/mL e foram realizados ensaios para determinação da variabilidade *inter* e *intra-assay*.

### **3.7. Padronização das concentrações de triancinolona com efeito anti-inflamatório**

Após a determinação dos tempos em que os níveis das citocinas sofrem maiores alterações, foi realizado o estudo da produção das citocinas IL-6 e IL-8 pelas células da ELC após a exposição à várias concentrações de triancinolona determinadas como não citotóxicas, comparativamente ao PRP. Desta forma, as melhores concentrações de triancinolona a serem

estudadas foram selecionadas, escolhendo-se as que tivessem efeito anti-inflamatório sobre as células de ELC, para estudo de todas as demais citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ , além da IL-6 e IL-8.

Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células de ELC da terceira passagem, em placas de cultivo com 96 poços e mantidas por 24 horas em incubadora umidificada à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para permitir sua aderência.

O grupo triancinolona foi exposto em triplicatas à mesma nas concentrações pré-determinadas como não citotóxicas: 0.01, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu$ M e o grupo PRP, à 100  $\mu$ L do mesmo. O grupo controle foi exposto somente ao meio nutritivo completo. As culturas foram mantidas em incubadora umidificada à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, durante os tempos pré-determinados como sendo 6, 12, 18, 24 e 48 horas após a exposição nos grupos triancinolona e 12, 24 e 48 horas no grupo PRP.

Os meios nutritivos sobrenadantes que estavam em contato com as células durante cada tempo após a exposição à triancinolona, PRP e grupo controle foram coletados e analisados para a determinação da concentração das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 por meio do teste de ELISA, para a seleção das concentrações de triancinolona com efeito anti-inflamatório, a fim de serem posteriormente utilizadas no estudo da produção de todas as demais citocinas.

### **3.8. Estudo do efeito da triancinolona e PRP sobre a produção de citocinas**

A etapa anterior permitiu verificar que concentrações de triancinolona que levaram a diminuição efetiva da produção das citocinas foram: 1, 10 e 100  $\mu$ M. Desta forma, o estudo prosseguiu com a análise destas concentrações de triancinolona.

Como foi verificado que o PRP poderia levar a um efeito anti-inflamatório mais tardio, além das 48 horas previamente avaliadas, a dosagem das citocinas com o uso do PRP foi estendida até 96 horas. Assim, os tempos analisados passaram a ser: 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas, sendo que nos tempos 48, 72 e 96 horas, o efeito da triancinolona foi comparado ao tratamento com o PRP.

### **3.8. Análise estatística**

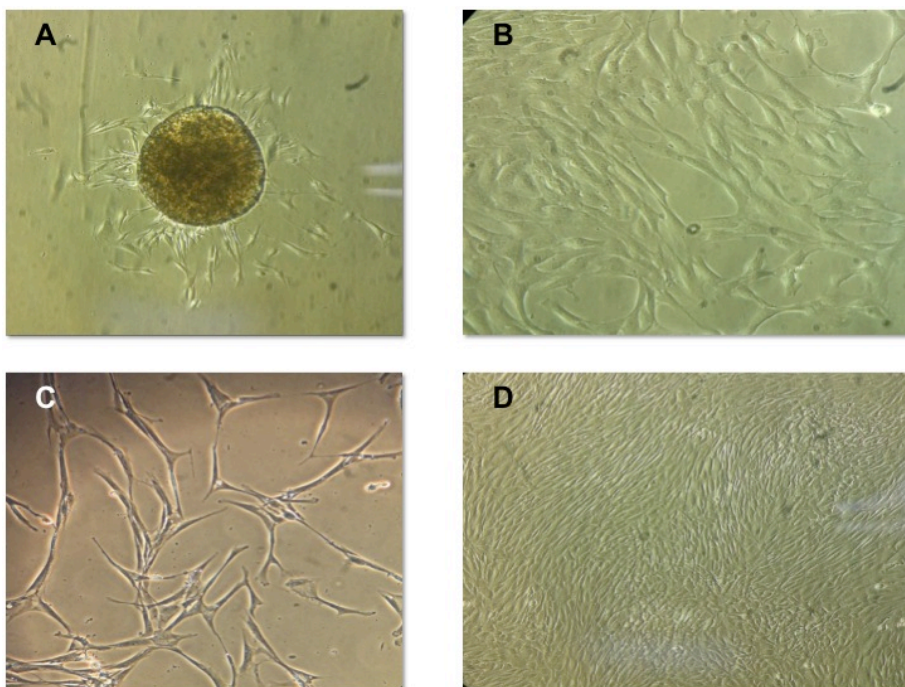
Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste de two-way ANOVA e do teste de múltiplas comparações de Sidak, com nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cultivo celular primário

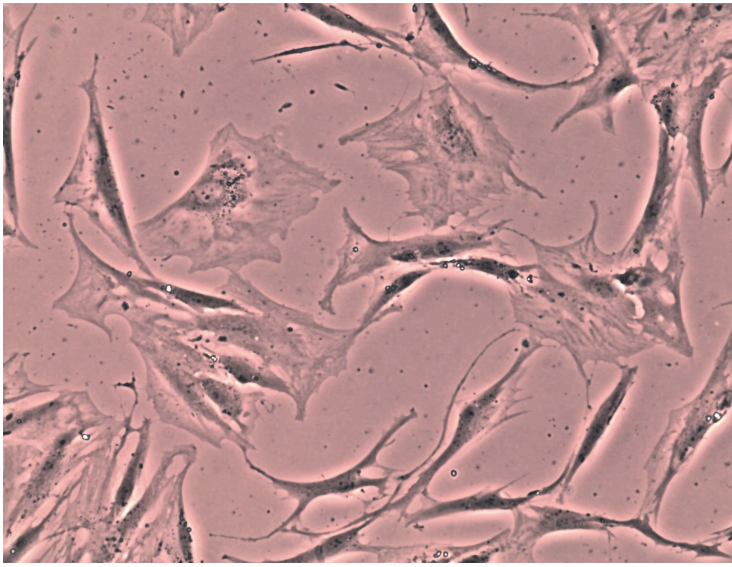
Após sete dias em cultivo, células fusiformes iniciaram sua migração à partir dos explantes (Fig. 5A), proliferando (Fig. 5B) e atingindo a confluência aproximadamente em 21 dias (Fig. 5C e 5D), quando puderam ser submetidas ao primeiro sub cultivo.

As células foram cultivadas até a terceira passagem sem perda de suas características fenotípicas, quando foram, então, submetidas aos ensaios do MTT e exposição à triancinolona e ao PRP.



**Figura 5** - (A) Células fusiformes migrando à partir do explante de epicondilite lateral do cotovelo (aumento de 10X); (B) e (C) Células em proliferação (aumento de 20X e 40X) e (D) células em confluência (aumento de 10X).

**Fonte:** material elaborado pelo autor



**Figura 6** - Detalhes da morfologia fusiforme das células em cultivo (aumento de 60X).

**Fonte:** material elaborado pelo autor.

#### **4.2. Teste de viabilidade do MTT**

O estudo da viabilidade celular após a exposição às seis concentrações de triancinolona (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100  $\mu\text{M}$ ) nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96 horas, demonstrou que houve significativo aumento da viabilidade celular ( $P=0,0040$ ) quando a triancinolona foi usada na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , no tempo de 72 horas (Fig. 7).

Houve tendência à diminuição da viabilidade celular quando usada a menor concentração de triancinolona, a de 0.001  $\mu\text{M}$ , em todos os tempos testados, sendo, portanto, excluída esta concentração dos estudos posteriores.

Assim, as concentrações de triancinolona estabelecidas para o estudo seguinte foram: 0.01, 0.1, 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ .

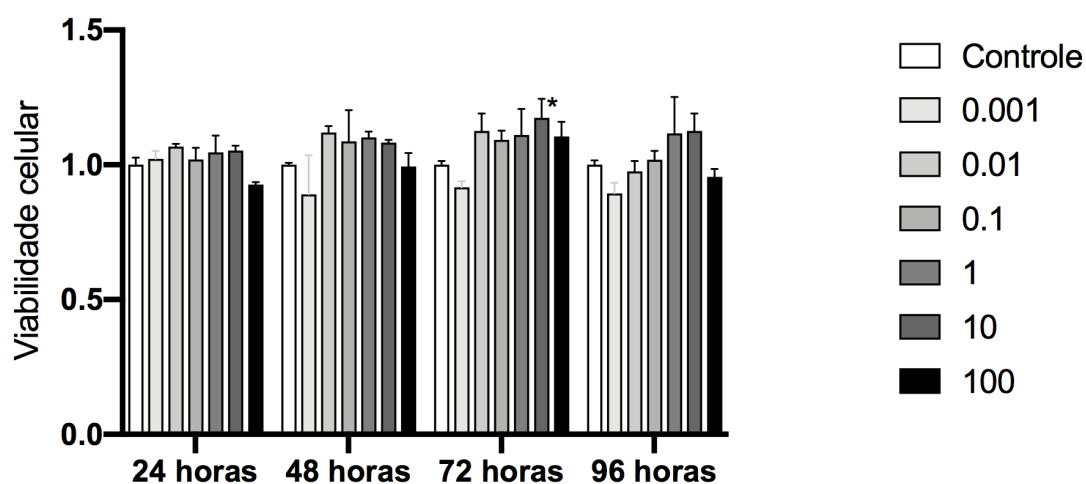


Figura 7 – Distribuição da viabilidade celular no ensaio do MMT, de acordo com as concentrações de triancinolona, nos quatro tempos de exposição.

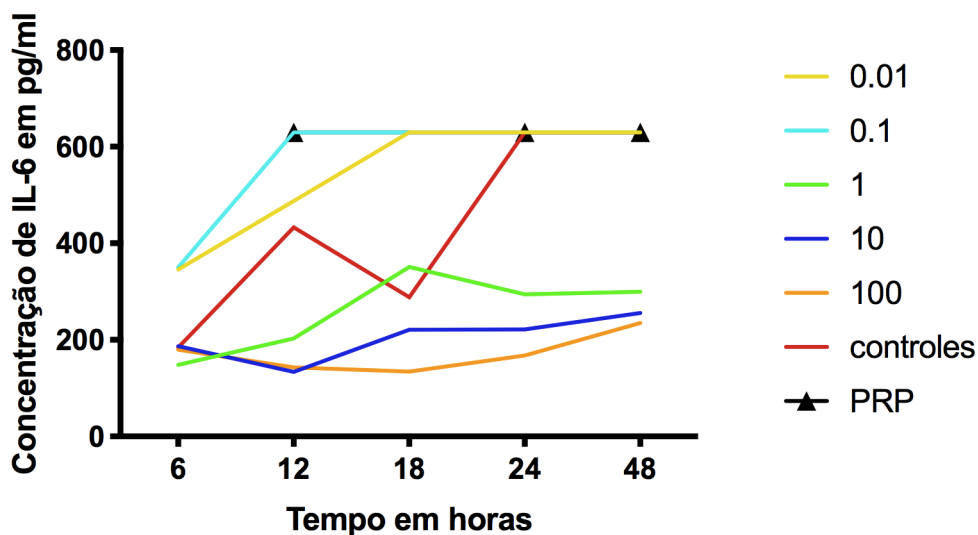
### 4.3. Cinética de produção das citocinas inflamatórias

Nesta etapa do estudo foram analisadas as concentrações de triancinolona determinadas previamente pelo ensaio de viabilidade do MTT, em tempos de exposição menores: 0(T<sub>0</sub>), 8(T<sub>1</sub>), 12(T<sub>2</sub>), 18(T<sub>3</sub>), 24(T<sub>4</sub>) e 48(T<sub>5</sub>) horas, em triplicatas, para o estudo da cinética de produção das citocinas IL-6 e IL-8 pelas células de ELC pelo método de ELISA.

