



UNICAMP

Universidade Estadual de Campinas



Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Curso de graduação em Odontologia

Monografia de Final de Curso

Aluno: Henrique Ballassini Abdalla

RA: 106034

Orientador: Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Ano de Conclusão de Curso: 2013

Assinatura do orientador

Henrique Ballassini Abdalla

“Avaliação da eficácia analgésica e antiinflamatória da aplicação do sistema poloxamer-prostaglandina J₂ (PL-PGJ₂) na articulação temporomandibular de ratos.”

**Monografia apresentada ao Curso
de Odontologia da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP, para obtenção do
Diploma de Cirurgião-Dentista.**

Piracicaba, SP

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Henrique Ballassini Abdalla RA 106034 esteve sob minha orientação para realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado " Avaliação da eficácia analgésica e antiinflamatória da aplicação do sistema poloxamer-prostaglandina J₂ (PL-PGJ₂) na articulação temporomandibular de ratos." no ano de 2013.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso

Piracicaba, 27 de setembro de 2013



Juliana Trindade Clemente Napimoga

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Abdalla, Henrique Ballassini, 1990-

Ab31a Avaliação da eficácia analgésica e antiinflamatória da aplicação do sistema poloxamer-prostaglandina J2 (PL-PGJ2) na articulação temporomandibular de ratos / Henrique Ballassini Abdalla. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Juliana Trindade Clemente Napimoga.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular. 2. Dor. I. Napimoga, Juliana Trindade Clemente, 1978- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho a...

Agradecimentos

Á Deus.

Á minha família, pelo apoio e incentivo em todos os momentos; pelo carinho e amor.

Á minha namorada, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e pelas lições de vida aprendidas.

Á minha orientador Prof^a. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga, e a minha co-orientadora, Cristina Gomes Macedo, pelo grande aprendizado e pelas experiências vividas.

Á agência FAPESP, pela bolsa na Iniciação Científica.

Resumo

Sabe-se que as condições dolorosas da articulação temporomandibular (ATM), em pacientes com disfunções temporomandibulares (DTM), estão relacionadas a episódios inflamatórios caracterizados pela liberação de mediadores inflamatórios e aminas simpatomiméticas que resultam na sensibilização dos nociceptores causando hipernocicepção. Como a dor é a principal reclamação dos pacientes com DTM, e as estratégias para o controle da dor relacionada com as DTMs são insatisfatórias, o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas mais eficazes para o controle da dor é de grande interesse para pacientes e clínicos. Neste sentido, tem sido demonstrado o uso em potencial da nanotecnologia no aumento da eficácia e disponibilidade de fármacos, em particular, o sistema de carreadores micelares. Dentre os constituintes dos sistemas micelares, destacam-se os co-polímeros de bloco da classe dos poloxamers (PL), especialmente o PL407 devido sua alta biocompatibilidade com aprovação pela *Food and Drug Administration (FDA)* para uso clínico. (p. ex. poloxamers - PL). Sendo assim, considerando estudos prévios onde foi demonstrado que a ativação dos receptores PPAR- γ na ATM pelo agonista sintético 15d-PGJ₂ induz um potente efeito antinociceptivo e antiinflamatório periférico através da co-participação dos receptores κ/δ opióides mediado pela ativação da via intracelular L-Arginina/NO/GMP/ K^+_{ATP} , o objetivo deste estudo é avaliar a eficácia analgésica e antiinflamatória da aplicação do sistema poloxamer-prostaglandina J₂ (PL-PGJ₂) na articulação temporomandibular. Para isto os animais serão pré-tratados com o PL-PGJ₂ e posteriormente receberão uma injeção intra-articular do agente inflamatório formalina. O efeito analgésico e antiinflamatório será avaliado através de análises comportamentais, avaliação da migração de neutrófilo, formação de edema, liberação dos mediadores TNF- α , IL-1 β e KC e expressão das moléculas de adesão ICAM. O desenvolvimento do trabalho proposto vem auxiliar no desenvolvimento de uma nova conduta terapêutica para pacientes com DTM.

Palavras chave: ATM, dor, 15d-PGJ₂, carreadores micelares

Abstract

Pain resulting from temporomandibular joint dysfunctions (TMD) is known to be caused by the release of inflammatory mediators and sympathomimetic amines leading to the sensitization of nociceptors and, consequently, to a phenomenon called hypernociception. Since pain is the primary complaint of patients with TMD and strategies for the control of pain related to the TMD are unsatisfactory, the development of more effective therapeutic approaches for pain control is of great interest to patients and clinicians. The potential use of nanotechnology to enhance micelle drug delivery system (MDDS) as well as the effectiveness and availability of drugs has been investigated. Among the constituents of the MDDS are the block copolymers of the poloxamer class (PL) and, in particular, the PL407, the latter of which is highly biocompatible and has been approved by the Food and Drug Administration for clinical use (e.g. poloxamers-PL). The activation of PPAR- γ receptors in the temporomandibular joint (TMJ) by the 15d-PGJ2 synthetic agonist has been reported to induce anti-inflammatory and anti-nociceptive effects through the co-participation of peripheral receptors (κ/δ opioids) mediated by the activation of the intracellular pathway (L-arginine/NO/GMP/K⁺ ATP). Therefore, the aim of this study is to assess the anti-inflammatory and analgesic efficacy of the poloxamer-prostaglandin J2 (PL-PGJ2) injected in the TMJ. The animals will be pretreated with PL-PGJ2 and, subsequently, receive an intra-articular injection of formalin, an inflammatory agent. A behavioral analysis, an evaluation of the neutrophil migration, the formation of edema, the release of mediators (TNF- α , IL-1 β and KC) and expression of adhesion molecules will be considered to assess the anti-inflammatory and analgesic effects. This proposed work is intended for helping develop a new therapy for patients with TMD.

Key words: TMJ, pain, 15d-PGJ2, micelle drug delivery.

