



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

VICTOR AUGUSTO BENEDICTO DOS SANTOS

NANOCÁPSULAS DE POLI(ÉPSILON-CAPROLACTONA)
CONTENDO INDOMETACINA E ÔMEGA-3:
Potencial terapêutico no controle da artrite reumatoide
na articulação temporomandibular de ratos

PIRACICABA

2024

VICTOR AUGUSTO BENEDICTO DOS SANTOS

NANOCÁPSULAS DE POLI(ÉPSILON-CAPROLACTONA)

CONTENDO INDOMETACINA E ÔMEGA-3:

Potencial terapêutico no controle da artrite reumatoide

na articulação temporomandibular de ratos

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO VICTOR
AUGUSTO BENEDICTO DOS SANTOS, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO.

PIRACICABA

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

Sa59n Santos, Victor Augusto Benedicto dos, 1995-
Nanocápsulas de poli(epsilon-caprolactona) contendo indometacina e
ômega-3 : potencial terapêutico no controle da artrite reumatoide na articulação
temporomandibular de ratos / Victor Augusto Benedicto dos Santos. –
Piracicaba, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Sidney Figueroba Raimundo.
Coorientador: Francisco Carlos Groppo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Articulação temporomandibular. 2. Ácidos graxos ômega-3. 3.
Indometacina. 4. Inflamação. 5. Nanotecnologia. I. Figueroba Raimundo,
Sidney, 1963-. II. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. III. Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules containing indomethacin
and omega-3 : therapeutic potential in the control of rheumatoid arthritis in the
temporomandibular joint of rats

Palavras-chave em inglês:

Temporomandibular joint

Omega-3 fatty acids

Indomethacin

Inflammation

Nanotechnology

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Sidney Figueroba Raimundo [Orientador]

Cristiane de Cássia Bergamaschi

Tamires Patricia Souza

Fernanda Miori Pascon

Camila Batista da Silva de Araujo Candido

Data de defesa: 17-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Odontologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-1715-7146>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7783636880087531>

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 17 de junho de 2024, considerou o candidato VICTOR AUGUSTO BENEDICTO DOS SANTOS aprovado.

PROF. DR. SIDNEY FIGUEROBA RAIMUNDO

PROF^ª. DR^ª. CRISTIANE DE CÁSSIA BERGAMASCHI

PROF^ª. DR^ª. TAMIRES PATRICIA SOUZA

PROF^ª. DR^ª. FERNANDA MIORI PASCON

PROF^ª. DR^ª. CAMILA BATISTA DA SILVA DE ARAUJO CANDIDO

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, especialmente à minha mãe, Lúcia, e à minha irmã, Vanessa, por nunca terem deixado de investir em mim e por me acolherem em todos os momentos que precisei;

Ao meu noivo, Robson de Sousa Ferreira, por ter me incentivado desde a Graduação a continuar estudando e por ter me apoiado incondicionalmente;

Ao meu amigo e pai científico, Sidney Figueroba Raimundo, por todo o investimento e cuidado, além dos ensinamentos e memórias que irão me acompanhar pelo resto da vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do seu magnífico reitor Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu digníssimo diretor Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar e diretora associada Prof^ª. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (132615/2020-7) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - código de financiamento 001 pelas bolsas de estudo.

Ao presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão e à equipe técnica da Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Sr^ª. Ana Paula Carone Gonzalez, Sr^ª Claudinéia Prata Pradella, Sr^ª. Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, Sr. Leandro Viganó e Sr^ª. Raquel Q. Marcondes Cesar, pela solicitude e presteza de seus serviços.

Ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, Chefe do Departamento de Biociências da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo e meu coorientador Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, por toda orientação e apoio para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, os quais foram valiosos durante minha formação.

À técnica da área de farmacologia, Eliane Melo e à secretária Maria Elisa dos Santos, pelo carinho e alegria no exercício de suas funções.

Aos meus colegas de graduação e pós-graduação, que estiveram comigo tornando os momentos mais agradáveis.

Ao Prof. Marlus Chorilli e doutoranda Amanda Silvestre (Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Unesp) e ao Prof. Adilson Sartoratto (Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - Unicamp) pela incrível colaboração e suporte durante a execução da pesquisa.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Apesar da minha gratidão ir muito além do que consigo expressar aqui, deixo como lembrança alguns agradecimentos especiais:

Por todo apoio, amizade, abrigo de emoções tempestuosas, diversos momentos eternizados e conhecimento que pude adquirir com vocês: Adriano Luis Martins, Ana Cristina do Amaral Godoy (Aninha), Eliane Melo Franco (Eli), Fabiana Facco Casarotti (Fabi), Fábio Vinícius Borges Padilha (Fabinho), Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Maicon Ricardo Zieberg Passini (Maiconzinho) e Maria Aparecida Santiago Varella (Cidinha).

Pelos ensinamentos, oportunidades, confiança e apoio em toda circunstância e provação nesse longo percurso: Prof^ª. Camila Batista da Silva de Araujo Candido, Prof. Francisco Carlos Groppo, Prof. Marcelo Rocha Marques e Prof. Sidney Figueroba Raimundo.

Pela amizade, ensinamentos e oportunidade de trabalhar com vocês: Prof. Américo Bortolazzo Correr, Prof^ª. Elisa Bizetti Pelai, Prof^ª. Fernanda Miori Pascon, Prof^ª. Marina Angélica Marciano da Silva, Prof^ª. Michelle Franz Montan Braga Leite e Prof^ª. Talita Tartari.

Pelo companheirismo, momentos de risada, lágrimas, cafés, emoções e momentos que fizeram parte da minha (re)construção, por área:

Cariologia: Robson Ferreira;

Endodontia: Ana Cristina Janini, Carolina Wanderico, Erica Lopes, Pedro Ivo Fagundes, Rodolfo Figueiredo e Walbert Vieira;

Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica: Daniel Paiva, Edith Lima, Gabriela Saqui, Gustavo Vargas, Josilanny Alencar, Larissa Malavazi, Luiz Ferreira, Maria Cristina Pedrazini, Michael Monteiro, Rafaela Carvalho, Roberta Monteiro e Thomas Barbin;

Fisiologia Oral: Iago Sousa;

Gestão e Saúde Coletiva: Carmem Bastos e Jean Baioni;

Histologia e Embriologia: Vitor da Costa e Willian Peter Boelcke;

Materiais Dentários: João Marcos Batista, May Anny Fraga e Vanessa Munhoz;

Microbiologia e Imunologia: Eduardo Martinelli Franco;

Odontopediatria: Ana Luisa Theodoro, Carla Gois e Ranam Reis;

Prótese Dental: Thaís Barbin.