#### 4.3.1. Cinética da produção de IL-6

A análise da cinética da produção de IL-6 pelas células da ELC expostas à triancinolona mostrou que, em concentrações mais baixas, de 0.01 e 0.1  $\mu\text{M}$ , houve produção de IL-6 maior que os controles. A partir de 24 horas de exposição, células expostas a triancinolona nestas duas menores concentrações e controles foram iguais (Fig. 8).

A adição de PRP às culturas de células de ELC demonstrou efeito similar às duas menores concentrações de triancinolona (0.01 e 0.1  $\mu\text{M}$ ) nas primeiras 6 horas, apresentando níveis de IL-6 maiores que os controles não tratados de 6 à 24 horas e, após este período de tempo, comportou-se similarmente aos controles (Fig. 8).



**Figura 8:** Cinética da produção de IL-6 pelas células de ELC após exposição à várias concentrações de triancinolona, PRP e controles.

A cinética da produção de IL-6 após exposição às diferentes concentrações de triancinolona em comparação aos controles, demonstrou efeito inibitório significativo na produção da IL-6 quando usada a concentração de 10  $\mu\text{M}$  ( $P=0.02$ ) e 100  $\mu\text{M}$  ( $P=0.008$ ) (Fig. 8).

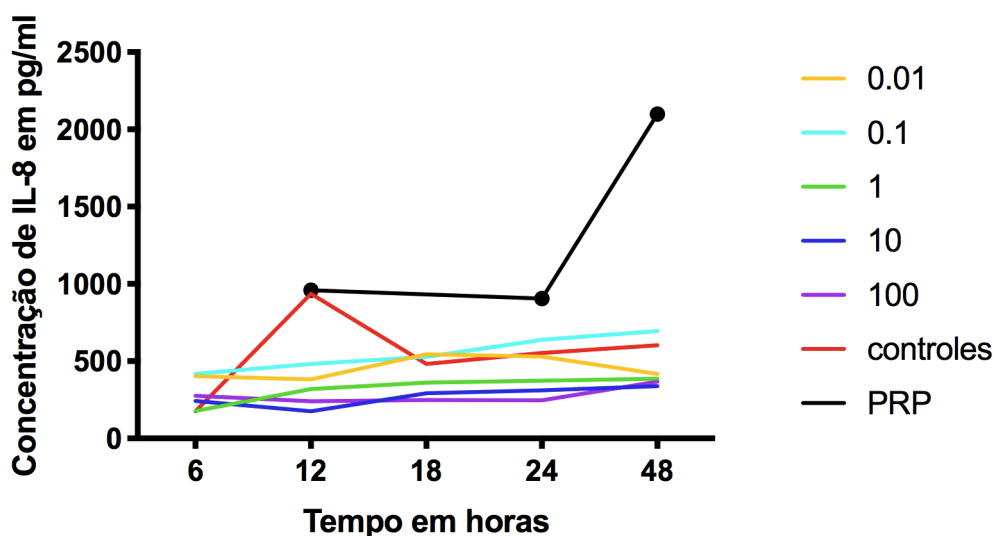
Quanto ao estudo comparativo entre triancinolona e PRP, as duas menores concentrações (0.01 e 0.1  $\mu\text{M}$ ) não apresentaram diferença na produção de IL-6. Porém, à partir da concentração de 1  $\mu\text{M}$ , a triancinolona mostrou significância na comparação da inibição da produção de IL-6 em relação ao PRP, com  $P=0,0074$  para 1  $\mu\text{M}$ ,  $P=0,0072$  para 10  $\mu\text{M}$  e  $P=0,0037$  para 100  $\mu\text{M}$  (Fig. 8).

#### 4.3.2. Cinética da produção de IL-8

A análise da cinética de produção de IL-8 mostrou que com o uso das duas menores concentrações de triancinolona (0.01 e 0,1  $\mu\text{M}$ ) os níveis de IL-8 foram maiores ou iguais aos controles não expostos (Fig. 9).

As concentrações de triancinolona de 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  diminuíram significativamente ( $P=0,02$ ) os níveis de IL-8 em comparação aos controles (Fig. 9).

Com a exposição ao PRP que se iniciou após 12 horas, os níveis de IL-8 mantiveram-se sempre superiores aos controles, porém sem significância estatística (Fig. 9).

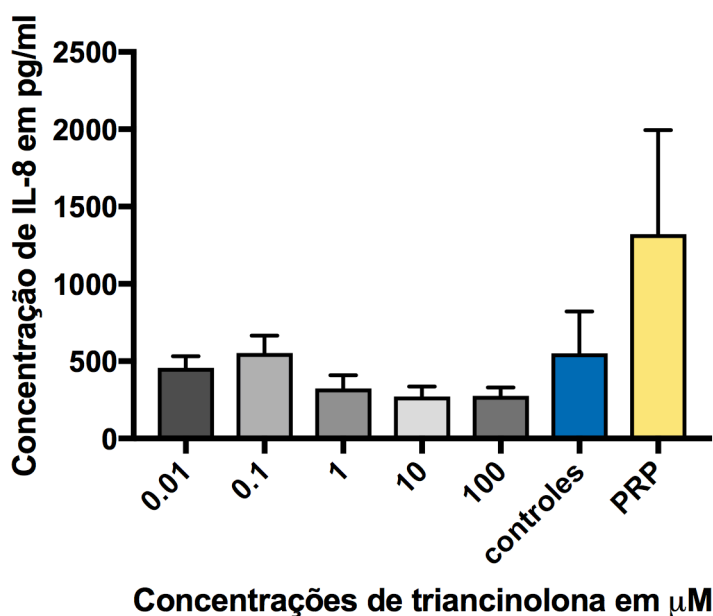


**Figura 9:** Cinética da produção de IL-8 pelas células de ELC após exposição à várias concentrações de triancinolona, PRP e controles.

A comparação dos níveis de IL-8 após o tratamento com PRP demonstrou uma elevação significativa de seus níveis para todas as concentrações de triancinolona, com  $P=0,005$ . (Fig. 9).

A adição de PRP às culturas de células de ELC demonstrou elevar os níveis de IL-8 igualmente aos controles nas 12 primeiras horas (Fig. 9), com manutenção da concentração em níveis superiores aos controles até as 24 horas, quando então observou-se um aumento

exponencial de até a média de 2.099,219 pg/mL pontualmente às 48 horas, porém sem significância estatística devido ao elevado desvio padrão do PRP, conforme demonstrado na Fig.10.



**Figura 10:** Produção de IL-8 pelas células de ELC no período de 6 a 48 horas após exposição à várias concentrações de triancinolona, PRP e controles.

#### 4.4. Estudo do efeito anti-inflamatório da triancinolona e PRP sobre a produção das citocinas IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$

Após a verificação das concentrações ideais a serem testadas, determinadas pelo melhor efeito anti-inflamatório observado nos experimentos prévios, foi realizado o experimento final, com a exposição das células de ELC à triancinolona nas concentrações 1, 10 e 100  $\mu$ M, com posterior comparação ao PRP e controles, nos tempos 6, 12, 18, 24, 48, 72 e 96 horas. O PRP foi estudado nos tempos 48, 72 e 96 horas.

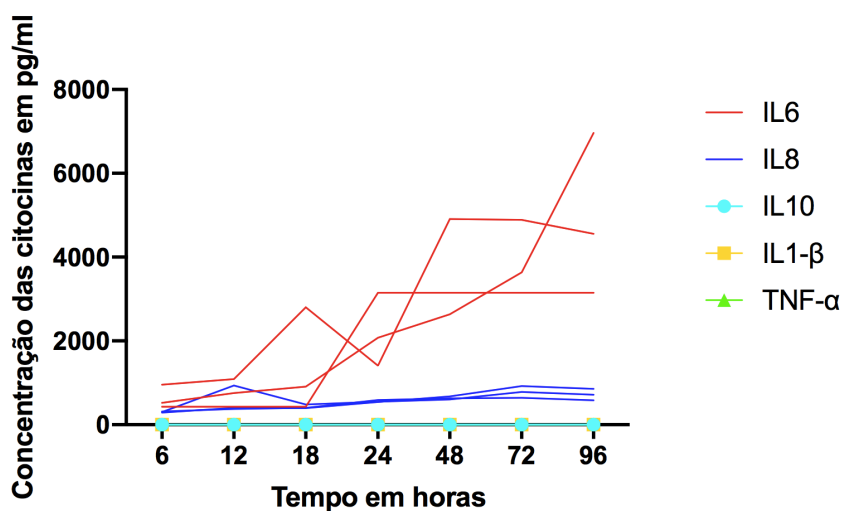
As culturas dos grupos controles que não foram expostos a nenhum dos tratamentos, apresentaram uma elevada produção de IL-6, que ascendeu rapidamente após 12 horas, sendo

necessária a diluição em até 1:25 para que o ensaio pudesse detectar valores mensuráveis de IL-6, atingindo a média de  $637,62 \pm 280,62$  a  $4.890,76 \pm 1.929,09$  pg/mL de 6 a 96 horas (Fig. 11).

A segunda citocina mais produzida pelas células de EPC foi a IL-8, com a média de  $303,32 \pm 15,15$  a  $719,87 \pm 139,67$  pg/mL de 6 a 96 horas de análise.

As demais citocinas foram produzidas em níveis bem inferiores, de  $0,041 \pm 0,07$  a  $1,19 \pm 1,58$  pg/mL para a IL-10;  $0,26 \pm 0,45$  a  $0,20 \pm 0,35$  pg/mL para a IL-1 $\beta$  e zero a  $0,81 \pm 1,20$  pg/mL para o TNF- $\alpha$  (Fig. 11).