SUMARIO

Introdução	-----	página 9
Proposição	-----	página 12
Metodologia	-----	página 12
Resultados	-----	página 15
Referências Bibliográficas	-----	página 25

Introdução

As disfunções temporomandibulares (DTMs) compreendem um grupo de diversas condições que resultam em dor na articulação temporomandibular e/ou dor na musculatura mastigatória, fatores comuns para o desenvolvimento de dor crônica orofacial (Cairns, 2010). A dor é um dos sinais clássicos de processo inflamatório apresentando como denominador comum a sensibilização dos receptores nociceptivos aferentes primários. Decorrente de estímulos inflamatórios ou lesões teciduais, a liberação de citocinas e quimiocinas pró e antiinflamatórias desencadeiam a liberação de prostanóides e aminas simpatomiméticas que por sua vez atuam diretamente nos nociceptores causando a hipernocicepção, resultado da redução do limiar de excitabilidade devido à modulação de canais de sódio voltagem-dependentes (Khasar et al. 1999, Verri et al, 2006). Em particular, a dor da ATM é resultado de episódios inflamatórios envolvendo mediadores inflamatórios como PGE₂, 5-HT, TNF- α , IL-1 β e aminas simpatomiméticas (Kopp, 2001; Rodrigues et al., 2006). Como a dor é a principal reclamação dos pacientes com DTM, e as estratégias para o controle da dor relacionada com as DTMs são insatisfatórias, o desenvolvimento de novas condutas terapêuticas mais eficazes para o controle da dor é de grande interesse para pacientes e clínicos (Cairns, 2010).

O receptor de ativação de proliferação do peroxissomo- γ (PPAR γ) é um receptor da superfamília de receptores hormonais que ativam fatores de transcrição nuclear (Escher and Wahli, 2000). O isótopo do PPAR- γ tem recebido considerável atenção pelo seu papel como sensor lipídico. Agonistas sintéticos do PPAR- γ da classe dos thiazolidinedione (TZD), como o rosiglitazone, agem como sensibilizadores de insulina demonstrando um importante tratamento na diabetes tipo 2 (Morgenweck et al., 2010, Lehrke and Lazar, 2005). Além do mais, em adição a diabetes, os ligantes do PPAR representam uma promissora estratégia terapêutica para outras doenças incluindo aquelas associadas com desordens inflamatórias tais como artrite, sepse, dor inflamatória e colite (Cuzzocrea et al., 2003; Shan et al., 2004; Kaplan et al., 2005; Chima et al., 2008; Napimoga et al., 2008; Pena-dos-Santos et al., 2009).

Outro aspecto a ser considerado é que agonistas do PPAR- γ apresentam potente efeito neuroprotetor em modelos animais com injúrias agudas no SNC (Sundararajan et al., 2005; Zhao et al., 2005; Pereira et al., 2006; Collino et al., 2006; Tureyen et al., 2007; Park et al., 2007; McTigue et al., 2007; Hyong et al., 2008). A literatura sugere que a ativação farmacológica dos PPAR- γ no cérebro e na medula inibe rapidamente a transmissão dos estímulos nociceptivos induzidos pelos mediadores inflamatórios, sugerindo que os PPAR- γ são importantes modulares da dor (Morgenweck et al., 2010). Baseado nestes dados, em um estudo prévio foi demonstrado que a ativação dos PPAR- γ na ATM pela 15d-PGJ₂ induz um potente efeito antinociceptivo e antiinflamatório periférico através da co-participação dos receptores κ/δ opióides mediado pela ativação da via intracelular L-Arginina/NO/GMP/ K^+_{ATP} . (Pena-dos-Santos, 2009).

A nanomedicina, um novo campo emergente criado pela fusão da nanotecnologia e a medicina, é um dos mais promissores caminhos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Huynh et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado que a nanoencapsulação de drogas prolongam sua atividade farmacológica e diminui sua toxicidade (Bernardi et al., 2009; Elron-Gross et al., 2009; Grillo et al., 2010; Alves et al., 2011). Em particular, uma publicação recente de nosso grupo demonstrou o potencial uso da nanotecnologia através da administração sistêmica da 15d-PGJ₂ encapsulada (15d-PGJ₂-NC) que possibilitou utilizar uma quantidade consideravelmente menor da dose, assim como, prolongou a disponibilidade da 15d-PGJ₂ no soro, conseqüentemente aumentando a efetividade em comparação ao uso da 15d-PGJ₂ não encapsulada (Alves et al., 2011). Neste sentido nos interessou o estudo dos sistemas micelares como carreadores de fármacos.

Micelas são dispersões coloidais, com diâmetro entre 5 e 100 nm, que se formam espontaneamente, a partir de moléculas anfifílicas, sob certas condições como concentração e temperatura (Jones e Leroux, 1999; Torchlin, 2007). Devido ao seu tamanho reduzido, os carreadores micelares apresentam alta capacidade de penetração nos mais diferentes tecidos como endotélio vascular, mucosas oral, bucal, nasal e ocular (Torchlin, 2007).

Entre os constituintes de sistemas micelares, destacam-se os co-polímeros de bloco da classe dos poloxamers. Poloxamers (PL) (Lutrol®, Pluronic®, Synperonic®,

Tetronic®) são co-polímeros constituídos por unidades de óxido de etileno (OE) e óxido de propileno (OP) organizados em uma estrutura básica do tipo A-B-A, ou seja, $OE_x - OP_y - OE_x$ (ou polietilenoglicol-propilenoglicol-polietilenoglicol, PEG – PPG – PEG) sendo possível a alteração do número de unidades hidrofílicas (x para o número de unidades de OE) e hidrofóbicas (y para o número de unidades de OP). Essas unidades determinam o caráter anfifílico dessas moléculas caracterizando-as, também, por diferentes valores de balanço hidrofílico-lipofílico (Kabanov et al., 2002).

As propriedades fundamentais para aplicação dos PL como sistemas carreadores são: *i)* a alta massa molecular, podendo interagir por ligações covalentes e não-covalentes com fármacos, resolvendo problemas relacionados à solubilidade, estabilidade e permeabilidade; *ii)* a capacidade de, dependendo do tipo de PL, apresentarem funções biológicas (como a aplicação do Pluronic® L61 como inibidor de glicoproteína P, um transportador de efluxo) e, *iii)* a capacidade de responderem a estímulos no próprio local de contato com o organismo ou no sítio de ação (Kabanov et al., 2002; Dumortier et al., 2006).

Dentre os tipos de PL mais estudados encontra-se o poloxamer 407 (PL 407), comercialmente denominado Lutrol® F127 ou Pluronic® F127 (BASF Chem. Corp.). O PL 407, considerado um dos mais hidrofílicos da classe, é constituído por unidades de OE e OP arranjadas em $OE_{100}-OP_{70}-OE_{100}$, apresentando massa molar média de 12600, balanço hidrofílico-lipofílico de 22 e CMC de 2,8 μ M (Kozlov et al., 2000; Kabanov et al., 2002; Dumortier et al., 2006).

