

SARAH RAPHAELA TORQUATO SEIDEL

**Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de diferentes
hemocomponentes em co-cultura de cartilagem e células
derivadas de membrana sinovial de equinos**

São Paulo

2023

SARAH RAPHAELA TORQUATO SEIDEL

**Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de diferentes
hemocomponentes em co-cultura de cartilagem e células
derivadas de membrana sinovial de equinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Médica

Orientador:

Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes
Baccarin

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Seidel, Sarah Raphaela Torquato
Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de diferentes
hemocomponentes em co-cultura de cartilagem e células derivadas de
membrana sinovial de equinos / Sarah Raphaela Torquato Seidel ;
orientador Raquel Yvonne Arantes Baccarin .-- São Paulo, 2023.
95 f. : il.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária
- Departamento de Clínica Médica) - Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Plasma rico em plaquetas. 2. Lisado plaquetário. 3. PRP
liofilizado. 4. Co-cultura. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de diferentes hemocomponentes em co-cultura de cartilagem e células derivadas de membrana sinovial de equinos", protocolada sob o CEUA nº 9643220218 (ID 005401), sob a responsabilidade de **Raquel Yvone Arantes Baccarin e equipe; Sarah Raphaela Torquato Seidel** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2018.

We certify that the proposal "Assessment of the anti-inflammatory effects of different hemocomponents in equine cartilage and synovial membrane derived cells co-culture", utilizing 8 Equines (males and females), protocol number CEUA 9643220218 (ID 005401), under the responsibility of **Raquel Yvone Arantes Baccarin and team; Sarah Raphaela Torquato Seidel** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **01/2021** Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 10 anos**

Quantidade: **8**

Linhagem: **Diversas**

Peso: **300 a 700 kg**

São Paulo, 18 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SEIDEL, Sarah Raphaela Torquato

Título: **Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de diferentes hemocomponentes em co-cultura de cartilagem e células derivadas de membrana sinovial de equinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, Damião e Francisca
(*in memoriam*).

Meus amores eternos e imensuráveis.
Sem vocês eu nada seria.

Sei que ainda vamos nos reencontrar.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a espiritualidade, que em todas as suas formas e manifestações segue me abençoando e guiando meus passos ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, Damião Lierti Seidel e Francisca Torquato Cavalcante Seidel. Obrigada por todo ensinamento, por serem meu alicerce e fortaleza, por terem acreditado nos meus sonhos e vivenciado cada etapa ao meu lado. Nenhum agradecimento será suficiente. Obrigada por tudo e por tanto! Amo vocês eternamente.

Aos meus familiares e amigos, pessoas mais que fundamentais não só durante o doutorado, mas por toda a vida.

Ao meu digníssimo esposo Teylo, pelo companheirismo, pela empatia, pelo apoio, pelos memes e incontáveis: “vai dar certo, amor”. Vencemos mais uma etapa!

À minha orientadora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, pelo suporte não apenas acadêmico, mas também emocional. Obrigada por todas as vezes que duvidou, questionou e me instigou a melhorar. Obrigada pela confiança, parceria e amizade ao longo desses quase oito anos de convivência.

À nossa equipe de pesquisa, *EquiScience*, em especial os membros e agregados que foram engrenagens essenciais para a realização desse trabalho. Joice, Ângela, Fernanda, Heloá, Paula, Letícia e Élití, obrigada por embarcarem na cilada desde a coleta ao laboratório. Ana e Cynthia: obrigada pela super ajuda com a PGE (e suas diluições infinitas).

À toda equipe do Hospital Veterinário, abrangendo funcionários, estagiários, residentes e professores. Em especial ao Cícero, Marquinhos e Felipe, fundamentais para a aquisição dos membros.

Aos técnicos que me receberam, compartilharam seus conhecimentos e que me assistiram em muitas dúvidas e desafios. Dennis Zannato, Luciana Bandini e Mauro de Mattos, do Departamento de Patologia. Aline Lemos e Meire Ioshie, do Instituto de Ciências Biomédicas. Clara Mori e Maria Helena, do Departamento de Clínica Médica. A ajuda de vocês foi mais que essencial!

Às professoras Cris Massoco, do Departamento de Patologia e Yara Michelacci, da Escola Paulista de Medicina, suas contribuições e orientações foram cruciais para a realização desse trabalho!

À CAPES, não somente pela concessão da bolsa de doutorado, como também por viabilizar o doutorado sanduíche.

E obviamente, aos meus queridos cavalos. Trabalhar por vocês e com vocês é um privilégio!

“Sentimos que, mesmo que todas as possíveis questões científicas fossem respondidas, os problemas da vida permaneceriam intocados.”

Ludwig Wittgenstein

“Nossas preferências não determinam o que é verdade.”

Carl Sagan

“Sucesso é gostar de si mesmo, gostar do que faz e gostar de como fazê-lo.”