“Entre o início da pós-graduação e a defesa, haverá muitos acontecimentos que não terão lugar para serem registrados no Currículo Lattes. Por isso, viva intensamente e com atenção, pois algumas emoções serão únicas.”

Victor Augusto

RESUMO

A articulação temporomandibular (ATM) é afetada por disfunções como a artrite reumatoide, causando dor e limitações. Os tratamentos incluem fisioterapia, acupuntura, anti-inflamatórios como a indometacina, e ácidos graxos ômega-3, porém, a nanotecnologia, por meio das nanocápsulas, pode oferecer tratamentos mais inovadores e que apresentem melhor biodisponibilidade em comparação com as formas convencionais. Este estudo partiu da síntese e caracterização de uma nanocápsula contendo indometacina, um núcleo oleoso de ômega-3 e parede polimérica composta por poli (ϵ -caprolactona) para o tratamento da artrite reumatoide. Inicialmente, investigou-se os efeitos dos tratamentos com indometacina e ômega-3, de forma livre e encapsulado, em cultura de células para avaliar a viabilidade celular frente aos tratamentos. Em seguida, 48 ratos Wistar machos adultos (n=6) foram utilizados para verificar os efeitos das nanocápsulas sobre a IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10, sobre a arquitetura óssea, morfologia da cartilagem do côndilo e espessura do disco articular. Além dos grupos experimentais, o estudo utilizou um grupo Controle Negativo sem a doença e um grupo Controle Positivo com a doença sem receber tratamento. Com exceção do grupo Controle Negativo, os ratos passaram por indução da artrite reumatoide utilizando Adjuvante Completo de Freund (CFA) e colágeno bovino tipo II (CII) via intradérmica na base da cauda e foram tratados por 7 dias via intragástrica. As nanocápsulas apresentaram formato redondo e bem definido, diâmetro <250 nm, índice de polidispersão <0,2 e potencial zeta máximo de -13,3, além de menos toxicidade em cultura celular de macrófagos RAW 264.7 em relação aos tratamentos de forma livre. Ao analisar a ATM e o disco articular dos ratos em lâminas histológicas coradas em azul de toluidina, o grupo Controle Positivo apresentou as menores espessuras de cartilagem e disco, além da desorganização nas camadas do côndilo devido a presença da doença, enquanto os grupos experimentais apresentaram melhora significativa na espessura e restauraram a organização das camadas. A matriz de colágeno observada em lâminas histológicas coradas em picrossirius vermelho e observadas em luz polarizada, e volume ósseo e espessura trabecular, analisados em microtomografia computadorizada foram reduzidos no grupo Controle Positivo em relação aos grupos experimentais e grupo Controle Negativo, contudo, o número de trabéculas não foi afetado. No ensaio imunológico, foi possível notar reduções significativas para todos os grupos experimentais em relação ao grupo Controle Positivo na IL-1 β , IL-6 e TNF- α , além de um aumento significativo na IL-10. Os grupos tratados com as nanocápsulas utilizando a menor concentração de indometacina apresentaram resultados semelhantes ou superiores aos demais tratamentos em diversas comparações, desde a redução da citotoxicidade, redução expressiva na IL-1 β , melhor organização do tecido articular e aumento da espessura da cartilagem condilar e do disco articular. Os resultados sugerem uma possíveis alternativas no tratamento da artrite reumatoide, como a redução na concentração da indometacina, administração do ômega-3 com a indometacina e o nanoencapsulamento como adjuvante no tratamento da artrite reumatoide.

Palavras-chave: Articulação Temporomandibular. Ácidos Graxos Ômega-3. Indometacina. Inflamação. Nanotecnologia.

ABSTRACT

The temporomandibular joint (TMJ) is affected by disorders such as rheumatoid arthritis, causing pain and limitations. Treatments include physical therapy, acupuncture, anti-inflammatories such as indomethacin, and omega-3 fatty acids. However, nanotechnology, through nanocapsules, can offer more innovative treatments with better bioavailability compared to conventional forms. This study started with the synthesis and characterization of a nanocapsule containing indomethacin, an omega-3 oily core and a polymeric wall composed of poly (ϵ -caprolactone) for the treatment of rheumatoid arthritis. Initially, the effects of treatments with indomethacin and omega-3, in free and encapsulated form, were investigated in cell culture to evaluate cell viability in response to the treatments. Then, 48 adults male Wistar rats (n=6) were used to verify the effects of nanocapsules on IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-10, on bone architecture, condylar cartilage morphology and articular disc thickness. In addition to the experimental groups, the study used a Negative Control group without the disease and a Positive Control group with the disease without receiving treatment. Except for the Negative Control group, the rats underwent rheumatoid arthritis induction using Complete Freund's Adjuvant (CFA) and bovine collagen type II (CII) intradermally at the base of the tail and were treated for 7 days intragastrically. The nanocapsules presented a round and well-defined shape, diameter <250 nm, polydispersity index <0.2 and maximum zeta potential of -13.3, in addition to less toxicity in RAW 264.7 macrophage cell culture compared to free form treatments. When analyzing the TMJ and articular disc of rats in histological slides stained with toluidine blue, the Positive Control group presented the smallest cartilage and articular disc thicknesses, in addition to disorganization in the condylar layers due to the presence of the disease, while the experimental groups presented significant improvement in thickness and restored the organization of the layers. The collagen matrix observed in histological slides stained with picosirius red and observed in polarized light, and bone volume and trabecular thickness, analyzed in computed microtomography, were reduced in the Positive Control group in relation to the experimental groups and Negative Control group; however, the trabecular number was not affected. In the immunological assay, it was possible to observe significant reductions for all experimental groups in relation to the Positive Control group in IL-1 β , IL-6 and TNF- α , in addition to a significant increase in IL-10. The groups treated with nanocapsules using the lowest concentration of indomethacin showed similar or superior results to the other treatments in several comparisons, including reduced cytotoxicity, significant reduction in IL-1 β , better organization of joint tissue and increased thickness of condylar cartilage and articular disc. The results suggest possible alternatives in the treatment of rheumatoid arthritis, such as reducing the concentration of indomethacin, administering omega-3 with indomethacin and nanoencapsulation as an adjuvant in the treatment of rheumatoid arthritis.