Uma das principais motivações para a ampla utilização dos PL, especialmente o PL 407, reside em sua alta biocompatibilidade, sendo aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico (Kabanov et al., 2002, Singh-Joy e McLain, 2008). Além disso, há descrições de algumas propriedades farmacológicas atribuídas ao uso de PL 407 como imunomodulação (reduzindo a ativação de neutrófilos e impedindo o reconhecimento de nanopartículas pelo sistema retículo-endotelial) (Jackson et al., 2000), a indução de crescimento de fibroblastos e a cicatrização após procedimentos cirúrgicos odontológicos (Hokett et al., 2000).

As propriedades farmacológicas da administração periférica da 15d-PGJ₂ previamente demonstradas (Pena-dos-Santos et al., 2009), destaca o uso em potencial deste agonista de receptores PPAR- γ nas condições inflamatórias da ATM. Considerando que a dor é a principal reclamação dos pacientes com DTM e as

estratégias para o controle da dor relacionada com as DTMs são insatisfatórias, o desenvolvimento do trabalho proposto vem auxiliar no desenvolvimento de uma nova conduta terapêutica para estes pacientes.

Proposição

O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do efeito analgésico e antiinflamatório da 15d-PGJ₂ em carreadores micelares (sistema poloxamer-prostaglandina J₂ – PL-PGJ₂) na dor inflamatória induzida na ATM de ratos.

Metodologia

Para realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar pesando entre 150 a 250 g mantidos sob condições experimentais controladas. Todos os procedimentos foram realizados previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UNICAMP (#2541-1 – ANEXO I) e estão de acordo com as diretrizes determinadas pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), em animais conscientes (Zimmermann, 1983) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

1.2.1. Teste comportamental: Imediatamente após a injeção intra-articular o animal já consciente, foi recolocado na câmara de observação e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min., divididos em 15 blocos de 3 min. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células (Roveroni et al., 2001). Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1 s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado (Roveroni et al., 2001). Após análise comportamental os animais foram mortos por

aprofundamento de anestesia para realização do lavado intra-articular e remoção do tecido periarticular para análises posteriores.

1.2.2. Quantificação da migração leucocitária: O lavado periarticular (10 µL) realizado com PBS contendo EDTA (1mM) foi diluído em 90 µL de PBS/EDTA e a partir deste, realizadas a contagem total e diferencial dos leucócitos.

1.2.2.1 – Contagem total dos leucócitos: Alíquotas de 10 µL do lavado articular foram diluídas em líquido de Turk, na proporção de 1:2, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual e expressa como número de células x 10⁴/cavidade articular.

1.2.2.2 – Contagem diferencial dos leucócitos: As lâminas para contagem diferencial foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota do lavado intra-articular e coradas pelo corante panótico rápido. As células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000 x), sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciando os grupos celulares.

1.2.3. Eletroforese e Western Blot para avaliação da expressão da molécula de adesão celular (ICAM) e CD55: Amostras do tecido periarticular foram homogeneizados com tampão RIPA (Santa Cruz Biotechnology). Uma alíquota do homogeneizado foi separada para dosagem de proteínas. Em seguida as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas devidamente tratadas com anticorpos apropriados para cada análise, submetidas a uma reação de quimioluminescência (ECL, Amershan Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.) para revelação do filme para análise da densitometria das bandas.

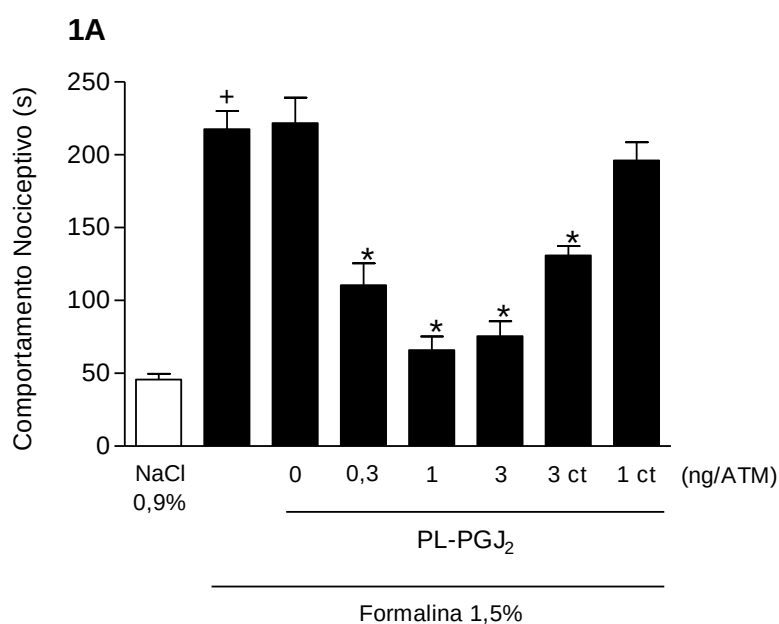
1.2.4. ELISA: As citocinas, quimiocinas e PGJ₂ foram quantificados através do homogeneizado das amostras seguindo as instruções do fabricante de cada kit.

1.2.5. Extravasamento Plasmático: Os experimentos foram replicados e após o período os tratamentos os animais foram anestesiados com uma mistura de uretano e α -cloralose (100mg/kg e 50mg/kg, respectivamente), injetada intraperitonealmente. Para averiguação da inflamação, todos os animais receberam 6mg/kg do corante Azul de Evans a 0,1% (Fiorentino et al., 1999), endovenosamente através da veia penina, vinte minutos antes do sacrifício do animal (tempo necessário para o efeito do corante). Como o corante Azul de Evans se liga às proteínas plasmáticas, o local da injeção foi identificado visualmente, de acordo com a aparência do corante extravasado (Haas et al., 1992), permitindo assim remoção adequada dos tecidos periarticulares e posterior análise do extravasamento plasmático através de técnicas espectrofotométricas.