### Produção de citocinas pelos controles

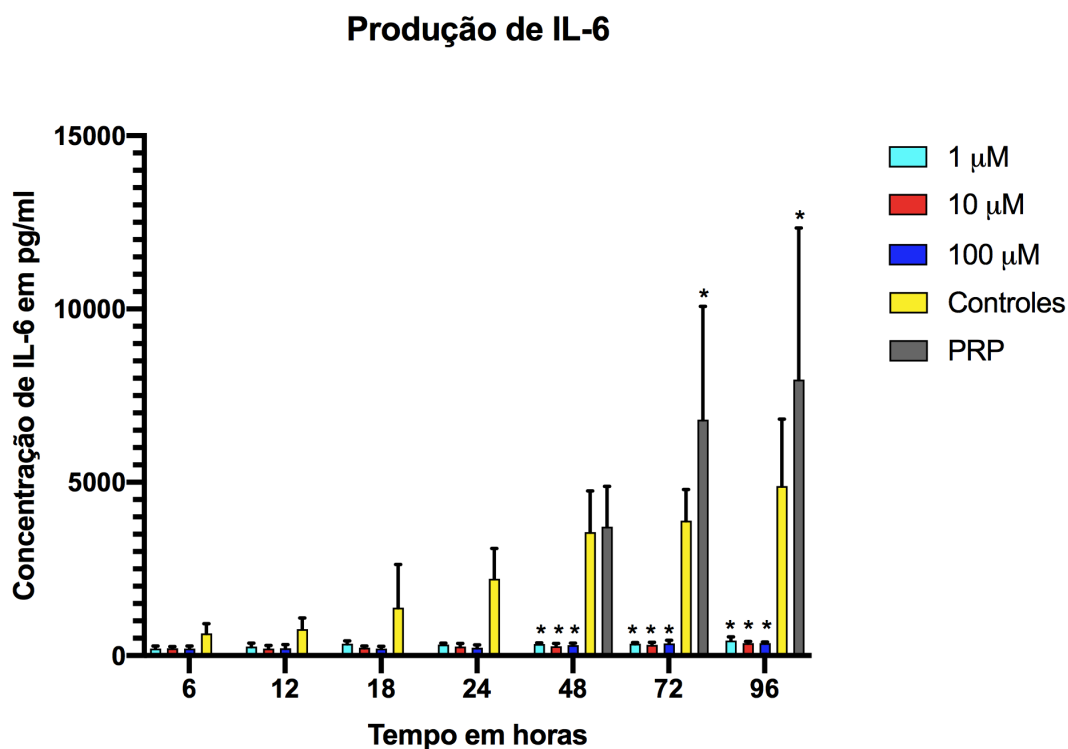


**Figura 11:** Níveis das citocinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  produzidas pelas células de ELC em cultivo relativas aos grupos controles.

Com o uso da triancinolona, para as três concentrações estudadas, houve uma diminuição significativa na produção de IL-6 pelas células de ELC nos três últimos tempos de estudo, ou seja, 48, 72 e 96 horas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 12) quando comparada aos controles. Se

comparados ao uso do PRP, os níveis de IL-6 foram significativamente menores com o uso da triancinolona em todas as concentrações, nos tempos 72 e 96 horas ( $P < 0,05$ ).

Quando analisada a produção de IL-6 pelo grupo PRP comparativamente aos controles, verificou-se que as culturas expostas ao PRP produziram IL-6 em níveis significativamente superiores aos controles nos tempos 72 e 96 horas ( $P < 0,05$ ) (Fig. 12).



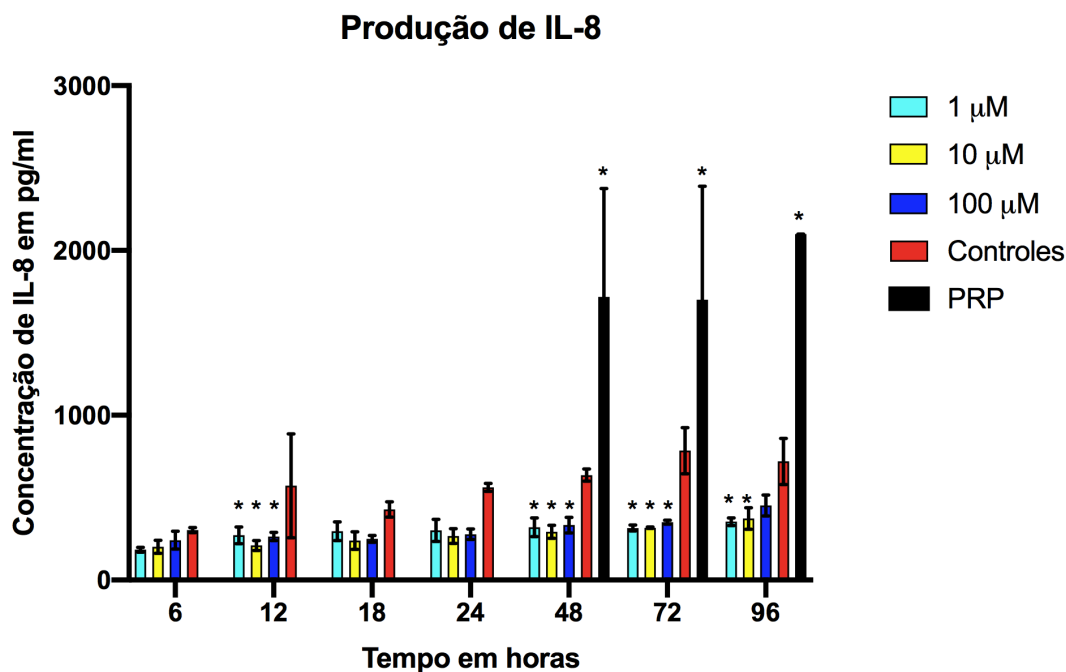
**Figura 12** - Níveis de IL-6 produzidos pelas células de ELC expostas à 1, 10 e 100μM de triancinolona, ao PRP e controles não expostos ( $*P < 0,05$ ).

Quanto à produção de IL-8, houve uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) com o uso da triancinolona em comparação aos controles nos tempos 12, 48, 72 e 96 horas para todas as concentrações estudadas (Fig. 13).

Quando comparada ao PRP, a produção de IL-8 pelas culturas expostas à triancinolona foi significativamente menor ( $P < 0,05$ ) que o grupo PRP, para todas as

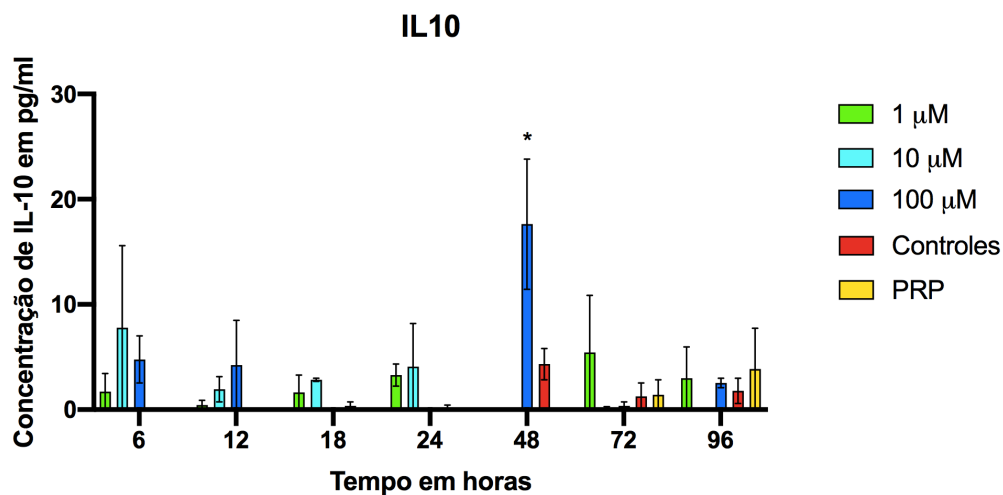
concentrações testadas, em todos os tempos determinados para o estudo (48, 72 e 96 horas) (Fig. 13).

A produção de IL-8 pelas culturas tratadas com o PRP foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ) que o grupo controle, em todos tempos estudados (48, 72 e 96 horas).



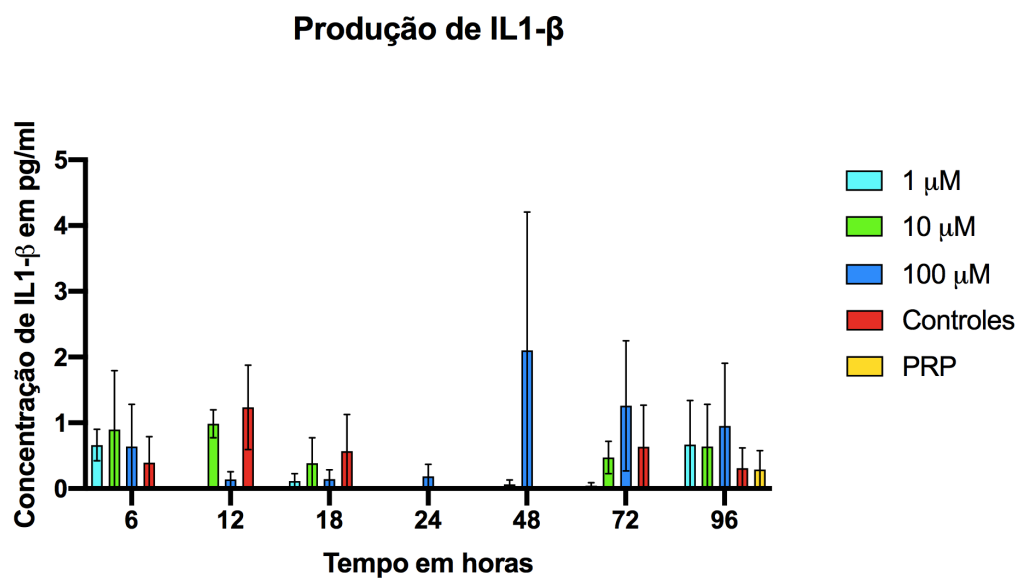
**Figura 13** - Níveis de IL-8 produzidos pelas células de ELC expostas à 1, 10 e 100 μM de triancinolona, ao PRP e controles não expostos ( $*P < 0,05$ ).

A produção de IL-10, apresentou aumento pontual significativo ( $P = 0,02$ ) com a concentração de 100 μM no tempo 48 horas, em comparação com os controles não expostos (Fig. 14).



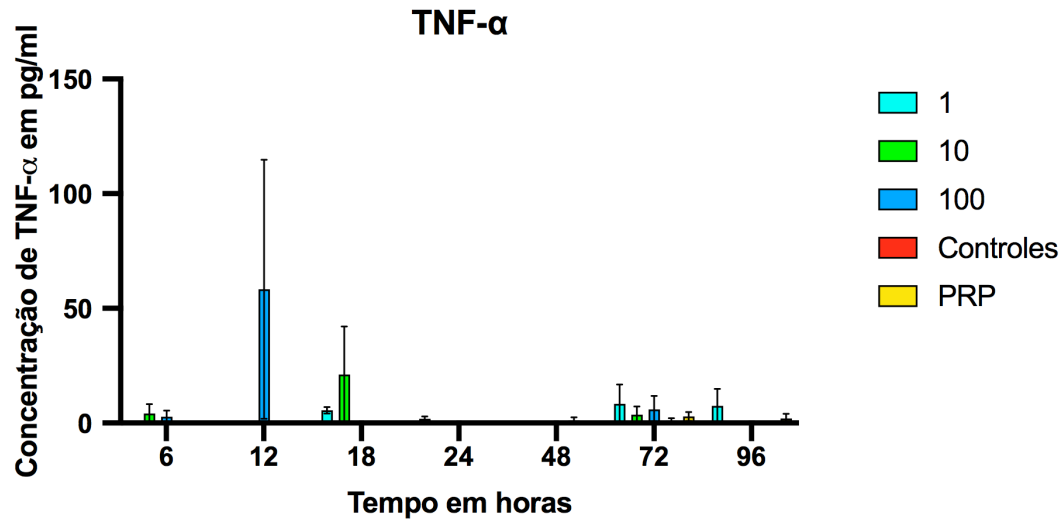
**Figura 14:** Níveis de IL-10 produzidos pelas células de ELC expostas à 1, 10 e 100μM de triancinolona, ao PRP e controles expostos (\*P=0,02).