Keywords: Temporomandibular Joint. Fatty Acids, Omega-3. Indomethacin. Inflammation. Nanotechnology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 A ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR	12
2.2 DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES E A ARTRITE REUMATOIDE	12
2.3 TRATAMENTOS PARA AS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES	13
2.4 A NANOTECNOLOGIA COMO ADJUVANTE NO TRATAMENTO	16
3 PROPOSIÇÃO	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 MATERIAIS E SUBSTÂNCIAS	19
4.2 NANOCÁPSULAS.....	19
4.2.1 Síntese das nanocápsulas	19
4.2.2 Caracterização das nanocápsulas	21
4.2.3 Eficiência de encapsulação	21
4.3 CULTURA CELULAR	22
4.3.1 Densidade celular.....	22
4.3.2 Viabilidade celular por redução de MTT	23
4.4 ANIMAIS	23
4.4.1 Cálculo amostral	24
4.4.2 Indução da artrite reumatoide	24
4.4.3 Delineamento dos tratamentos	24
4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	25
4.5.1 Histologia e histomorfometria	25
4.5.2 Imunoensaio.....	26
4.5.3 Microtomografia computadorizada.....	27
4.6 ANÁLISES DOS DADOS.....	27
5. RESULTADOS	28
5.1 NANOCÁPSULAS.....	28
5.1.1 Caracterização das nanocápsulas	28
5.1.2 Quantificação de indometacina das nanocápsulas e eficiência de encapsulação	30
5.2 VIABILIDADE CELULAR	32
5.2.1 Densidade celular.....	32
5.2.2 Viabilidade celular por redução de MTT	32
5.3 HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA	33
5.4 IMUNOENSAIO	37
5.5 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA	38
6. DISCUSSÃO.....	39
6.1 Síntese e caracterização das nanocápsulas	39
6.2 Viabilidade celular por redução de MTT	40
6.3 Análise imunológica e morfológica da articulação temporomandibular	41
7. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS.....	56
ANEXO 1 – Certificado CEUA 1 (2020)	56
ANEXO 2 – Certificado CEUA 2 (2023)	57
ANEXO 3 – Relatório de Plágio.....	58

1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é uma junção sinovial entre a mandíbula e a base do crânio, com um disco articular de tecido conjuntivo na cavidade articular, delimitada pela cápsula articular, apresentando o côndilo mandibular da articulação revestido por fibrocartilagem (Alomar et al. 2007), que apresenta zonas histológicas distintas que permitindo adaptabilidade (Fan et al. 2021).

O desenvolvimento de disfunções temporomandibulares (DTMs) pode causar sintomas como dores, ruídos articulares e limitação na abertura da boca. Fatores como idade, sexo, hormônios, traumas e estresse psicológico podem predispor a essas disfunções, além de doenças inflamatórias e degenerativas, como osteoartrite e artrite reumatoide (AR), também podem contribuir para anormalidades estruturais na ATM. A AR é uma doença autoimune que causa destruição das articulações e pesquisas que utilizam modelos animais para indução da artrite reumatoide na ATM são utilizados para estudar essa condição (Figueroba et al. 2014; Holwegner et al. 2015; Ananias et al. 2023).

Os tratamentos para as DTMs variam de acordo com a gravidade e as queixas do paciente, podendo ser não medicamentosos, como fisioterapia, acupuntura, agulhamento seco e placas de oclusão (Armijo-Olivo et al. 2016; Albagieh et al. 2023; Mohamad et al. 2024; Ozmen e Unuvar 2024). Quando insuficientes, os tratamentos medicamentosos, como anti-inflamatórios e relaxantes musculares podem ser utilizados (Dym e Israel 2012). Dentre os anti-inflamatórios não esteroides, a indometacina é uma opção para dor e inflamação na artrite reumatoide (Nalamachu e Wortmann 2014). Além disso, os ácidos graxos ômega-3 têm sido estudados por sua importância no organismo como alternativa para o controle de doenças de base inflamatória, inclusive a artrite reumatoide (Dyerberg et al. 1975; Parolini 2023).

Como adjuvante dos tratamentos farmacológicos, a nanotecnologia, que manipula nanopartículas, como as nanocápsulas, trazem características únicas que podem ser ajustadas para melhorar a biodisponibilidade do fármaco encapsulado (Sahoo et al. 2007; Mora-Huertas et al. 2010).

Além do desenvolvimento das nanocápsulas, esse estudo buscou identificar os possíveis desfechos de animais com artrite reumatoide tratados por via intragástrica (gavagem) com ômega-3 e indometacina, duas alternativas no tratamento farmacológico para o controle da inflamação, de forma livre e encapsuladas, avaliando as ATMs desses animais por meio de histologia, microtomografia computadorizada e ensaios imunológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

A articulação temporomandibular (ATM) é uma articulação sinovial de união entre a mandíbula e a base do crânio, tendo o disco articular como um tecido conjuntivo associado encontrado na cavidade articular, que por sua vez, é delimitada pela cápsula articular. A parte interior da cápsula articular é composta pela membrana sinovial, responsável pela secreção de líquido sinovial e manter articulação saudável. O côndilo mandibular, porção pertencente à articulação temporomandibular, tem sua superfície revestida de fibrocartilagem, diferente de outras articulações sinoviais, que são revestidas por cartilagem hialina (Alomar et al. 2007).