Resultados

No desenvolvimento deste projeto demonstrou-se que a injeção intra-articular de Formalina 1,5% induz uma resposta nociceptiva significativamente maior quando comparada a resposta induzida pela injeção intra-articular de uma solução de NaCl 0,9% ($p < 0,05$; T test, Fig. 1A). O pré-tratamento com o polímero sem a 15d-PGJ₂ não alterou a resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular de Formalina 1,5% ($p > 0,05$; T test, Fig. 1A). O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (0,3; 3 e 1 ng/2μl/ATM) reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular de formalina ($p < 0,05$; ANOVA, Tukey test, Fig. 1A). Para os próximos testes foi selecionado o PL-PGJ₂ na dose de 1 ng/ATM, pois nesta dose o efeito antinociceptivo foi estritamente periférico.

Após ter sido padronizada a dose de trabalho do PL-PGJ₂, foi avaliado o tempo de disponibilidade e atividade antinociceptiva da 15d-PGJ₂ através destes carreadores micelares. Os resultados demonstraram que o efeito antinociceptivo da 15d-PGJ₂ através do sistema PL-PGJ₂ é maior nos primeiros 15 minutos de pré-tratamento da ATM. O efeito antinociceptivo do PL-PGJ₂ diminui significativamente depois de 24 horas, no entanto, se mantém por 10 dias (Fig. 1B).



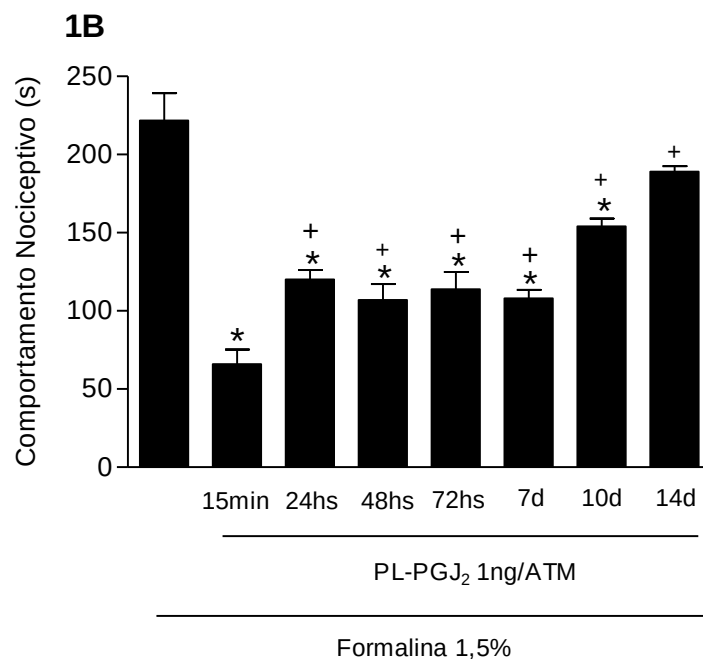


Figura 1 – Efeito do PL-PGJ₂ na nocicepção induzida pela formalina na

ATM. (A) O pré-tratamento do PL-PGJ₂ (0,3, 1 e 3 ng/ATM) reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular de formalina na ATM de ratos. A injeção contra-lateral de PL-PGJ₂ (3 ng) reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela formalina ($p > 0,05$: ANOVA, Tukey test). Penúltima coluna: A injeção contra-lateral de PL-PGJ₂ (1ng) não modificou a resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular de formalina ($p > 0,05$: ANOVA, Tukey test). O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior que o grupo NaCl 0,9% ($p < 0,05$: t test). O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente menor que a do grupo Formalina 1,5% ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). **(B)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 minutos, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 10 dias mas não 14 dias) reduziu significativamente a resposta nociceptiva induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM. O símbolo (*) indica resposta nociceptiva significativamente menor quando comparada a do grupo Formalina 1,5% ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). O símbolo (+) indica resposta nociceptiva significativamente maior quando comparada a do grupo PL-PGJ₂ 15 min + Formalina 1,5% ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test).

O desenvolvimento de novos compostos químicos e biológicos para terapêutica vem sendo um grande desafio para pesquisadores do mundo todo (Huynh et al., 2009). Neste sentido, os novos sistemas carreadores de drogas estão sendo utilizados para melhorar a especificidade de liberação das drogas nos seus respectivos tecidos-alvos (Couvreur et al., 2002; Couvreur e Vauthier, 2006). Dentre os diferentes sistemas de carreadores de drogas estão os sistemas micelares, particularmente, os

co-polímeros de bloco da classe dos poloxamers. No presente estudo, foi utilizado o Poloxamer 407 (PL-407) por sua alta biocompatibilidade, sendo aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico (Kabanov et al., 2002; Singh-Joy e McLain, 2008).

Os resultados demonstraram que a injeção intra-articular do sistema PL-PGJ₂ (1ng/ATM), uma dose 100 vezes menor que a dose efetiva da 15d-PGJ₂ sem sistemas carreadores (100 ng/ATM; Pena-dos-Santos et al., 2009), aumentou o efeito antinociceptivo periférico na ATM, mantendo este efeito por um período de 10 dias. A utilização do sistema micelar PL-407 aumentou a eficácia e a biodisponibilidade da 15d-PGJ₂ resultando em uma maior especificidade de ação da 15d-PGJ₂ no sistema trigeminal, aumentando seu efeito periférico antinociceptivo. Considerando a biocompatibilidade do PL-407 utilizado neste estudo, o sistema PL-PGJ₂ pode vir a ser uma opção terapêutica em potencial deste composto como uma nova estratégia farmacológica para o controle da dor na prática clínica.

Em outra etapa do projeto foi avaliado se o sistema PL-PGJ₂, além de aumentar a eficácia antinociceptiva da 15d-PGJ₂, também aumenta seu efeito anti-inflamatório previamente descrito (Pena-do-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012). Para isto, novos experimentos foram realizados para avaliar o efeito do sistema PL-PGJ₂ no extravasamento plasmático, migração de células inflamatórias e liberação de citocinas.

O pré-tratamento com PL-PGJ₂ (1ng/ATM) reduziu significativamente o extravasamento plasmático (Fig. 2) e migração de células inflamatórias (Fig. 4) induzidos pela Formalina 1,5% mantendo este efeito por 7 dias após o tratamento da ATM. Como foi realizada a contagem diferencial da migração de células inflamatórias, atendendo ao questionamento do assessor, o gráfico e os resultados estão descritos no item 2 deste relatório.