A IL1-β apresentou um aumento pontual, porém não significativo, devido ao alto desvio padrão, também com a concentração de 100 μM no tempo 48 horas, em comparação aos controles (Fig. 15).



**Figura 15:** Níveis de IL1-β produzidos pelas células de ELC expostas à 1, 10 e 100μM de triancinolona, ao PRP e controles não expostos.

A citocina TNF- $\alpha$  foi produzida em baixos níveis e não apresentou alterações significativas em relação aos controles não expostos quando as culturas foram tratadas com triancinolona ou PRP (Fig. 16).



**Figura 16:** Níveis de TNF- $\alpha$  produzidos pelas células de ELC expostas à 1, 10 e 100 $\mu$ M de triancinolona, ao PRP e controles não expostos.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo foi realizado visando esclarecer pontos da etiopatogenia e resultados de tratamentos aplicados na prática clínica da ELC. Utilizando testes *in vitro* foi possível observar que células cultivadas a partir de explantes de ELC produzem as citocinas IL-6 e IL-8. Este estudo foi o primeiro a verificar que as células de ELC secretam IL-6 e IL-8 em altos níveis, o que, possivelmente, pode estar relacionado ao desenvolvimento e progressão desta afecção. Quando estas células foram expostas a triancinolona houve uma redução significativa na produção destas citocinas em comparação aos controles e ao PRP. O PRP aumentou significativamente os níveis de IL-6 e IL-8, em todos os tempos de exposição.

Além de estabelecer as bases do cultivo celular de células da ELC, a maior contribuição deste estudo consiste na demonstração da secreção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 pelas células da ELC, comprovando a natureza inflamatória desta afecção.

### 5.1. Considerações à respeito da metodologia aplicada

#### 5.1.1. Delineamento da amostra

A escolha dos rígidos critérios de inclusão, excluindo indivíduos com outras doenças ortopédicas ou reumatológicas associadas a tratamento percutâneo ou cirúrgico para a ELC, com *wash-out* de pelo menos seis meses, limitou muito a possibilidade de inclusão de pacientes no estudo. Porém, garantiu a segurança de que as células em cultivo fossem representativas da ELC, sem possibilidade de serem células modificadas pela manipulação previa da lesão.

### **5.1.2. Cultivo celular**

Embora estudos *in vitro* possam não reproduzir totalmente as condições naturais dos eventos a serem avaliados, as duas maiores vantagens de um estudo usando cultivo de células são o controle estrito dos agentes externos ambientais e a homogeneidade das amostras. O controle ambiental nos permite eliminar fatores extrínsecos capazes de influenciar os resultados do tratamento, como a volta ao ambiente de trabalho com a realização dos movimentos de estresse ao tendão, dependentes da atividade profissional do portador.

Quanto à homogeneidade das amostras, o cultivo permite que as células sofram uma seleção natural para o estabelecimento das linhagens, uma vez que os tipos celulares mais vigorosos e agressivos serão as células iniciais que irão aderir, migrar e proliferar para a linhagem em estudo.

Uma outra vantagem do uso do cultivo celular está relacionada à possibilidade do isolamento de substâncias produzidas somente pela célula em estudo, assim como avaliar a influência de tratamentos específicos sobre a proliferação celular.

Portanto, no caso da ELC, o uso do cultivo de células é muito adequado, uma vez que elimina fatores extrínsecos e permite avaliar se as células desta lesão são capazes de produzir citocinas inflamatórias, visto que há uma grande discordância quanto à origem desta lesão, o que motivou até mudanças de nomenclatura de “epicondilite” para “tendinose” (Nirschl & Pettrone, 1979, Kraushaar & Nirschl, 1999 ). Assim, o presente estudo pode trazer novas luzes para o conhecimento da real natureza desta afecção.

### **5.1.3. Tratamentos estudados**

O tratamento clássico para a ELC sempre foi o esteroide intralesional. Estudos citados no capítulo introdutório apontam elevados índices de cura (Stein *et al.* 1953; Nevelös, 1980; Binder & Hazleman, 1983) com o uso dos esteroides, que apresentam as vantagens de ter baixo custo, fácil aquisição comercial e, como a aplicação é intralesional, praticamente não há efeitos colaterais, a não ser os riscos inerentes à injeção, que são os mesmos que existem também para o PRP.

Optou-se pelo estudo da triancinolona acetinado, ao invés do hexacetonido, uma vez que o acetinado é o metabólito ativo do hexacetonido (Sun *et al.*, 2018), além de haver maior número de publicações a respeito do acetinado. No entanto, quando aplicados clinicamente, não foram verificadas diferenças entre ambos (Silvinato & Bernardo, 2017).

O PRP é um tratamento relativamente recente, que vem despertando grande interesse na Ortopedia, sendo relatados elevados índices de cura (Peerboons *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2019). No entanto, o seu comportamento é diferente dos corticoides, nos quais os resultados são imediatos com uma tendência de piora com o passar dos meses (Gupta *et al.*, 2019). Estudos mostram que os melhores resultados com o uso do PRP são obtidos após o sexto mês da aplicação (Peerboons *et al.*, 2010; Lebiezinski *et al.*, 2015, Gupta *et al.*, 2019). Apresenta a desvantagem do custo elevado devido ao processamento, para o qual há necessidade de centrífuga e freezer -80°C para armazenamento, caso não seja usado de imediato (Greening *et al.*, 2017).

Desta forma, o presente estudo teve a intenção de comparar o tratamento tradicional, baseado nos corticosteroides, com o mais moderno, utilizando o PRP.

## **5.2. Análise dos resultados**

### **5.2.1. Estudo da viabilidade celular**

Inicialmente foi realizado um estudo para verificar as concentrações seguras da triancinolona que não comprometessem a viabilidade celular, com o intuito de realizar os testes sem risco de citotoxicidade. Esta medida se faz necessária, tendo em vista que as concentrações utilizadas *in vivo* não podem ser extrapoladas para os testes *in vitro*, pois as células em cultivo não apresentam o *wash-out* que os tecidos dos organismos possuem para o *clearance* das substâncias utilizadas para os tratamentos.

As concentrações escolhidas foram baseadas na literatura. No entanto, há apenas um estudo com o uso da triancinolona que avaliou a viabilidade de células originárias de ELC (Han *et al.*, 2012). Todos os demais, foram realizados com o uso de tenócitos saudáveis (Wong *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2014).

Observou-se aumento significativo da viabilidade celular ( $P=0,0040$ ) com o uso da triancinolona na concentração de 10  $\mu\text{M}$  no tempo de 72 horas. Isto pode ser explicado pela diminuição da viabilidade dos controles neste tempo de avaliação, uma vez que a viabilidade é expressa pela transmitância da amostra, dividida pela transmitância do controle e, diminuindo-se o valor dos controles, conseqüentemente haverá um aumento da viabilidade.

Os dados deste estudo demonstram também uma tendência à diminuição da viabilidade celular quando usada a menor concentração testada (0.001  $\mu\text{M}$ ), em todos os tempos. Desta forma, esta concentração foi excluída nos passos posteriores do estudo. Este achado pode ser explicado pelo efeito catabólico dos glicocorticoides, aumentando a disponibilidade de substratos para oxidação mitocondrial a partir de glicose, aminoácidos e ácidos graxos que, em concentrações específicas, permitiriam às células uma resposta adaptativa rápida à situações de estresse. Concentrações muito baixas não teriam este efeito (MacFarlane *et al.*, 2008).

Esta fase de estudo da viabilidade para o estabelecimento das concentrações não citotóxicas de triancinolona é extremamente importante pois a diminuição do número de células viáveis decorrente de concentração excessiva da droga testada, levará à redução das citocinas produzidas, não pelo efeito anti-inflamatório, mas por ausência de células viáveis para produzi-las, podendo acarretar uma interpretação errônea sobre a produção real de citocinas.

### **5.2.2. Cinética de produção das citocinas sob efeito da triancinolona e do PRP**

Foi realizado o estudo da produção das citocinas IL-6 e IL-8 por ELISA em tempos de exposição curtos (a cada 4 horas), uma vez que estas são produzidas prontamente em resposta à estímulos de estresse físico ou químico às células.

A cinética da produção de citocinas pelas células da ELC expostas à triancinolona, demonstrou que as menores concentrações, de 0.01 e 0.1  $\mu\text{M}$  levaram a uma produção de IL-6 e IL-8 maiores que os controles. Portanto, por não apresentarem nenhum efeito anti-inflamatório, estas concentrações foram excluídas dos experimentos posteriores, por serem concentrações insuficientes para exercer efeito anti-inflamatório.

Desta forma os experimentos finais foram realizados com triancinolona nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ , que apresentaram efeito inibitório significativo sobre a produção de IL-6.

Os resultados do efeito da triancinolona sobre a produção de IL-8 foram similares aos da IL-6, com diminuição significativa em sua produção com as concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$ .

O PRP foi estudado nos tempos 12, 24 e 48 horas, tendo sido verificado que a partir de 12 horas o tratamento com PRP levou a um aumento progressivo da produção de IL-6 e

IL8 até a última medida feita às 48 horas. Assim, nos estudos posteriores foi realizada a avaliação do PRP a partir de 48 horas, nos tempos de 48, 72 e 96 horas, a fim de se analisar o a produção das citocinas nestes intervalos de tempos mais tardios.

### **5.2.3. Estudo do efeito da triancinolona e PRP sobre a produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8**

- **Produção de citocinas pelos grupos controles**

Os controles, com culturas de células provenientes de ELC não expostas aos tratamentos, permitiram demonstrar que as células de ELC mesmo sem nenhum estímulo, são capazes de produzir IL-6 em níveis crescentes, atingindo valores muito elevados a partir de 12 horas. A IL-8 também foi produzida pelas células do grupo controle durante todo o estudo, porém em níveis inferiores aos observados com a IL-6.

Os achados revelados pelo grupo controle nos permitem afirmar que a ELC é uma afecção inflamatória, pois as suas células, isoladas em cultivo, produziram IL-6 e IL-8, sem que houvesse qualquer estímulo externo de outra citocina.

A citocina IL-10 foi produzida em níveis baixos, porém com o uso da triancinolona a 100  $\mu$ M, no tempo 48 horas, houve aumento significativo em comparação com os controles. A produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelas células dos controles foi muito baixa, sem alterações significativas também quando as culturas foram tratadas com triancinolona ou PRP.

Estes resultados apontam que apenas as citocinas IL-10, IL-6, IL-8 merecem atenção no tocante a ELC e serão apenas elas objeto de discussão.

- **Produção de IL-10**

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, que apresentou aumento significativo de seus níveis com o uso da triancinolona, no tempo 48 horas e com a concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

A IL-10 tem efeito protetor, inibindo a liberação de outras citocinas inflamatórias (Fiorentino *et al.*, 1991), além de ação anti-apoptótica (Sabat *et al.*, 2010).