A fibrocartilagem possui uma capacidade adaptativa aos movimentos, permitindo uma melhor resistência ou capacidade de reparo. Além disso, apresenta quatro zonas histológicas: a primeira, chamada de camada fibrosa, é uma camada densa e fica na região superior do côndilo; a segunda camada, chamada de proliferativa, apresenta proteoglicanos e células que permitem a sua adaptação morfológica; a terceira, chamada de maturada, apresentam condrócitos maturados e recebem células-tronco de fibrocartilagem da zona mais superficial; e a quarta camada, chamada de hipertrófica, apresenta grupos de condrócitos hipertróficos organizados. Abaixo, a zona de cartilagem calcificada seguida do osso subcondral (Fan et al. 2021).

2.2 DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES E A ARTRITE REUMATOIDE

A articulação temporomandibular (ATM), quando em condições desfavoráveis, pode desenvolver disfunções temporomandibulares (DTMs), acarretando sinais e sintomas como ruídos e dores articulares, cefaleias, cansaço muscular e limitação na abertura da boca (Romero-Reyes e Bassiur 2024). Essas disfunções apresentam uma etiologia complexa, tendo como fatores predisponentes mais comuns a idade, sexo, fatores hormonais, traumas e estresse psicológico, podendo levar à uma adaptação fisiológica, ou uma desorganização na ATM. Além disso, doenças de caráter inflamatório e degenerativas, como osteoartrite e artrite reumatoide, podem ser um fator predisponente para anormalidades estruturais (Figueroba et al. 2014).

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune e a destruição das articulações é uma de suas características. Apesar dos fatores reumatoides serem importantes para o seu diagnóstico, sua presença em pacientes saudáveis ou ausência em pacientes com a doença, pode sugerir a participação de distúrbios imunes inatos no desenvolvimento da AR (Firestein

2003). A partir de células T imunorreativas, juntamente de citocinas pró-inflamatórias, os fibroblastos sinoviais são estimulados a expressarem RANKL, um membro da família de citocinas do fator de necrose tumoral (TNF), responsável pela diferenciação dos osteoclastos, e metaloproteinases de matriz, responsáveis pela destruição da cartilagem (Croft et al. 2019) (Figura 1). Nesses processos, é possível encontrar citocinas em concentrações elevadas no fluido sinovial de pacientes, como IL-1 β , TNF- α , IL-6 (Kaneyama et al. 2002). Essas citocinas desempenham um papel importante na AR, promovendo inflamação local, reabsorção óssea, e aumento de expressão de RANKL nos fibroblastos sinoviais, aumentando a osteoclastogênese (Takayanagi et al. 2000).

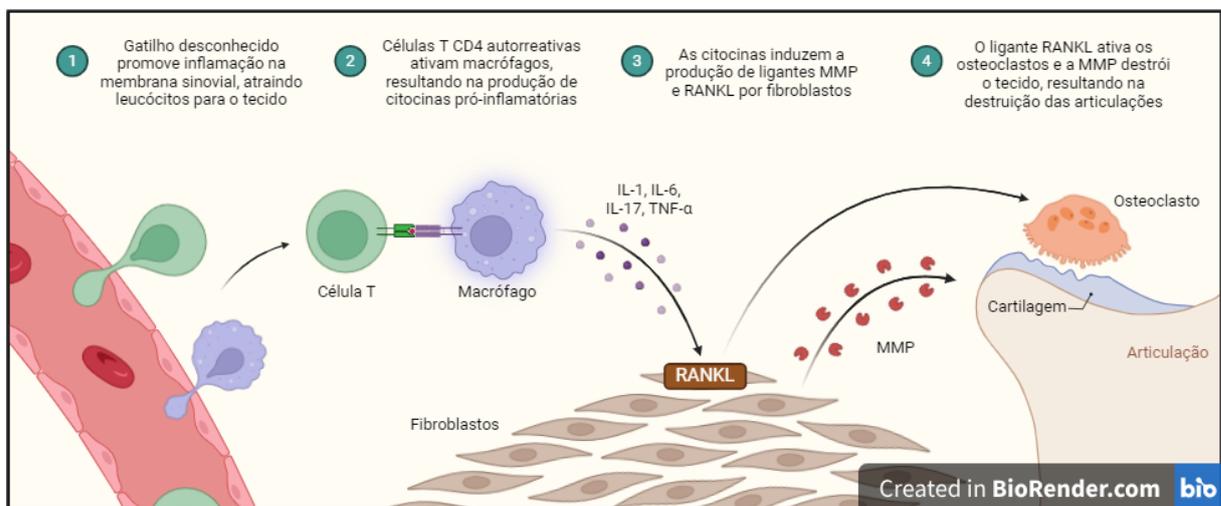


Figura 1 - Patogênese da artrite reumatoide. Adaptado de "Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis", criado por "Akiko Iwasaki" usando BioRender.com (2024). Obtido em <https://app.biorender.com/biorender-templates>

Dentre os modelos animais para indução da inflamação na ATM, há os métodos físicos, como aumento de dimensão vertical, rompimento da zona bilaminar ou sobrecarga da articulação temporomandibular (Nicoll et al. 2010; Figueroba et al. 2014), e químicos, como a utilização de carragenina, ovalbumina ou adjuvante completo de Freund (CFA) (Bendele 2001; Habu et al. 2002; Holwegner et al. 2015). A partir do CFA, um composto de *Mycobacterium tuberculosis* dessecada em óleo, é possível induzir a artrite reumatoide patologicamente idêntica àquela que ocorre em seres humanos sistemicamente ou diretamente na ATM (Bendele 2001; Ananias et al. 2023).

2.3 TRATAMENTOS PARA AS DISFUNÇÕES TEMPOROMANDIBULARES

Atualmente, as opções de tratamento para as DTMs podem variar de acordo com a gravidade e as queixas do paciente. Esses tratamentos podem ser não medicamentosos, como fisioterapia (Armijo-Olivo et al. 2016), acupuntura (Mohamad et al. 2024), agulhamento seco

(Ozmen e Unuvar 2024) e placas de oclusão (Albagieh et al. 2023). Contudo, é possível que esses tratamentos não sejam suficientes para resolver ou aliviar o problema, sendo assim, os tratamentos medicamentosos podem ser uma opção. Por via oral, anti-inflamatórios, relaxantes musculares, benzodiazepínicos, antidepressivos e analgésicos podem ser opções menos invasivas para o controle da dor (Dym e Israel 2012). Há também opções consideradas invasivas, como os tratamentos por via intra-articular, com injeções de ácido hialurônico, toxina botulínica, plasma rico em plaquetas e anti-inflamatórios esteroidais (Andre et al. 2022), porém esse último com riscos de reações erosivas no osso e cartilagem (Caporali et al. 2013).