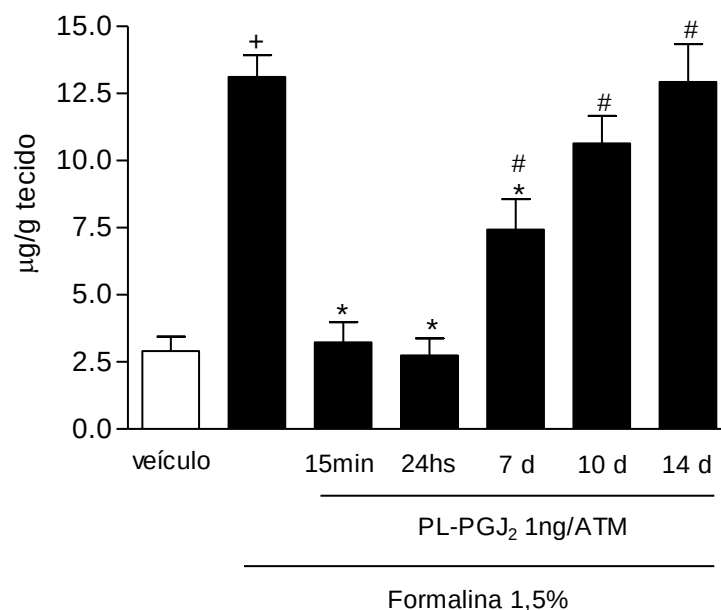


Figura 2 – Efeito do PL-PGJ₂ no extravasamento plasmático induzido pela formalina na ATM. O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 minutos, 24 horas, 7 dias mas não 10 e 14 dias) reduziu significativamente o extravasamento plasmático induzido pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM. O símbolo (+) indica extravasamento plasmático significativamente maior quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$; t test). O símbolo (*) indica extravasamento plasmático significativamente menor quando comparada a do grupo Formalina 1,5% ($p < 0,05$; ANOVA, Tukey test). O símbolo (#) indica extravasamento plasmático significativamente maior quando comparada a do grupo PL-PGJ₂ 15 min + Formalina 1,5% ($p < 0,05$; ANOVA, Tukey test).

A citocina Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α), um dos principais mediadores da cascata de hiperalgesia inflamatória (Verri et al., 2009) estimula uma outra via biológica dependente da liberação das quimiocinas CINC-1/CXCL1, as quais são responsáveis pela ativação do componente simpático da hiperalgesia inflamatória, promovendo a liberação de aminas simpáticas. O pré-tratamento com PL-PGJ₂ (1ng/ATM) reduziu significativamente a liberação da quimiocinas CINC-1, mantendo este efeito por 7 dias (Fig. 3).

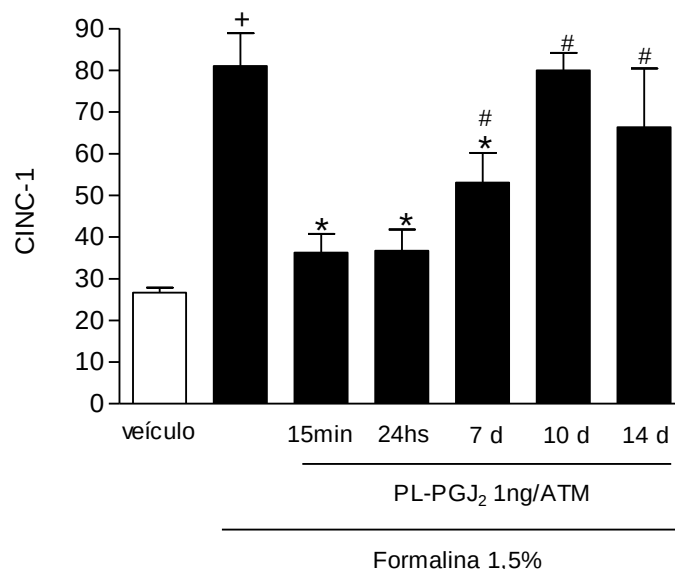


Figura 3 – Efeito do PL-PGJ₂ na liberação da quimiocinas CINC-1 induzida pela formalina na ATM. O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 minutos, 24 horas, 7 dias mas não 10 e 14 dias) reduziu liberação de CINC-1 induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM. O símbolo (+) liberação de CINC-1 significativamente maior quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$; t test). O símbolo (*) indica liberação de CINC-1 significativamente menor quando comparada a do grupo Formalina 1,5% ($p < 0,05$; ANOVA, Tukey test). O símbolo (#) indica liberação de CINC-1 significativamente maior quando comparada a do grupo PL-PGJ₂ 15 min + Formalina 1,5% ($p < 0,05$; ANOVA, Tukey test).

O pré-tratamento da ATM com PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) reduziu significativamente a migração de células inflamatórias induzida pela formalina (Fig 4). Considerando a contagem diferencial das células inflamatórias, a injeção intra-articular de formalina induziu o aumento significativo de neutrófilos (Fig.4B), linfócitos (Fig. 4C), monócitos (Fig. 4D), mastócitos (Fig. 4E) e macrófagos (Fig. 4F). O pré-tratamento com PL-PGJ₂ reduziu a migração de todos os tipos celulares:

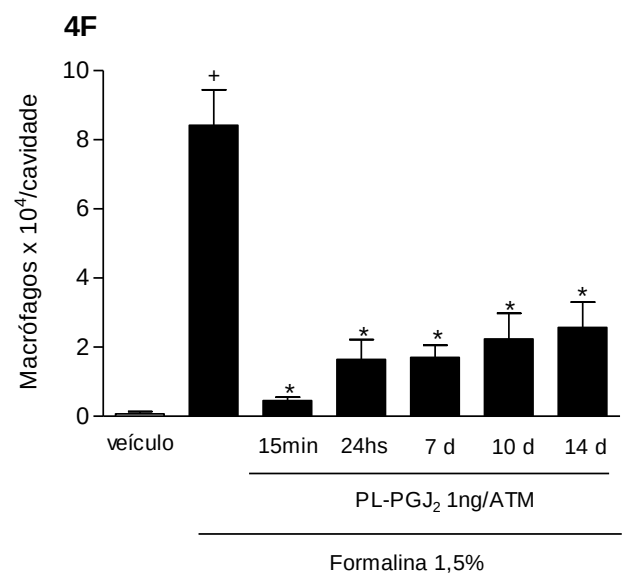
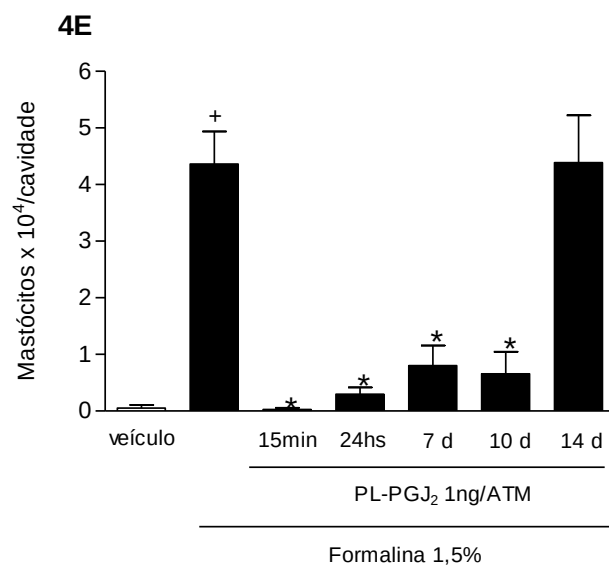
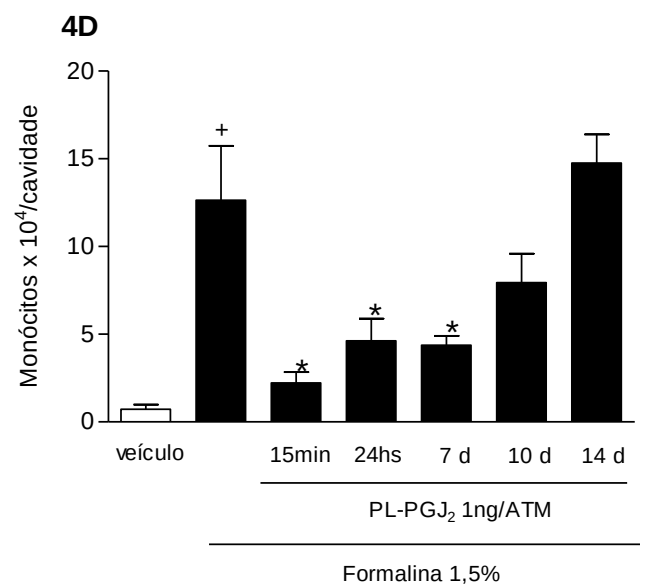
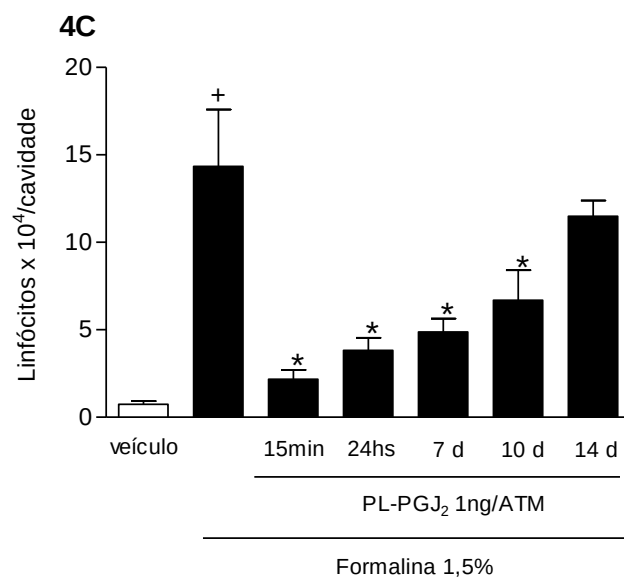
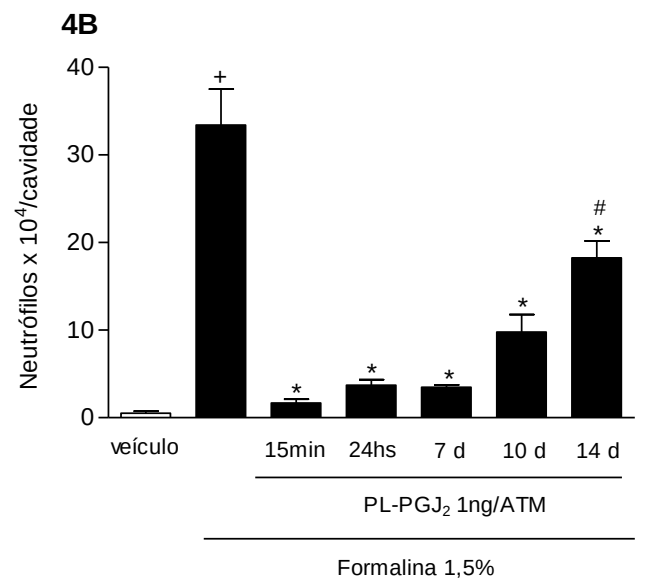
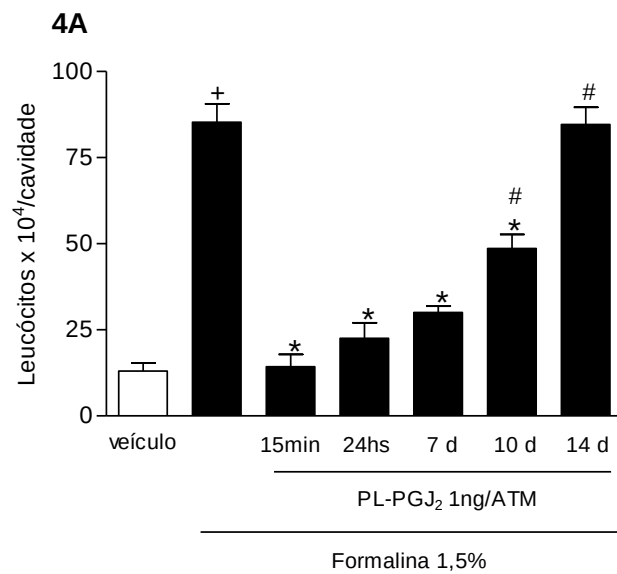