O papel da IL-10 foi demonstrado, principalmente nas células imunes (Reitano *et al.*, 1994; Bissonnette *et al.*, 2004), nestas células, a IL-10 inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL-8, porém nas tendinopatias a regulação das citocinas inflamatórias pela IL-10 ainda não foi completamente elucidada. No estudo de John *et al.* (2010), os autores demonstraram que tenócitos saudáveis foram capazes de sintetizar IL-10 significativamente, ao serem ativados com as citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, sendo que esta produção não foi encontrada nos tenócitos não estimulados por estas citocinas.

Em nosso estudo, concomitantemente à este aumento pontual de IL-10, houve também um aumento de IL1- $\beta$  no mesmo tempo 48 horas, o que justifica a elevação de IL-10 e demonstra seu papel anti-inflamatório, uma vez que esta é uma citocina regulatória da intensidade da inflamação, produzida a fim de controlar os níveis de IL1- $\beta$  que estavam se elevando também no tempo 48 horas. À partir deste pico de IL-10, os níveis de IL1- $\beta$  foram progressivamente regredindo até o último tempo de estudo, pelo provável efeito da IL-10, que mesmo em pequenas concentrações, apresenta potente efeito anti-inflamatório sobre a produção de IL1- $\beta$ . Apesar do aumento de IL1- $\beta$  não ter apresentado significância estatística, esta elevação foi capaz de estimular a produção de IL-10 pelas células de ELC.

Os glicocorticoides são capazes de induzir a diferenciação de um subtipo específico de macrófago ativado chamado macrófago regulador, que tem atividade anti-inflamatória,

sendo capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF, além estimular a produção de IL-10 (Scheinman *et al.*, 1995; Siebelt *et al.*, 2015). Portanto, pode ser este o motivo da elevação de IL-10 somente ter ocorrido quando usada a maior concentração de triancinolona, de 100  $\mu$ M. Estudos posteriores serão necessários para o melhor entendimento do envolvimento da IL-10 no efeito anti-inflamatório da triancinolona sobre as células de ELC. Entretanto, foi possível demonstrar que a IL-10 pode ser produzida não somente pelos macrófagos reguladores, que não estavam presentes nas culturas, mas pelas próprias células da lesão.

O PRP durante todo o tempo do estudo não influenciou a produção de IL-10, não demonstrando efeito anti-inflamatório por esta via.

- **Produção de IL-6**

O presente estudo foi o primeiro a verificar que as células de ELC secretam a IL-6 em altos níveis, o que possivelmente pode estar relacionado ao desenvolvimento e progressão desta afecção. A IL-6 foi descoberta em 1986, sendo descrita como um fator de diferenciação de células B, capaz de diferenciar células B ativadas em células produtoras de imunoglobulinas (Hirano *et al.*, 1986). Hoje sabe-se que a IL-6 pode ser produzida por vários tipos celulares, como células-T, células-B, monócitos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, mesangiais, adipócitos, algumas células tumorais e também pelos tenócitos (Tsuzaki *et al.*, 2003).

No presente estudo foi possível verificar que a triancinolona, nas três concentrações estudadas, quando comparada aos controles, foi capaz de reduzir significativamente ( $P < 0,05$ ) a produção de IL-6 nos tempos 48, 72 e 96 horas e o PRP apresentou efeito contrário, pró-

inflamatório, levando a uma maior produção de IL-6 em relação a todos os grupos tratados com a triancinolona e em relação aos controles.

A IL-6 é uma citocina capaz de influenciar vários tipos celulares e tem múltiplas ações biológicas, por meio de seu sistema de receptores único. Geralmente atua como citocina pró-inflamatória, envolvida na regulação positiva das reações inflamatórias e no processo de dor patológica, mas apresenta a peculiaridade de ser capaz de agir também como uma citocina anti-inflamatória, dependendo da circunstância, através da ativação de seus receptores solúveis. A produção elevada de IL-6 está envolvida na patogênese de doenças auto-imunes e inflamatórias, sendo que o bloqueio de seus receptores pelo anticorpo monoclonal anti-IL-6 (Tocilizumab) tem comprovada melhora dos sintomas da artrite reumatóide, doença de Castleman e artrite reumatóide juvenil idiopática (Mihara *et al.*, 2005).

O singular mecanismo de ligação com seus receptores é chamado trans-sinalização. Resumidamente, ocorre da seguinte forma: a IL-6 se liga a um receptor nas células alvo, denominado IL-6R. O complexo de IL-6 e IL-6R se associa a uma segunda proteína, a gp130, que então, dimeriza e inicia a sinalização intracelular. Porém, enquanto a gp130 é expressa em todas as células, a IL-6R está presente apenas em poucas células do corpo, como hepatócitos e alguns leucócitos. As células que não expressam IL-6R não podem responder à citocina, uma vez que a gp130 sozinha não possui afinidade pela IL-6. Mas existe uma forma solúvel de receptor de IL-6, (sIL-6R) que contém a porção extracelular do receptor e pode se ligar a IL-6 com a mesma afinidade do receptor IL-6R ligado à membrana. O complexo de IL-6 e sIL-6R pode então se ligar à gp130 em células que não expressam a IL-6R e que não responderiam à IL-6. Existem evidências de que a sinalização trans de IL-6 é pró-inflamatória, enquanto a sinalização clássica de IL-6, via IL-6R ligada à membrana, está relacionada à atividades regenerativas ou anti-inflamatórias da citocina (Rose-John *et al.*, 2012). Uma vez

demonstrada a produção de IL-6, estudos futuros poderão ser realizados para a detecção do receptor solúvel, verificando se a IL-6 tem função anti-inflamatória ou pró-inflamatória na patogenia da ELC.

Os principais efeitos da IL-6 são: produção de resposta inflamatória de fase aguda, aumento da angiogênese, migração de neutrófilos, ativação da resposta imune, remodelamento ósseo tendo efeito patogênico na absorção óssea anormal na artrite reumatóide, mieloma múltiplo e outras doenças caracterizadas pela excessiva gênese de osteoclastos e lesões líticas ósseas, inibição da condrogênese pela redução dos níveis de IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) circulante, tem papel importante em alguns tipos de câncer, sendo um índice de pobre prognóstico, relacionado à maior indiferenciação e disseminação de metástases (Mihara *et al.*, 2012).

O único estudo *in vitro* sobre o papel de citocinas inflamatórias na ELC é o de Han *et al.* (2012), no qual foi verificada a produção de IL-1 $\alpha$  e do neuropeptídeo relacionado ao gene da calcitonina, não sendo investigada a IL-6 e a IL-8. Porém, vários autores (Nakama *et al.*, 2006; Skutek *et al.*, 2001; Schulze-Tanzil *et al.*, 2011) relatam que a IL-6 contribui para o desenvolvimento da doença do tendão, sendo a única citocina envolvida na tendinopatia em humanos, uma vez que a maioria dos estudos utilizando modelos experimentais animais encontraram elevação dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Morita *et al.*, 2017). A administração de IL-6 em culturas de tenócitos saudáveis não mostrou nenhum efeito sobre a expressão de citocinas; porém, a via de trans-sinalização ainda era desconhecida na época, o que pode ser o motivo da ausência de resposta, pois as células eram tenócitos de tendões saudáveis (Thilo *et al.*, 2010).

- **Produção de IL-8**

Assim como verificado com a IL-6, o presente estudo demonstrou que as células de ELC secretam também IL-8, duas citocinas com comprovado envolvimento inflamatório nas tendinopatias (Thilo *et al.*, 2010).

O uso da triancinolona nas três concentrações estudadas, levou a uma redução significativa dos níveis de IL-8 quando comparada aos controles, nos tempos 12, 48, 72 e 96 horas ( $P < 0,05$ ), similar ao ocorrido com a IL-6.

Contrariamente, o PRP causou uma elevação significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de IL-8 em relação a todas as concentrações de triancinolona e aos controles, confirmando o seu efeito pró-inflamatório também com esta citocina.

Desta forma, pode-se afirmar que a triancinolona é efetiva e superior ao PRP na diminuição da inflamação nestas concentrações, nas primeiras 96 horas após o tratamento.

A IL-8 foi originalmente reconhecida como um ativador de neutrófilos, com base em seus dois efeitos *in vitro*, a quimiotaxia e a liberação de enzimas granulares, sendo responsável pelo recrutamento e ativação de neutrófilos e granulócitos para o sítio da inflamação (Baggiolini & Clark-Lewis, 1992).

No estado fisiológico, a IL-8 é praticamente indetectável, mas pode aumentar rapidamente quando induzida por citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1. Assim como a IL-6, a IL-8 é uma citocina pró-inflamatória com um papel importante na cartilagem e danos ósseos, atuando como uma quimiocina potente, com função chave na promoção da inflamação mediada por neutrófilos e destruição da cartilagem.

Essas duas citocinas apresentam uma tendência específica e similar em resposta aos eventos articulares. Bigoni *et al.* (2016) verificaram que, imediatamente após a ruptura do

ligamento cruzado anterior (LCA), há aumento significativo dos níveis de IL-6 e IL-8 em comparação ao grupo de lesão crônica do LCA, diminuindo após um mês da lesão. Entretanto, a reconstrução cirúrgica do LCA causa elevação dos níveis pós-cirúrgicos de IL-6 cinco vezes maior e de IL-8 dez vezes maior que os níveis pré-cirúrgicos. Portanto estas duas citocinas devem estar envolvidas em toda a história biológica de uma articulação com lesão e sua reconstrução (Bigoni *et al.*, 2016).

O PRP é uma preparação de plasma autólogo enriquecido com uma concentração de plaquetas acima do normalmente contido no sangue total. No tratamento clínico ortopédico, o PRP é classicamente preparado por centrifugação de sangue total anti coagulado e seus componentes são retirados a fim de se concentrar as plaquetas acima dos níveis basais (Wu *et al.*, 2016). Os protocolos típicos realizam uma ou duas centrifugações para a coleta do concentrado de plaquetas no plasma.

O PRP utilizado no presente estudo foi processado segundo a metodologia para a obtenção do chamado PRP pobre em leucócitos (Rubio-Azpeitia *et al.*, 2016; Greening *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017), uma vez que os leucócitos, apesar de exercerem funções importantes na reparação dos tecidos e fornecerem proteção contra agentes infecciosos, possuem ações pró-inflamatórias e imunológicas que podem resultar em efeitos indesejáveis nas células e tecidos opostos aos efeitos cicatriciais desejados, levando a aumento maléfico da inflamação por efeito da produção de citocinas pró-inflamatórias. Porém, mesmo esta preparação do PRP pobre em leucócitos, causou intensa e significativa produção de citocinas IL-6 e IL-8, quando comparados aos controles.