Dentre os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), a indometacina é uma alternativa para a dor e inflamação na artrite reumatoide (Nalamachu e Wortmann 2014). Derivada do ácido indolácetico, a indometacina ($C_{19}H_{16}ClNO_4$) é praticamente insolúvel em água, com pK_a de 4,5 e apresenta atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória. Tem como mecanismo de ação a inibição da cicloxigenase, impedindo a produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. É indicada para tratamento de artrite reumatoide, osteoartrite, artrite gotosa e tendinite, ainda, sua absorção pelo trato gastrointestinal é rápida, porém sua taxa de absorção é reduzida e retardada quando ingerida com alimentos sem afetar sua biodisponibilidade (Lucas 2016). Em adição à inibição da cicloxigenase, a indometacina também apresenta efeito sobre IL-6 e TNF- α , como demonstrado em alguns estudos a sua efetividade para o controle da condição inflamatória (Liu et al. 2019), além de mediar a destruição óssea (Jung et al. 2014).

Além dos AINEs, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) do tipo ômega-3 têm sido estudados quanto sua importância no nosso organismo, e desde então, o seu consumo tem sido alvo de inúmeros estudos (Dyerberg et al. 1975). Em conjunto com hábitos saudáveis, podem ter participações importantes no organismo, como na resolução da inflamação (Calder 2015; Parolini 2023).

As duas maiores famílias de AGPI de cadeia longa são do tipo ômega 3 e 6 (ω -3 e ω -6), e geralmente, os AGPI são classificados pelo número de carbonos, número de insaturações e a classificação dos grupos ômega (Figura 2). A classificação dos grupos ômega dessas moléculas acontece em função da localização da primeira ligação dupla entre carbonos, saindo do último carbono da molécula (carbono ômega) em direção ao primeiro carbono mais próximo do grupo carboxilo (carbono alfa). Sendo assim, por exemplo, um AGPI que recebe a primeira insaturação no terceiro carbono a partir do carbono ômega é chamado de ômega-3 (Saini et al. 2021). Os ômega-3 EPA e DHA são encontrados em peixes de águas frias, mas a

quantidade pode variar até mesmo dentro da mesma espécie, isso porque as estações do ano, o local, idade e dieta dos peixes podem influenciar no ômega-3 desses peixes (Racine e Deckelbaum 2007).

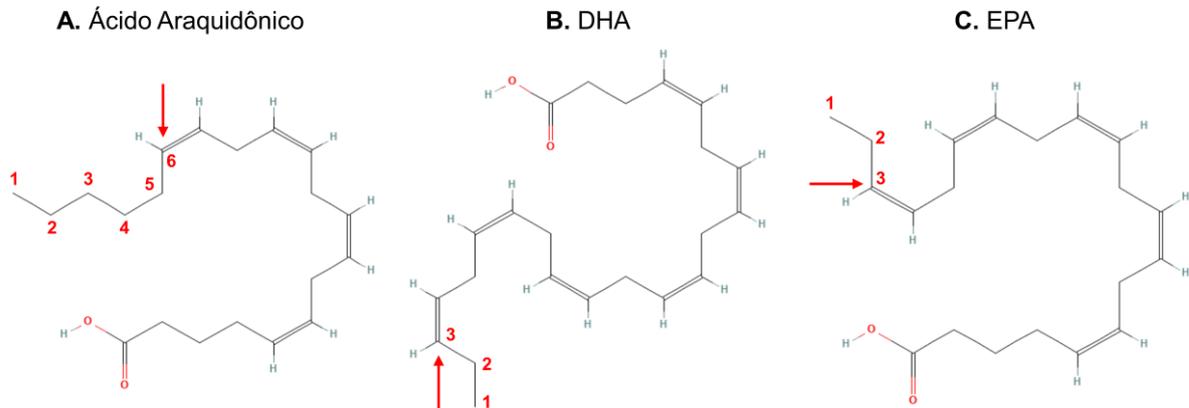


Figura 2 - Contagem de carbonos e localização da primeira insaturação no Ácido Araquidônico, Ácido Docosahexaenóico (DHA) e Ácido Eicosapentaenóico (EPA). Fonte: *National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 446284, Icosapent; CID 445580, Doconexent; CID 444899, Arachidonic Acid.*

Na família dos ácidos graxos ômega-6, o ácido araquidônico desempenha um papel significativo, uma vez que seus derivados são os principais sinalizadores e mediadores de processos inflamatórios, conhecidos como eicosanóides, moléculas derivadas de ácidos graxos insaturados de 20 carbonos (Wiktorowska-Owczarek et al. 2015). Por meio de cicloxigenases, o ácido araquidônico é convertido em prostanoídes de série 2, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina I₂ (PGI₂) e tromboxano A₂ (TXA₂), que promovem ação pró-inflamatória, agregação plaquetária e vasoconstrição. Além disso, por meio de lipoxigenases, a conversão também é feita em leucotrienos de série 4, responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção da inflamação (Wiktorowska-Owczarek et al. 2015) (Figura 3A). Contudo, quando os ácidos graxos ômega-3 são metabolizados por cicloxigenases e lipoxigenases, resultam em prostanoídes e leucotrienos de séries 3 e 5, respectivamente, além de protectinas e resolvinas, os quais exibem efeitos anti-inflamatórios, em contraste aos derivados dos ácidos graxos ômega-6 (Figura 3B) (Wada et al. 2007; Dennis e Norris 2015; Ruiz-Lopez et al. 2015; Fonseca et al. 2017).

Sua substância ativa pode ser encontrada tanto no núcleo, que pode ser composto de água ou óleo, quanto adsorvido na parede polimérica, sendo liberada posteriormente conforme o planejamento (Souto et al. 2012). Dentre os polímeros sintéticos mais utilizados estão o ácido polilático (PLA), o poli(metil-metacrilato) (PMMA), e a poli(ϵ -caprolactona) (PCL).