Figura 4 - Efeito do PL-PGJ₂ na migração de células inflamatórias induzida pela

formalina na ATM. (A) O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 min, 24 h, 7, 10 mas não 14 dias) reduziu significativamente a migração de células inflamatórias induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM. **(B)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 min, 24 h, 7, 10 e 14 dias) reduziu significativamente a migração de neutrófilos induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). **(C)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 min, 24 h, 7, 10 mas não 14 dias) reduziu significativamente a migração de linfócitos induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). **(D)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 min, 24 h, 7 mas não 10 e 14 dias) reduziu significativamente a migração de monócitos induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). **(E)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 min, 24 h, 7, 10 mas não 14 dias) reduziu significativamente a migração de mastócitos induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). **(F)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 min, 24 h, 7, 10 e 14 dias) reduziu significativamente a migração de macrófagos induzida pela injeção intra-articular de formalina 1,5% na ATM ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). Para todos os gráficos o símbolo (+) indica migração de células significativamente maior quando comparado ao grupo veículo ($p < 0,05$: t test). O símbolo (*) indica migração de células significativamente menor quando comparada a do grupo Formalina 1,5% ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). O símbolo (#) indica migração de células significativamente maior quando comparada a do grupo PL-PGJ₂ 15 min + Formalina 1,5% ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test).

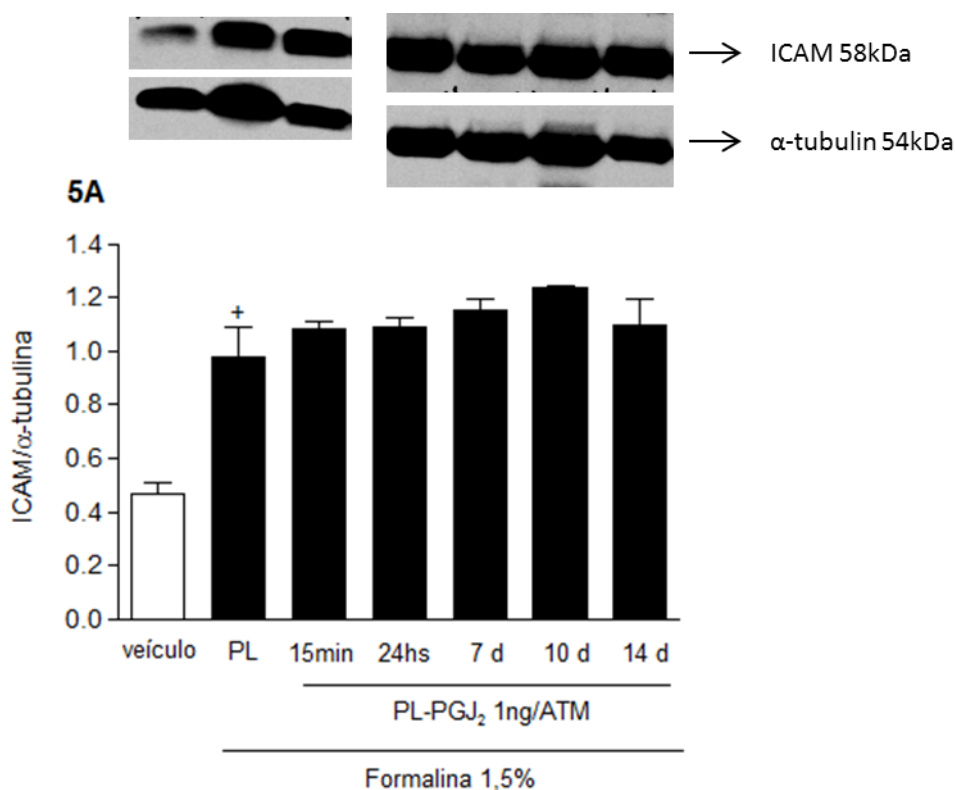
O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ promoveu significativa redução do extravasamento plasmático e migração de células inflamatórias, particularmente de neutrófilos, induzidos pela formalina na ATM, corroborando dados anteriores onde foi demonstrado o efeito antiinflamatório da 15d-PGJ₂ na ATM (Pena-dos-Santos et al., 2009; Quinteiro et al., 2012). É importante enfatizar que através deste sistema de carreadores micelares foi possível manter, não só o efeito antinociceptivo, como

também o efeito antiinflamatório efetivamente por até 7 dias após o tratamento. Levando em conta que os neutrófilos são as células predominantes no exsudato articular na fase aguda da inflamação, esse efeito antiinflamatório mantido pelo sistema PL-PGJ₂ mostra efeito protetor para as lesões articulares. De fato, a inibição da migração de neutrófilos é direta e positivamente associada com o benefício terapêutico em artropatias inflamatórias (Lefkowitz et al., 1999). O recrutamento de neutrófilos em um tecido inflamado é uma cadeia complexa de interações de seqüências adesivas entre leucócitos e células endoteliais e/ou componentes da matriz extracelular.

Essas interações adesivas entre leucócitos e células endoteliais são desencadeadas e moduladas por moléculas de adesão. A aderência leucocitária ocorre após a ligação de integrinas leucocitárias a membros da superfamília de imunoglobulinas, dentre eles destaca-se proteína transmembrana denominada molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) expressa em células endoteliais (Campbell et al., 1996, 1998). Considerando que o mecanismo do processo inflamatório envolve adesão de neutrófilos e sua transmigração mediados pelas integrinas do tipo $\beta 2$, os quais se interagem com a ICAM, levantamos a hipótese de que o efeito antiinflamatório da PL-PGJ₂ se deve, pelo menos em parte, pela diminuição da expressão da ICAM. No entanto nossos resultados demonstraram que a PL-PGJ₂ não interfere na expressão da ICAM durante o processo inflamatório induzido pela formalina na ATM de ratos (Fig. 5A).

Apesar da ICAM-1 estar presente na maioria das células endoteliais e estar diretamente envolvida na adesão e transmigração de células durante o processo inflamatório, outros mediadores como o Fator de Aceleração de Decaimento (também conhecido como CD55) também interferem neste processo. Ao contrário da ICAM-1,

o CD55 é uma molécula anti-adesiva que promove a depuração da ligação dos leucócitos com as células endoteliais. Tem sido demonstrado que existe uma interação entre o CD55 e a ICAM-1 (Shafren et al., 2000), e esta interação limita a ligação de leucócitos com a ICAM-1. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento da 15d-PGJ₂ (1 ng/ATM) aumentou significativamente a expressão da CD55. Estes dados corroboram um estudo recente onde foi demonstrado que a 15d-PGJ₂ foi capaz de aumentar a expressão da molécula CD55 no tecido gengival (Napimoga et al., 2012). Sendo assim é possível sugerir que na ATM, a redução da migração de células inflamatórias pelo sistema PL-PGJ₂ é mediado pelo aumento da expressão da molécula CD55 (Fig. 5B).