Apesar do grande número de estudos clínicos sobre os efeitos do PRP na medicina esportiva, ainda há uma falta de informações sobre seu mecanismo de ação, que permanece desconhecido (Hudgens *et al.*, 2016). A justificativa para o potencial uso terapêutico do PRP

é que as plaquetas são importantes na resposta à lesão, pois liberam fatores de crescimento que iniciam e modulam a cicatrização das feridas nos tecidos moles e ósseos. Assim, o PRP levaria ao reinício do processo biológico natural, oferecendo um estímulo regenerativo para aumentar a cicatrização e o reparo em tecidos com baixo potencial cicatricial, como tendões, ligamentos e cartilagem, cujos processos de reparação podem ser particularmente lentos devido ao suprimento sanguíneo limitado e longo *turn-over* celular. Os fatores liberados pelas plaquetas envolvidos no processo de cicatrização incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), VEGF, fator de crescimento epidermal (EGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento insulina-like (IGF-1) (Davis *et al.*, 2014). Porém, sabe-se que o PRP apresenta em sua composição a IL-6, IL-8, IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sendo reconhecido haver necessidade de desenvolver um PRP livre de fatores deletérios pró-inflamatórios (Zhu *et al.*, 2013; Pochini *et al.*, 2016).

Estudos clínicos relatam efeitos favoráveis do uso do PRP para o tratamento das tendinopatias. No entanto, falham ao tentar validar sua eficácia, uma vez que não há uma padronização para o processamento, não havendo identificação e mensuração de sua composição em cada estudo. Estudos que comparam o uso do PRP com a triancinolona relatam melhora significativa do grupo que usou PRP somente após seis meses, havendo inicialmente vantagem para o grupo do corticosteroide, com melhora gradativa para o grupo do PRP (Peerbons *et al.*, 2010). Porém, deve-se lembrar pela própria história natural, a evolução da ELC pode apresentar melhora espontânea em seis meses.

Devido ao grande número de publicações a respeito do uso do PRP, estudos de meta-análise poderiam ser úteis na avaliação dos resultados descritos. Segundo Franchini *et al.* (2018), 94% dos estudos a respeito do PRP apresentavam alto risco de viés para um ou mais

domínios e, apesar da maioria deles documentarem a eficácia do PRP em comparação com os controles, a meta-análise não encoraja o uso do PRP como tratamento conservador em ortopedia.

A falta de padronização para a produção de PRP entre os diferentes estudos, tornando os PRP muito heterogêneo e qualitativamente muito diferente entre estudos, limitam a validade das comparações não oferecendo condições para emitir recomendações a favor ou contra seu uso até que sua produção seja mais homogênea, com evidências de alta qualidade sobre sua ideal preparação, dosagem e eficácia (Chen *et al.*, 2018; Franchini *et al.*, 2018). Outro fator limitante sobre o uso do PRP nas tendinopatias seria o tamanho das amostras que são, em geral, muito pequenas, tornando difícil detectar significância clínica nos efeitos do tratamento (Miller *et al.*, 2017).

Portanto, o maior fator limitante para o estudo do PRP seria a falta de padronização na sua produção, uma vez que pequenas diferenças na técnica de processamento podem levar à grandes alterações na sua composição relativa às citocinas e fatores de crescimento.

Novos estudos devem ser realizados para uma padronização universal do processamento do PRP, para um melhor entendimento do seu mecanismo de ação, assim como se estendendo por tempo superior as 96 horas, já que o PRP pode possuir uma grande latência antes de iniciar a sua ação.

O resultados encontrados no presente estudo, no qual a adição de PRP às culturas das células de ELC elevou significativamente os níveis de IL-6 e IL-8 podem corresponder ao aumento da inflamação que ocorre inicialmente *in vivo*, causado pelas plaquetas do PRP que levariam à um reinício da inflamação, como postulado por outros (Davis *et al.*, 2014; Peerbooms *et al.*, 2010).

Portanto, a partir dos resultados do presente estudo não se pode inferir que os níveis elevados de IL-6 e IL-8 causarão, a longo prazo, um efeito de supressão da inflamação, com melhora do quadro clínico da ELC. Acresce-se a isso, fato já bem estabelecido de que o aumento das citocinas inflamatórias poderá levar, invariavelmente, a uma piora da lesão tissular.

Desta forma, é preocupante a instituição de um tratamento que possa levar mesmo que em uma fase precoce a uma exacerbação significativa do processo inflamatório, sem comprovação de que realmente levaria à supressão do mesmo após decorrido algum tempo. Ainda mais que, pela própria história natural da ELC que é uma doença crônica, haverá possibilidade de resolução espontânea em alguns meses, na maioria dos casos.

Assim, o presente estudo não suporta o uso do PRP na ELC, uma vez que houve elevação das citocinas IL-6 e IL-8 em todos os tempos medidos em comparação aos controles ( $P < 0,05$ ). Quando comparado à triancinolona, o estudo demonstrou a superioridade do corticoide no controle da inflamação nos tempos 48, 72 e 96 horas, para todas as concentrações avaliadas.

No entanto, apesar dos resultados superiores dos corticoides em relação ao PRP no tratamento da ELC, os mesmos não são isentos de efeitos indesejáveis, sendo já comprovada a diminuição da viabilidade de células do manguito rotador quando expostos a 0,1mg/mL de triancinolona com 7, 14 e 21 dias, levando à apoptose (Harada *et al.*, 2014). Desta forma, o tratamento com a injeção de corticosteroides necessita cautela, não devendo ser realizado utilizando-se nos casos refratários repetições de aplicação com curtos intervalos de tempo, apesar dos bons resultados a curto prazo.

Dentre as limitações do presente estudo estão a ausência de padronização no preparo do PRP entre os estudos descritos em literatura. A rígida seleção de pacientes que se

encaixassem nos critérios de inclusão do estudo foi outro fator limitante que dificultou a obtenção de maior número de amostras para cultivo. Porém, apesar do limitado número de casos, os trabalhos com cultivo celular permitem a realização de estudos utilizando pequena amostra, já que as células *in vitro*, se comportam como uma linhagem.

O efeito tardio de vários meses para que o PRP gere melhora do quadro clínico da ELC, pode levar a recrudescência da inflamação, limitando a avaliação da eficácia do PRP, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. *In vitro* por ser inviável a manutenção de células em cultivo primário por meses após exposição ao PRP, uma vez que as células podem perder suas características fenotípicas e a senescência das culturas acarretará invariavelmente, a perda da capacidade de proliferação, seguida pela apoptose. Assim também os estudos *in vivo* sofrem limitações, já que a ELC cursa, na maioria dos casos, com a resolução espontânea, não permitindo ao pesquisador avaliar com certeza se os casos que se resolveram foram resultantes do efeito tardio do PRP ou se seria a própria evolução natural da ELC. Estudos com aplicação de PRP somente com uma seleta amostra de casos que apresentem ELC com um longo tempo de evolução, refratários ao tratamento clínico, seriam os mais elegíveis, porém na prática clínica estes critérios podem ser impossíveis de serem utilizados.

Pontos fortes deste estudo consistiram na obtenção das amostras pelo mesmo cirurgião, o processamento do PRP realizado seguindo rígido protocolo, o uso de cultivos padronizados e a aplicação dos tratamentos de forma sistemática, fatores que permitiram reduzir ao máximo a presença de fatores confundidores, além do fato de que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo possuem conflitos de interesse fortalecem os nossos resultados.

Desta forma, usando o método de cultivo celular de células provenientes de portadores de ELC foi possível demonstrar a produção de IL-6 e IL-8 pelas próprias células

da lesão, sem nenhum estímulo externo, uma vez que não há o efeito das citocinas produzidas por outros tipos celulares, como os polimorfonucleares, em resposta à agressão tecidual.



## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo abre uma importante linha de pesquisa, a partir do estabelecimento da técnica para o cultivo das células provenientes de portadores de tendinopatias ou tendinites em geral.

No tocante à ELC, o aspecto morfológico das células fusiformes observadas nos cultivos pode representar tenócitos, condrócitos, fibroblastos ou mesmo osteoblastos. A caracterização destas células, utilizando métodos de imunofluorescência, com o uso de marcadores específicos para cada um dos tipos celulares, poderá representar outro importante passo no entendimento da patogênese da ELC.

A IL-6 é descrita classicamente como uma citocina inflamatória nas tendinopatias. Porém, como exposto, no presente estudo a IL-6 pode ter agido como pró ou anti-inflamatória dependendo da sua ligação com seu receptor solúvel. Portanto, estudar a dosagem de IL-6 concomitantemente com a de seu receptor solúvel GM-CSF no meio condicionado de culturas de tenócitos de ELC será importante para confirmar que a elevada produção de IL-6 pelas células da lesão representa o efeito clássico pró-inflamatório. Assim, uma vez demonstrada a produção de IL-6, estudos futuros poderão ser realizados para a detecção do receptor solúvel, a fim de definir se a IL-6 age com função anti-inflamatória ou pró-inflamatória na patogenia da ELC.

## CONCLUSÃO

Usando técnicas *in vitro* e ensaio de ELISA, conformou-se que células derivadas da ELC produzem as citocinas IL-6 e IL-8, comprovando a natureza inflamatória desta afecção. As células de ELC tratadas com triancinolona a 100  $\mu\text{M}$  produziram significativamente IL-10 no tempo 48 horas, estimuladas pelo aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  neste mesmo tempo.

O presente estudo demonstrou a eficácia da triancinolona na concentração de 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  no tratamento *in vitro* da ELC, uma vez que inibiu significativamente a produção de IL-6 e IL-8, quando comparados ao controle.

O PRP causou elevação significativa dos níveis das citocinas IL-6 e IL-8 produzidas pelas células de ELC em comparação aos controles, levando a importante aumento da inflamação no período de 48, 72 e 96 horas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad Z, Siddiqui S, Malik SS, Abdus-Samee M, Tytherleigh-Strong G, Rubston N. Lateral epicondylitis: a review of pathology and management. *Bone Joint J.* 2013; 95-B: 1158-64.
- Archambault J, Tsuzaki M, Herzog W, Banes AJ. Stretch and interleukin-1beta induce matrix metalloproteinases in rabbit tendon cells in vitro. *J Orthop Res.* 2002; 20(1):36-9.
- Baggiolini M and Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *Fed European Biochem Soc.* 1992; 307(1) :97-101.
- Behrens SB, Deren ME, Matson AP, Bruce B, Green A. A review of modern management of lateral epicondylitis. *Phys Sportsmed.* 2012; 40(2): 34-40.
- Bhabra G, Wang A, Ebert JR, Edwards P, Zheng M, Zheng MH. Lateral elbow tendinopathy. Development of a pathophysiology-based treatment algorithm. *Orthop J Sports Med.* 2016; 4(11): 1-10.
- Bigoni M, Turati M, Gandolla M, Sacerdote P, Piatti M, Castelnovo A, Franchi S, Gorla M, Munegato D, Gaddi D, Pedrocchi A, Omeljaniuk RJ, Locatelli V, Torsello A. Effects of ACL Reconstructive Surgery on Temporal Variations of Cytokine Levels in Synovial Fluid. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2016, p. 1-7, 2016. Hindawi Limited.
- Binder AI & Hazleman B. Lateral humeral epicondylitis – A study of natural history