As propriedades da substância ativa e a composição da nanocápsula são fatores importantes para o planejamento e estabilidade, como a compatibilidade dos componentes da síntese da cápsula, polaridade e solubilidade, já que a substância ativa poderá interagir de forma positiva ou negativa (Sundar et al. 2010; Souto et al. 2012). Algumas características para o controle de qualidade precisam ser observadas para a caracterização do sistema, como o tamanho da partícula, a distribuição, estabilidade físico-química, potencial zeta e a morfologia (Schaffazick et al. 2003; Sundar et al. 2010).

Logo, a nanotecnologia, por meio das nanocápsulas, podem alterar a forma como os fármacos são distribuídos, tornando uma alternativa promissora para tratamentos de condições complexas e reduzindo a possibilidade de efeitos adversos pela redução da dose administrada (AbdElhamid et al. 2021).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do nanoencapsulamento de substâncias anti-inflamatórias no tratamento da artrite reumatoide na articulação temporomandibular de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sintetizar e caracterizar as nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo indometacina e/ou ômega-3;

Avaliar a viabilidade celular e calcular a Concentração Inibitória 50 a partir da exposição das células à indometacina e/ou ômega-3 livres ou nanoencapsulados e às nanocápsulas vazias;

Avaliar o efeito dos tratamentos por via intragástrica utilizando ELISA, quantificando as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 E TNF- α ;

Avaliar o efeito dos tratamentos por via intragástrica por meio da morfologia da articulação temporomandibular e disco articular dos ratos utilizando a microtomografia computadorizada e técnicas histológicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E SUBSTÂNCIAS

Foram utilizados: Álcool polivinílico (PVA; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), Indometacina (Florien Fitoativos, Piracicaba, Brasil), OmegaPURE (Biobalance, Porto Feliz, Brasil), Acetato de Etila (Química Moderna, Barueri, Brasil), Formvar/Carbono (FCF) – 200 mesh-Cobre, (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EUA), Acetonitrila (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), Dulbecco's modified Eagle's médium com glicose 4.500 mg/L (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), Soro Fetal Bovino (FBS; Gibco, Waltham, EUA), Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), MTT ((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; Invitrogen, Waltham, EUA), Dimetilsulfóxido (DMSO; Synth, Diadema, Brasil), Adjuvante Completo de Freund (CFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), Ácido acético glacial (Êxodo Científica, Sumaré, Brasil), Colágeno bovino tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), Ketamina (Dopalen, Paulínia, Brasil), Xilazina (Anasedan, Paulínia, Brasil), Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Êxodo Científica, Sumaré, Brasil), Paraplast (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), Kits ELISA ABTS IL-1 β , IL-6, TNF- α , e IL-10 (PeproTech Inc., Cranbury, EUA).

4.2 NANOCÁPSULAS

4.2.1 Síntese das nanocápsulas

As nanocápsulas (NC) foram sintetizadas utilizando uma adaptação do método de emulsão-difusão (Moinard-Chécot et al. 2008), inicialmente, preparando água e acetato de etila saturadas entre si, como fases aquosa e orgânica respectivamente. Na fase aquosa, foi dissolvido Álcool Polivinílico (PVA) (2,5%) e na fase orgânica poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (2%), indometacina (0,8 mg/mL e 0,4 mg/mL para um volume final de 10 mL após purificação) e ômega-3 (DHA:EPA 1:1,4) (4,8%) (Figura 5). A formulação foi feita com duas concentrações de indometacina para manter a dose diária de DHA+EPA. Em seguida, as duas fases foram emulsificadas com o ultrasonicador Sonics & Materials Inc. Vibra-Cell™ VCX 400 (Newtown, Connecticut, Estados Unidos) em um béquer de 100 mL utilizando amplitude de 30%, com pulso de 9,9 s e pausa de 5,0 s por 5 min, com o dispositivo mergulhado à metade da profundidade total do líquido.

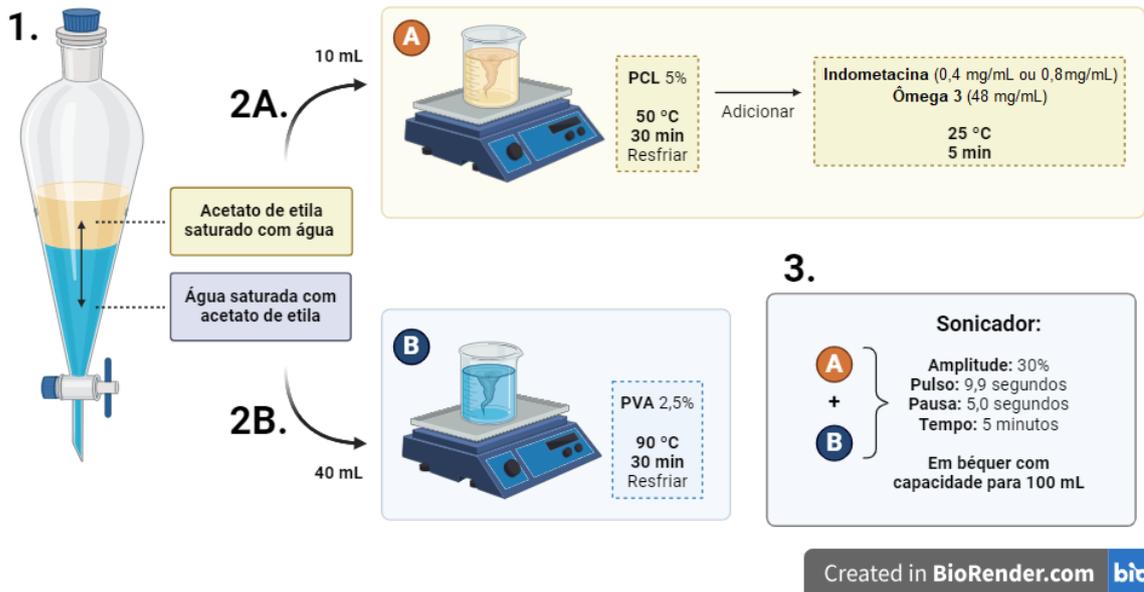


Figura 5 - Síntese das nanocápsulas: Preparação dos reagentes e emulsificação. Criado com BioRender.com (2024).