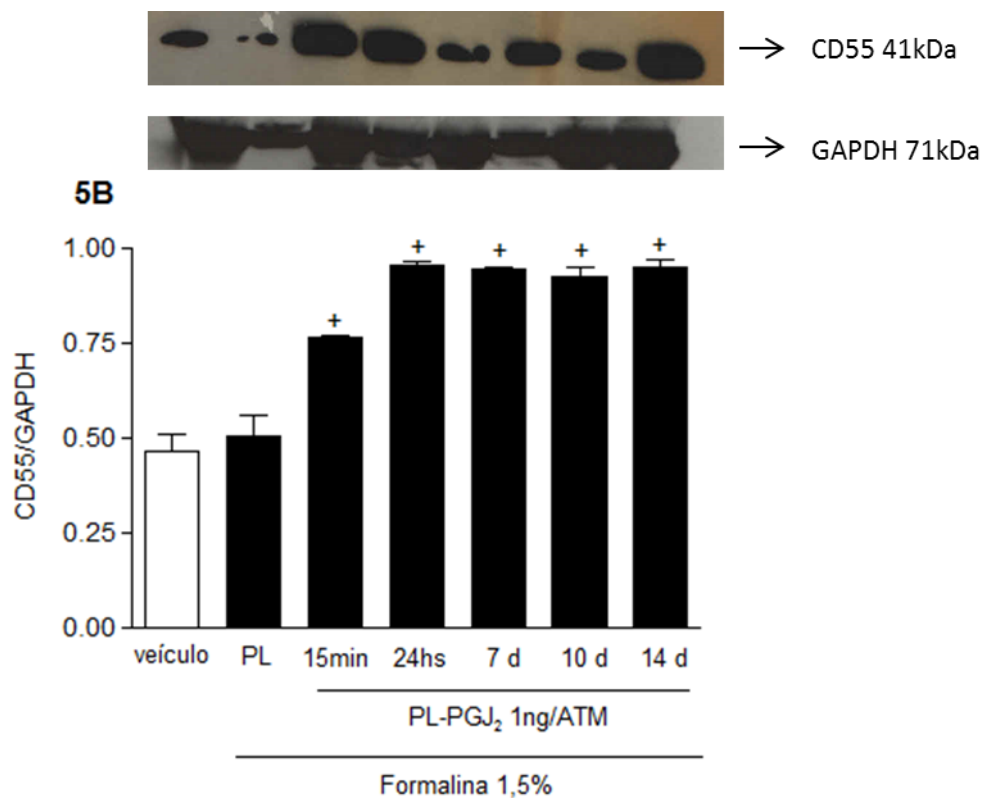


Figura 5 – Efeito do PL-PGJ₂ na expressão da ICAM e CD55 na ATM de ratos. (A) O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1 ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo não reduziu a expressão da ICAM ($p > 0,05$: ANOVA, Tukey test) induzida pela injeção de formalina na ATM de ratos. O símbolo (+) indica expressão da ICAM significativamente maior quando comparada ao grupo veículo ($p < 0,05$: t test). **(B)** O pré-tratamento com o PL-PGJ₂ (1ng/ATM) em diferentes intervalos de tempo (15 mi, 24 h, 7, 10 e 14 dias) aumentou significativamente a expressão da molécula CD55 ($p < 0,05$: ANOVA, Tukey test). O símbolo (+) indica expressão da molécula CD55 significativamente maior quando comparada ao grupo veículo ($p < 0,05$: t test).

Referências Bibliográficas:

- Campbell, J.J.; Hedrick, J., Zlotnik, A.; Siani, M. A.; Thompson, D. A.; Butcher, E.C. Science 1998; 279(5349):381-384.
- Campbell, J.J.; Qin, S.; Bacon, K. B.; Mackay, C. R.; Butcher, E. C. J. Cell Biol 1996; 134(1):255-266.
- Couvreur P, Vauthier C. Pharm Res 2006;23:1417–50.
- Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2002;19:99-134.
- Cunha, F.Q. et al. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. Br. J. Pharmacol., v.104, n.3, p.765-767, 1991.
- Fiorentino, P.M., Cairns, B.E. and Hu, J.W., Arch Oral Biol. 1999; 44: 27-32.
- Haas D.A., Nakanishi, O., MacMillan, R.E., Jordan, R.C. and Hu, J.W. Arch Oral Biol. 1992; 37.
- Huynh, N.T., et al. Int. J. Phytoremediation. 2009; 379: 201–209.
- Kabanov AV, Batrakova EV, Alakov VY. J. Control. Rel. 2002, 82: 189-212.
- Lefkowitz D.L., Gelderman M.P, Fuhrman S.R., Grahams., Starnes J.D.3rd, Lefkowitz S.S., Bollenna., Moguilevsky N. Clin immunol, 1999; 91 (2): 145-155.
- Napimoga MH, da Silva CA, Carregaro V, Farnesi-de-Assunção TS, Duarte PM, de Melo NF, Fraceto LF. J Immunol. 2012; 189(2):1043-52.
- Pena-dos-Santos DR, et al. Neuroscience. 2009; 163: 1211–1219.
- Quinteiro MS, Napimoga MH, Mesquita KP, Clemente-Napimoga JT. Eur J Pain. 2012; 16(8):1106-15.
- Rodrigues LL, Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, de Arruda Veiga MC, Parada CA, Tambeli CH. J Pain. 2006 Dec; 7(12): 929-36.
- Roveroni, R.C., Parada, C.A., Cecilia, M., Veiga, F.A. and Tambeli, C.H., Pain. 2001; 94: 185-91.
- Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? Clin Immunol. 2005 Feb;114(2):100-9.

- Shafren, D. R., D. J. Dorahy, R. F. Thorne, R. D. Barry. J. Gen. Virol. 2000; 81: 889–894.
- Singh-Joy SD, McLain VC Int. J. Toxicol. 2008,2:93-128.
- Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Pharmacol Ther. 2006; 112(1): 116-138.