Maya Angelou

RESUMO

SEIDEL, S.R.T. **Avaliação dos efeitos anti-inflamatórios de diferentes hemocomponentes em co-cultura de cartilagem e células derivadas de membrana sinovial de equinos.** 2023. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O uso de ortobiológicos, como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), já é uma realidade na medicina equina há alguns anos, porém segue enfrentando certas limitações relacionadas desde à grande variabilidade de protocolos utilizados até desfechos clínicos por vezes divergentes dos encontrados em ensaios clínicos. Esse estudo foi desenvolvido com dois objetivos principais: validar um protocolo de produção de PRP Liofilizado e Lisado Plaquetário (LP), obtidos a partir de PRP; conduzir um teste pré-clínico mensurando a capacidade anti-inflamatória desses hemocomponentes em co-cultura de tecido articular. Dentre as hipóteses que nos embasaram estão: os hemocomponentes manterão a concentração de fatores de crescimento independente do produto final, e a resposta inflamatória inicial será seguida de resposta resolutive em ambiente *in vitro*. A metodologia foi dividida em duas etapas. Primeiramente os três hemocomponentes foram produzidos de seis doadores saudáveis, sendo mensurados seu conteúdo celular, bioquímico, Fator de Crescimento Transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), interleucinas (IL) 1, 6 e 10 e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). Na segunda etapa, as co-culturas foram produzidas com explante de cartilagem e células derivadas de membrana sinovial de seis doadores de tecido articular. Dos oito poços de co-cultura, quatro foram estimulados com lipopolissacarídeo, e cada um dos oito poços recebeu um dos quatro tratamentos: meio de cultura, PRP, PRP liofilizado e Lisado Plaquetário. Os explantes foram avaliados histologicamente e por meio de microscopia eletrônica de varredura. As células foram avaliadas quanto à sua viabilidade ao fim da cultura. Nos sobrenadantes foram mensurados concentração de prostaglandina E2 (PGE2), interleucinas 1 beta, 6 e 10, TNF- α , TGF- $\beta 1$ e glicosaminoglicanos. Os hemocomponentes apresentaram concentração semelhante de TGF- $\beta 1$ quando armazenados a -80°C por trinta dias e dois anos, com diminuição quando armazenados a -20°C por um ano. A concentração de citocinas diminuiu drasticamente em todos os

hemocomponentes armazenados em temperatura ambiente por 30 dias. Com relação às co-culturas, o tratamento com os ortobiológicos resultou em liberação estável de TGF- β 1 ao longo do tempo, PGE2 apresentou maiores concentrações em 0 e 48 h, retornando a valores basais em 144 h, enquanto as concentrações de IL-1 β , IL-10 e TNF- α apresentaram aumento nas amostras tratadas com PRP e LP em 144 h. Dermatan sulfato (DS) e Condroitin sulfato (CS) resultaram em valores similares em todos os tratamentos em 144 h. Os protocolos utilizados resultaram em hemocomponentes com características semelhantes entre si quando armazenados a -80°C por 30 dias, e sua utilização como tratamento em sistema de co-cultura de tecido articular apresentou perfil inflamatório inicial, seguido de possível fase pró-resolutiva, com aumento dos fatores anti-inflamatórios.

Palavras-chave: Plasma Rico em Plaquetas. Lisado Plaquetário. PRP liofilizado. Co-cultura.

ABSTRACT

SEIDEL, S.R.T. **Assessment of the anti-inflammatory effects of three distinct hemocomponents on equine cartilage and synovial membrane derived cells co-culture.** 2023. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The use of orthobiologics, such as Platelet Rich Plasma (PRP), has been a reality in equine medicine for some years now, but it continues to face certain limitations, ranging from the great variability of the protocols used to clinical outcomes that occasionally differ from those found in clinical trials. This study had two main objectives: to validate a protocol for the production of Lyophilized PRP (FD-PRP) and Platelet Lysate (PL), obtained from PRP; conduct a pre-clinical test measuring the anti-inflammatory capacity of these blood components in joint tissue co-culture. Our hypothesis were: the blood components will maintain their level of growth factors regardless of the final product, and the initial inflammatory response will be followed by a resolutive response in an *in vitro* environment. The methodology was divided into two phases. Firstly, the three blood components were produced from six healthy donors, and their cellular and biochemical content, Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1), interleukins (IL) 1, 6 and 10 and Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) were measured. In the second phase, co-cultures were produced with cartilage explants and synovial membrane derived cells of six joint tissue donors. Of the eight co-culture wells, four were stimulated with lipopolysaccharide, and each of the eight wells received one of four treatments: culture medium, PRP, lyophilized PRP and platelet lysate. The explants were evaluated histologically and using scanning electron microscopy. The cells were evaluated for their viability at the end of culture. The concentration of prostaglandin E2 (PGE2), interleukins 1, 6 and 10, TNF- α , TGF- β 1 and glycosaminoglycans were measured on the supernatants. The blood components produced showed a similar concentration of TGF- β 1 when stored at -80°C for 30 days and 2 years, decreasing when stored at -20°C for 1 year. The concentration of cytokines decreased drastically in all blood components stored at room temperature for 30 days. Regarding co-cultures, treatment with orthobiologics

resulted in stable release of TGF- β 1 over time, PGE2 showed higher concentrations at 0 and 48 h in every treatment, returning to basal concentrations at 144 h, while IL-1 β , IL-10 and TNF- α showed an increase in wells treated with PRP and PL at 144 h. Dermatan sulfate and Chondroitin sulfate resulted in similar values in all treatments at 144 h. In conclusion: the protocols used resulted in blood components with similar characteristics when stored at -80°C for 30 days, and their use as a treatment in a joint tissue co-culture system presented an initial inflammatory response, followed by a possible pro-resolutive phase, with an increase of anti-inflammatory factors.

Keywords: Platelet-rich Plasma. Platelet lysate. Freeze-dried PRP. Co-culture system.