Após a ultrassonicação, a emulsão foi transferida para um béquer de 1 L e foi adicionado 200 mL de água em gotejamento sob agitação com auxílio de uma bureta. Então, o solvente orgânico e parte da água foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo Rotavapor® R-215 BÜCHI (Flawil, Suíça) até o volume final de 10 mL (Figura 6). As suspensões foram analisadas em lâminas de vidro no microscópio com luz polarizada (Leica DMLP, Alemanha) para verificação da ausência de cristalização da indometacina. Para a síntese das nanocapsulas brancas, a indometacina não foi adicionada.

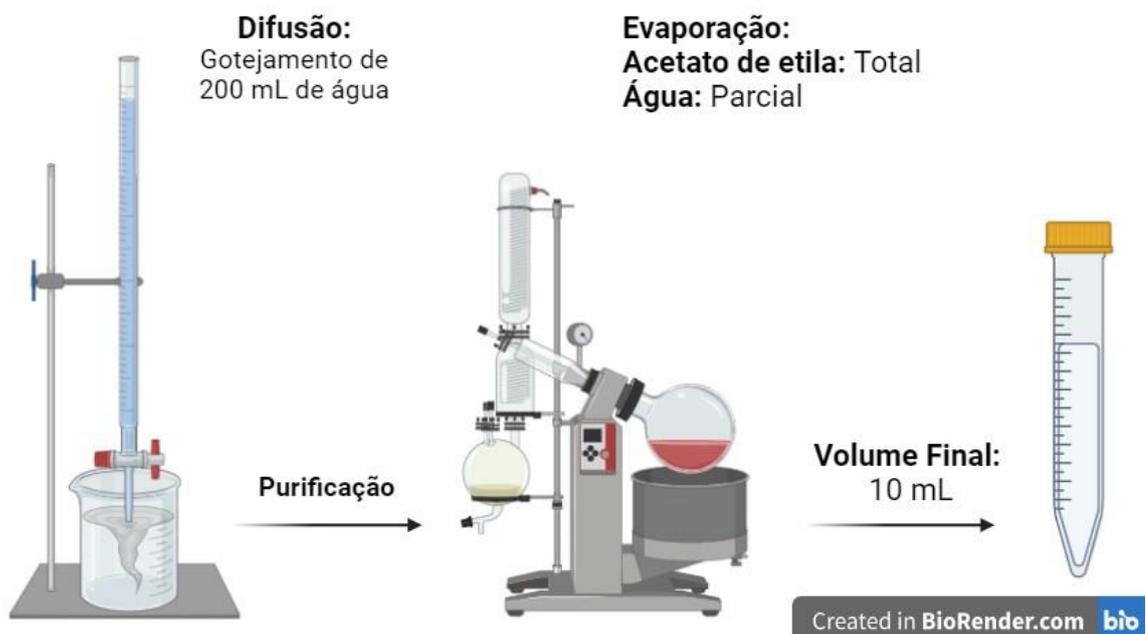


Figura 6 - Síntese das nanocápsulas: Difusão e purificação. Criado com BioRender.com (2024).

Os processos de síntese e purificação foram realizados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas no Laboratório de Farmacologia. O processo resumido pode ser observado na figura 7.

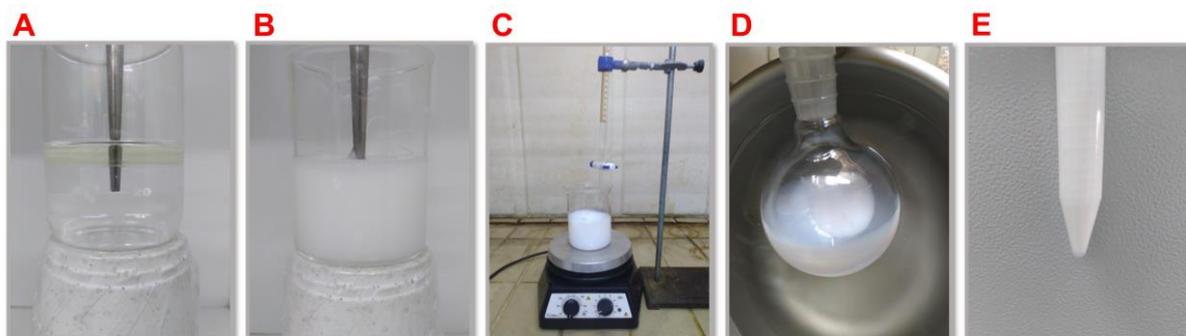


Figura 7 – Processo de síntese e purificação das nanocápsulas. (A) Solventes separados em duas fases momento antes da emulsificação; (B) Após a emulsificação; (C) Processo de difusão em água; (D) Purificação em evaporador rotativo; (E) Produto após purificação com aparência leitosa. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Caracterização das nanocápsulas

A morfologia das nanocápsulas foi determinada por microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 (JEOL, Japão) operado com a tensão de aceleração em 120 kV. As amostras foram diluídas 1:100 em água, e 20 μL foram depositados em grades de cobre cobertas por Formvar/Carbono (FCF) - 200 mesh, sem solução de contraste, secas e então analisadas com magnificação de 60.000X.

O diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (IPd) e potencial zeta (PZ) das nanocápsulas diluídas 1:100 em água foram analisados com Zetasizer Nano ZS® à 25 °C, e em um ângulo de detecção de 173° em triplicata. A análise do DHM, IPd e PZ foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp).

4.2.3 Eficiência de encapsulação

A quantificação de indometacina encapsulada utilizou um método de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validado (Cruz et al. 2006) e convalidado por meio da exatidão, precisão e especificidade do método. Foi utilizado acetonitrila/água (70:30, v/v) com pH $5,0 \pm 0,5$ como fase móvel, coluna de fase reversa Xterra MS C18 (150x2,1 mm, 5 μm), vazão de 0,3 mL/min e temperatura de 30 °C. As curvas de calibração lineares para indometacina foram obtidas por meio de sete pontos na faixa de 1,00–25,00 $\mu\text{g/mL}$ com detecção a 267 nm.