- and the effect of conservative therapy. *Br J Rheumatol.* 1983; 22:73-6
- Bishai SK, Plancher KD. The basis science of lateral epicondylitis: update for the future. *Tech Orthop.* 2006; 21: 250-5.
  - Bisset LM & Vicenzino B. Physiotherapy management of lateral epicondylalgia. *J Physiotherapy.* 2015; 61(4): 174-81.
  - Buchbinder R, Green SE, Youd JM, et al. Systematic review of the efficacy and safety of shock wave therapy elbow pain. *J Rheumatol.* 2006; 33:1351- 63.
  - Cameron MJ, Kelvin DJ. Cytokines and chemokines--their receptors and their genes: an overview. *Adv Exp Med Biol.* 2003;520:8-32. doi:10.1007/978-1-4615-0171-8\_2
  - Chen X, Jones IA, Park C, Vangsness Jr T. The Efficacy of Platelet-Rich Plasma on Tendon and Ligament Healing; *Am J Sports Med.* 2018; 46(8):2020–32.
  - Chiavaras MM, Jacobson JA, Carlos R, et al. Impact of platelet rich plasma over alternative therapies in patients with lateral epicondylitis (IMPROVE): protocol for a multicenter randomized controlled study: a multicenter, randomized trial comparing autologous platelet-rich plasma, autologous whole blood, dry needle tendon fenestration, and physical therapy exercises alone on pain and quality of life in patients with lateral epicondylitis. *Acad Radiol* 2014; 21(9): 1144-55.
  - Cohen S, Bigazzi P, Yoshida T. Similarities of T Cell Function In Cell-Mediated Immunity and Antibody Production. *Cel Immunol.* 1974; 12(1): 150-9.
  - Coonrad RW, Richard WH. Tennis Elbow: Its Course, Natural History, Conservative and Surgical Management. *J Bone Joint Surg.* 1973; 55(6) 1177-82.
  - Cyriax JH. The pathology and treatment of tennis elbow. *J Bone Joint Surgery.* 1936; 8(4): 921-40.
  - D'Andrea M, Aste-Amezaga NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-

- 10) inhibits human lymphocyte interferon  $\gamma$ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med.* 1993; 178(3):1041–8.
- Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. *J Oral Implantol* 2014; 40(4):500–10.
  - Dejager L, Vandevyver S, Ioanna P, Libert C. Dominance of the strongest: inflammatory cytokines versus glucocorticoids. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014; 25(1):21-33. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.12.006.
  - Dingemanse R, Randsdorp M, Koes BW, Huisstede BM. Evidence for the effectiveness of electrophysical modalities for treatment of medial and lateral epicondylitis: a systematic review. *Br J Sports Med.* 2014; 48(12): 957-65.
  - Dunn JH, Kim JJ, Davis L, Nirshl RP. Ten- to 14-year follow-up of the Nirschl surgical technique for lateral epicondylitis. *Am J Sports Med.* 2008; 36(2): 261-6.
  - Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J Immunol.* 1991; 147(11): 3815-22.
  - Goldie I. Epicondylitis lateralis humeri (Epicondylalgia or tennis elbow). Pathogenetical study. *Acta Chir Scand.*1964; 57:Suppl 339:1-2.
  - Greening DW, Simpson R, Sparrow R. Preparation of platelet concentrates for research and transfusion purposes. *Meth Mol Biol.* 2017; 1519: 31-41.
  - Gümüřalan Y, Kalayciođlu A, Yazar F, Arifođlu Y, Sinav A. Accessory extensor carpi radialis muscle and interconnecting muscular bundle. *Acta Anat (Basel).* 1997; 159(1):57-60.
  - Gupta GK, Acharya A, Khanna V, Roy V, Khillan K, Sambandam NS. PRP versus

steroids in a deadlock for efficacy: long-term stability versus short-term intensity—results from a randomised trial. *Musculoskeletal Surg.* 2019.

- Hamilton PG. The prevalence of humeral epicondylitis: a survey in general practice. *J Royal College Gen Pract.* 1986; 10:464-5.
- Han SH, An HJ, Song JY, Shin JS, Lee SC. Effects of corticosteroid on the expressions of neuropeptide and cytokine mRNA and on tenocyte viability in lateral epicondylitis. *J Inflamm.* 2012. 30;9(1):40. doi: 10.1186/1476-9255-9-40.
- Harada Y, Kokubu T, Mifune Y, Inul A, Sakata R, Muto T, Takase F, Kurosawa M. Dose and time-dependent effects of triamcinolone acetonide on human rotator cuff-derived cells. *Bone Joint Res.* 2014; 3: 328-34.
- Harrington JM, Carter JT, Birrel L, Gompertz D. Surveillance case definitions for work related upper limb pain syndromes. *Occup Environ Med.* 1998; 55:264–71.
- Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF X. Adrenocortical hormone in arthritis preliminary report. *Ann Rheum Dis.* 2001; 8(2):97–104.
- Hirano T, Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T, Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, A., Iwamatsu, A. et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature.* 1986; 324, 73–6.
- Hollander JL, Brown EM, Jessar RA, Brown CY. Hydrocortisone and cortisone injected into arthritic joints: comparative effects of and use of hydrocortisone as a local antiarthritic agent. *J Am Med Assoc.* 1951; 147(17):1629–35.
- Hudgens JL, Sugg KB, Grekin JA, Gumucio JP, Bedi A, Mendias CL. Platelet rich plasma activates pro-inflammatory signaling pathways and induces oxidative stress in tendon fibroblasts. *Am J Sports Med.* 2016; 44(8): 1931-40.

doi:[10.1177/0363546516637176](https://doi.org/10.1177/0363546516637176) .

- John T, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, Busch C, Schulze-Tanzil G. Effect of Pro-Inflammatory and Immunoregulatory Cytokines on Human Tenocytes. *J Orthop Res*. 2010; 8:1071-77.
- Judson CH, Wolf JM. Lateral epicondylitis: review of injection therapies. *Orthop Clin N Am*. 2013; 44: 615-23.
- Karkhanis S, Frost A, Maffulli N. Operative management of tennis elbow: a quantitative review. *Br Med Bull*. 2008; 88(1): 171-88.
- Kazemi M, Azma K, Tavana B, Rezaiee Moghaddam F, Panahi A. Autologous blood versus corticosteroid local injection in the short-term treatment of lateral elbow tendinopathy: a randomized clinical trial of efficacy. *Am J Phy Med Rehabil*. 2010; 89: 660-7.
- Keijsers R, de Vos RJ, Kuijer PPF, Van den Bekerom MP, Van der Woude HJ, Eygendaal D. Tennis elbow. *Shoulder & Elbow*. 2018; 175857321879797. doi:10.1177/1758573218797973.
- Kokubu T, Mifune Y, Sakata R, Muto T, Takase F, Kurosawa M. Dose- and time-dependent effects of triamcinolone acetonide on human rotator cuff-derived cells. *Bone Joint Res*. 2014;3(12):328-34. doi: 10.1302/2046-3758.312.2000321.
- Kraushaar BS, Nirschl RP. Tendinosis of the elbow (tennis elbow). Clinical features and findings of histological, immunohistochemical, and electron microscopy studies. *J Bone Joint Surg Am*. 1999;81(2):259-78.
- Krogh TP, Bartels EM, Ellingsen T, et al. Comparative effectiveness of injection therapies in lateral epicondylitis: a systematic review and network meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Sports Med*. 2013; 41(6): 1435-46.

- Legerlotz K, Jones ER, Screen HR, Riley GP. Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology. *Rheumatol*. 2012; 51:1161-65.
- Lien D1, Vandevyver S, Petta I, Claude L. Dominance of the strongest: inflammatory cytokines versus glucocorticoids. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(1):21-33. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.12.006.
- Lin CL, Lee JS, Su WR, Kuo LC, et al. Clinical and ultrasonographic results of ultrasonographically guided percutaneous radiofrequency lesioning in the treatment of recalcitrant lateral epicondylitis. *Am J Sports Med*. 2011; 39(11): 2429-35.
- Macfarlane D, Forbes S, Walker BR. *J Endocrinol*. 2008;197(2):189-204.
- MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, et al. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem*. 1990; 265: 17238–45.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008; 454: 428-35.
- Mihara M, Hashizune M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 2012; 122: 143–59. doi:10.1042/CS20110340.
- Mihara, M., Nishimoto, N. and Ohsugi, Y. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert Opin Biol Ther*. 2005; 5(5):683-90.
- Millar NL, Wei AQ, Molloy TJ, Bonar F, Murrell GA. Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy. *J Bone Joint Surg [Br]*. 2009; 91-B:417-24.
- Millar NL, Murrell GA, McInnes IB. Inflammatory mechanisms in tendinopathy - towards translation. *Nat Rev Rheumatol*. 2017; 13:110-22.

- Miller LE, Parrish WR, Roides B, Bhattacharyya S. Efficacy of platelet-rich plasma injections for symptomatic tendinopathy: systematic review and meta-analysis of randomized injection controlled trials. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2017; 3(1). doi: 10.1136/bmjsem-2017-000237
- Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006; 34: 1774-8.
- Morita W, Dakin SG, Snelling SJB, Carr AJ. Cytokines in tendon disease: A Systematic Review. *Bone Joint Res.* 2017; 6(12):656-64.
- Morris H. The rider's sprain. *Lancet.* 1882;120:133-4.
- Mota Filho Geraldo. Cotovelo. In: Barros Filho, Tarcisio EP, Lech, Osvandre. 3ed. São Paulo, Savier 2017. Chap. 5 p. 104-57.
- Murphy G, Reynolds JJ, Werb Z. Biosynthesis of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-Otetradecanoylphorbol 13-acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem.* 1985; 260: 3079-83.
- Nakama K, Gotoh M, Yamada T. Interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription in ruptured rotator cuff tendon. *J Int Med Res.* 2006; 34:624-31.
- Nevelös AB. The treatment of tennis elbow with triamcinolone acetonide. *Cur Med Res Opinion.* 1980; 6(7):507-9.
- Nicolini A, Carpi A, Rossi G. Cytokines in breast cancer. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2006; 17(5):325-37.
- Nirschl RP. Tennis elbow. *Orthop Clin North Am.* 1973; 4: 787-800.
- Nirschl RP, Pettrone FA. Tennis elbow. The surgical treatment of lateral epicondylitis. *J Bone Joint Surg Am.* 1979; 61(6):832-9.

- Parente L. The development of synthetic glucocorticoids. In: Goulding NJ, Flower RJ (eds) *Glucocorticoids: milestones in drug therapy MDT*. Birkhäuser, Basel. 2001.pp 35–51.
- Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn J, Gosens T. Positive Effect of an Autologous Platelet Concentrate in Lateral Epicondylitis in a Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med.* 2010; 38(2):255-62. doi: 10.1177/0363546509355445.
- Placzek R, Drescher W, Deuretzbacher G, Hempfing A, Meiss AL. Treatment of chronic radial epicondylitis with botulinum toxin A: a double-blind, placebo-controlled, randomized multicenter study. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; 89: 255-60.
- Pochini AC, Antonioli E, Bucci DZ, Sardinha LR, Andreoli CV, Ferretti M, Ejnisman B, Goldberg AC, Cohen M. Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Einstein.* 2016; 14(3): 391-7.
- Rose-John S. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8(9):1237-47. doi: 10.7150/ijbs.4989.
- Rubio-Azpeitia E, Bilbao AM, Sánchez P, Delgado D, Andia I. The properties of 3 different plasma formulations and their effects on tendinopathic cells. *Am J Sports Med.* 2016; 44(8): 1952-61.
- Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010; 21(5): 331-44.

- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, Cidlowski JA, Baldwin Jr AS. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- $\kappa$ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol.* 1995; 15:943–53.
- Scherer J, Rainsford KD, Kean CA, Walter F. Pharmacology of intra-articular triamcinolone. *Inflammopharmacol.* 2014; May. doi 10.1007/s10787-014-0205-0
- Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, et al. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand J Med Sci Sports.* 2011; 21:337-51.
- Siebelt M, Korthagen N, Wei W, Groen H, Bastiaansen-Jenniskens Y, Müller C, Waarsing JH, de Jong M, Weinans H. Triamcinolone acetonide activates an anti-inflammatory and folate receptor–positive macrophage that prevents osteophytosis in vivo. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17:352. doi 10.1186/s13075-015-0865-1
- Silvinato A, Bernardo WM. Inflammatory arthritis or osteoarthritis of the knee – Efficacy of intra-joint infiltration of methylprednisolone acetate versus triamcinolone acetonide or triamcinolone hexacetonide. *Rev Assoc Med Bras.* 2017; 63(10):827-36.
- Skutek M, Van Griensven M, Zeichen J. Cyclic mechanical stretching enhances secretion of interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* Hydrocortisone in tennis elbow. 2001; 9:322–26.
- Stein I, Stein RO, Beller ML. *Am J Surg.* 1953; 86(1):123-4.
- Stow JL and Murray RZ. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2013; 24:227-239.
- Sun W, Ho S, Fang RX, O’Shea TJ, Liu H. Simultaneous determination of triamcinolone hexacetonide and triamcinolone acetonide in rabbit plasma using a highly sensitive and selective UPLC–MS/MS method. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;

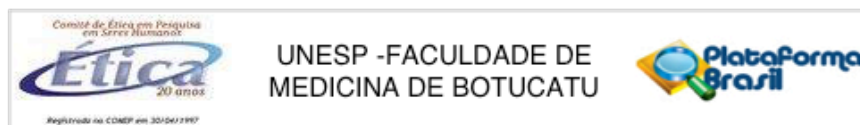
5(10);153:267-73. doi: 10.1016/j.jpba.2018.02.052.

- Thilo J, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, Busch C, Schulze-Tanzil G. Effect of Pro-Inflammatory and Immunoregulatory Cytokines on Human Tenocytes. *J Orthop Res.* 2010;8:1071-7.
- Tsuzaki M, Bynum D, Almekinders L, Yang X, Faber J, Banes AJ. ATP modulates load-inducible IL-1beta, COX 2, and MMP-3 gene expression in human tendon cells. *J Cell Biochem.* 2003; 89(3): 556-62.
- Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, Archambault J, Herzog W, Almekinders L, Bynum D, Yang X, Banes AJ. IL-1b induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1b and IL-6 in human tendon cells. *J Orthopaedic Res.* 2003; 21:256–64.
- Walker-Bone K, Palmer KT, Reading I, et al. Occupation and epicondylitis: a population-based study. *Rheumatology.* 2012;51:305-10.
- Wang A, Mackie K, Bredahl W, Wang T, Zheng MH. Evidence of the durability of autologous tenocyte injection for treatment of chronic resistant lateral epicondylitis: mean 4.5 year clinical follow-up. *Am J Sports Med.* 2015; 23. doi: 10.1177/0363546515579185.
- Wolf JM, Ozer K, Scott F, Gordon MJ, Williams AE. Comparison of autologous blood, corticosteroid and saline injection in the treatment of lateral epicondylitis: a prospective, randomized, controlled multicenter study. *J Hand Surg Am.* 2011; 36:1269-72.
- Wong MW, Lui WT, Fu SC, Lee KM. The effect of glucocorticoids on tendon cell viability in human tendon explants. *Acta Orthop.* 2009; 80(3):363-7. doi: 10.3109/17453670902988386.
- Wu PI, Diaz R, Joanne Borg-Stein, Platelet-Rich Plasma. *Phys Med Rehabil Clin N*

Am. 27 (2016) 825–53.

- Yan R, Gu Y, Ran J, Hu Y, et al. Intratendon delivery of leukocyte-poor platelet-rich plasma improves healing compared with leukocyte-rich platelet-rich plasma in a rabbit achilles tendinopathy model. *Am J Sports Med.* 2017; 45(8):1909-20. doi: 10.1177/0363546517694357.
- Yang K, Choi IJ, Lee JH. Accessory head of the extensor carpi radialis longus muscle merging with extensor carpi radialis brevis muscle. *Surg Radiol Anat.* 2018; 40(9):1001-3.
- Zhu Y, Yuan M, Meng HY, Wang AY, Guo QY, Wang Y, Peng J. Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2013; 21: 1627-37.
- Zuckner J, Ramsey RH, Caciolo C, Gantner GE. Triamcinolone therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1958; 17:398–405.

## 8.1 Parecer Consubstanciado CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito anti-inflamatório da triancinolona e do plasma rico em plaquetas sobre tenócitos de epicondrite lateral

**Pesquisador:** Maclo Eduardo de Melo Viveiros

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 94081418.8.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Cirurgia e Ortopedia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.903.373

## Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma dissertação de Doutorado do Departamento de Cirurgia e Ortopedia.

A epicondrite lateral é uma condição musculoesquelética comum que afeta de 1% a 3% da população adulta, sem distinção de sexo e na faixa etária entre 35 e 50 anos. É conhecida como "cotovelo de tenista" apesar de afetar outros esportistas que não usam raquetes, como no beisebol, esgrima e natação. Além disso, algumas ocupações manualmente intensas com movimentos repetitivos que podem causar estresse aos músculos extensores do punho também têm um risco aumentado de desenvolver epicondrite lateral. É considerada um resultado do uso mecânico recorrente e excessivo, sobrecarregando a porção lateral do cotovelo excedendo sua tolerância, o tendão não consegue se auto-reparar, levando à múltiplas micro-roturas que resultam em laceração, sangramento e o processo cicatricial pode levar vários meses.

Histopatologicamente a epicondrite lateral é caracterizada pela presença de densa população de fibroblastos, hiperplasia vascular e colágeno desorganizado, ocorrendo tipicamente na origem do extensor radial curto do carpo ou menos comumente no extensor digital comum. Os ligamentos do tendão são compostos por tecido conjuntivo denso com um potencial intrínseco muito limitado para a regeneração, portanto sua reparação em resposta a mecanismos que envolvem sua degeneração são um complexo desafio clínico, uma vez que esta degeneração contínua pode

**Endereço:** Chácara Butignoli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1609 **CEP:** 18.618-970  
**E-mail:** cep@fmb.unesp.br

Continuação do Parecer: 2.903.373

resultar da ação de citocinas inflamatórias mediadas pelos fibroblastos do próprio tecido conjuntivo agredido, mesmo na ausência de células inflamatórias no local.

Não há um tratamento definido para a epicondilite lateral mas sim um grande número de opções terapêuticas, incluindo injeções de corticosteróide e de plasma rico em plaquetas (PRP).

O presente estudo visa comparar duas das terapêuticas, a injeção de corticosteróide (acetato de triancinolona) e a injeção do PRP em células de epicondilite lateral, avaliando os seus efeitos na produção de citocinas pro inflamatórias.

Fases do estudo:

- 1 – Coleta e acondicionamento do sangue
- 2 – Processamento do PRP
- 3 – Cultivo celular primário
- 4 - Estudo da viabilidade celular à triancinolona
- 5 - Padronização do tempo de exposição à triancinolona para a determinação da cinética de produção das citocinas inflamatórias
- 6 - Tratamento com triancinolona e PRP
- 7 - Estudo das citocinas inflamatórias em resposta à triancinolona e ao PRP
- 8 - Determinação dos receptores solúveis sgp-130
- 9 - Análise Estatística

Tamanho amostral: 10 pacientes sem outras doenças ortopédicas ou reumatológicas associadas.

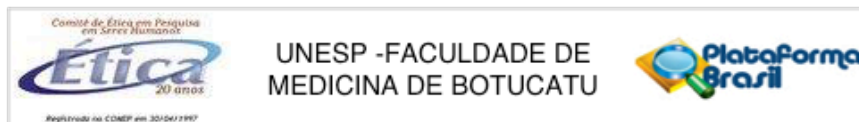
**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar e comparar a produção das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, FGF, VEGF e GM-CSF pelos tenócitos de epicondilite lateral em cultura celular, após exposição ao acetato de triancinolona e ao PRP.

**avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Não haverá riscos para o paciente doador, uma vez que o tecido deverá ser retirado no procedimento para o tratamento cirúrgico da epicondilite lateral. O sangue a ser coletado, apenas 12 ml, não causará nenhum prejuízo ao paciente e será colhido pela própria punção venosa de rotina para o ato cirúrgico.

Endereço: Chácara Butignoli, s/n  
Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.903.373

**Benefícios:** Verificação da eficácia do uso da triancinolona e PRP em estudo comparativo in vitro, sem a interferência dos fatores externos, como volta dos movimentos traumáticos que causam a recidiva da lesão.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa relevante e de qualidade com metodologia clara e objetiva.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto: adequada. Está assinada pelo autor e pelo diretor da Faculdade de Medicina.

Projeto de pesquisa: Adequado. Contém todos os requisitos de um projeto de pesquisa e está de acordo com as informações da Plataforma Brasil.

Autorização Institucional do Escritório de Apoio à Pesquisa: Adequada

TCLE: adequado. Em forma de convite e em linguagem clara e acessível atendendo aos requisitos éticos da pesquisa.

Regulamento do biorrepositório: Adequado

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Após análise, o Colegiado deliberou APROVAÇÃO do projeto de pesquisa apresentado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Conforme deliberação do Colegiado em reunião extraordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 18 de setembro de 2018, o projeto encontra-se APROVADO, sem (com) necessidade de envio à CONEP.

No entanto, informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "Notificação", via sistema Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_993993.pdf	10/09/2018 21:26:56		Acelto

Endereço: Chácara Butignoli, s/n  
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970  
 UF: SP Município: BOTUCATU  
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



UNESP -FACULDADE DE  
MEDICINA DE BOTUCATU



Continuação do Parecer: 2.903.373

Outros	Biorrepositorio_Marcio_Viveiros.pdf	10/09/2018 21:25:53	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Outros	Resposta_as_pendencias.jpeg	10/09/2018 21:24:31	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Outros	esclarecimento_CEP.pdf	13/08/2018 15:02:55	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	11/07/2018 18:33:58	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnaliseDgaaHcfmb.pdf	11/07/2018 18:30:43	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Outros	decl_EAP.pdf	11/07/2018 18:29:59	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDeAnuenciaHc.pdf	11/07/2018 18:21:56	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciaInstitucional.pdf	11/07/2018 18:21:27	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Cronograma	cronograma.pdf	11/07/2018 18:18:08	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	13/09/2017 13:54:50	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_FINAL_Marcio.pdf	13/09/2017 13:53:10	Macio Eduardo de Melo Viveiros	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 19 de Setembro de 2018

Assinado por:  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butgnoli, s/n  
Bairro: Rubião Junior  
UF: SP Município: BOTUCATU  
Telefone: (14)3880-1609 CEP: 18.618-970  
E-mail: cep@fmb.unesp.br