Para a quantificação, seis amostras foram centrifugadas em 4000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante separado. Cada suspensão (100 µL) foi tratada com 10 mL de acetonitrila, filtradas com filtros 0,45 µm e injetadas (20 µL). A EE% foi calculada utilizando a concentração teórica e a concentração real (Equação 1).

$$EE\% = \frac{[\] \text{ real}}{[\] \text{ teórica}} \times 100$$

Equação 1 - EE%: Percentual da eficiência de encapsulação.

A exatidão foi calculada a partir de soluções de concentrações conhecidas do padrão de indometacina, correspondendo às concentrações finais de 2,5, 7,5 e 17,0 µg/mL em triplicata. A precisão foi determinada por meio da repetibilidade intradia e interdia. A repetibilidade foi avaliada analisando 6 amostras de soluções de concentração conhecida do padrão de indometacina correspondendo à concentração final de 7,416 µg/mL, no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. Na precisão intermediária, as análises foram realizadas em 3 dias diferentes.

Para confirmar a especificidade do método, foi analisada a ausência de interferências pelos componentes das nanocápsulas. Foram preparadas nanocápsulas sem indometacina e analisadas nas mesmas circunstâncias experimentais das amostras com indometacina encapsulada.

A convalidação do método de cromatografia líquida de alta eficiência e a quantificação da indometacina foram realizadas na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

4.3 CULTURA CELULAR

4.3.1 Densidade celular

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram cultivados em Dulbecco's modified Eagle's médium com 4.500 mg/L de glicose, pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina-estreptomicina. A cultura de células foi mantida em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C para crescimento e fixação.

4.3.2 Viabilidade celular por redução de MTT

A densidade celular escolhida para o experimento foi estabelecida de acordo com a absorbância adquirida em uma curva de semeadura (500.000-31.250 células/mL) com 100 µL/poço, em sextuplicata, compreendo a melhor densidade aquela que atingisse a absorbância entre 0,75 e 1,25 em 24 horas de experimento, após as 12 h de fixação das células, utilizando o ensaio de MTT.

As células foram semeadas em 100 µL na densidade de 62.500 células/mL, em sextuplicata nas placas de 96 poços. Após 12 horas, o meio de cultura foi removido, e adicionado 100 µL de meio de cultura fresco com indometacina, indometacina com ômega-3, nanocápsulas vazias ou carregadas com indometacina, previamente dissolvidos em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4, em diluição seriada a partir de 50 µM por 24 h. A indometacina e o ômega-3 foram adicionados de forma que os tratamentos tivessem a mesma quantidade livre e encapsulada em seus respectivos grupos. Após o tratamento, os tratamentos foram removidos e o ensaio de MTT foi realizado conforme instruções do fabricante. Após 4 horas, o sobrenadante dos poços foi removido e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido para desenvolvimento de cor. A absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro (Asys UVM 340, Biochrom) (Twentyman e Luscombe 1987). O cálculo da inibição de crescimento 50 (IC50) foi feito utilizando regressão não linear por meio da opção “log(inhíbitor) vs. normalized response (Variable slope)” e da equação ($Y=100/(1+10^{((\text{LogIC50}-X)*\text{HillSlope}))}$) presentes no software GraphPad Prism 8.0.

4.4 ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia/UNICAMP com protocolo nº 5599-1/2020 e 6354-1/2023 (Anexo 1 e 2) e seguiu as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) para elaboração do estudo e dos relatórios (Percie du Sert et al. 2020).

Quarenta e oito ratos, adultos (Wistar Hannover heterogenic specific-pathogen free) com 12 semanas de vida, com peso entre 350 e 400g e divididos em 8 grupos (n = 6) foram utilizados para o estudo. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com no máximo 3 ratos por gaiola, e passaram uma semana de adaptação ambiental após o transporte antes do início do experimento. Foram mantidos em regime de água e alimentação *ad libitum*, à temperatura média de 23 °C e ciclo de 12 h claro/escuro.

A ocorrência e intensidade da dor nos animais foram monitoradas diariamente por meio da Escala de Grimace (Sotocinal et al. 2011). O peso, a ingestão hídrica e o consumo

alimentar foram avaliados semanalmente. A eutanásia foi planejada como ponto final humanitário.

4.4.1 Cálculo amostral

O delineamento dos grupos experimentais foi feito conforme o cálculo amostral disponibilizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, adotando-se: valor crítico para grau de confiança de 95% (1,96); desvio máximo 0,2236 (22,36%), baseado no estudo anterior da literatura e experimentos preliminares; erro padrão mínimo que se deseja encontrar de $\pm 5\%$ da média (50%); e nível de significância de $p < 0,05$. Segue o cálculo: $n = 1 + [2C \times (s/d)^2]$ $n = 1 + [2 \times 10,51 \times (0,2236/0,5)^2]$ $n = 1 + [21,02 \times (0,4472)^2]$ $n = 1 + [21,02 \times 0,2]$ $n = 1 + 4,204$ $n = 5,204$. Sendo que o n deve ser arredondado para o próximo número inteiro, ou seja, $n = 6$ animais.

4.4.2 Indução da artrite reumatoide

Para induzir a artrite reumatoide, foi utilizada uma emulsão de colágeno bovino tipo II (2 mg/mL) (CII) dissolvido em solução de ácido acético 0,05 M com Adjuvante Completo de Freund (CFA) na proporção de 1:1 (Ananias et al. 2023). Quarenta e dois ratos receberam injeção de 100 μ L de CFA + CII via intradérmica na base da cauda e 6 animais que compõem o grupo Controle Negativo receberam 100 μ L de solução de cloreto de sódio 0,9% na mesma região. A injeção foi aplicada novamente como reforço após 5 dias (Ananias et al. 2023).

4.4.3 Delineamento dos tratamentos

Divididos em 8 grupos ($n=6$), os tratamentos foram administrados por via intragástrica (gavagem) única, diária, por 7 dias e ocorreram após 15 dias da indução da artrite nos animais. O ômega-3 foi mantido em 300 mg/kg em todos os grupos que foi administrado, contudo, os grupos 1 e 2 (Controle Negativo e Positivo) receberam apenas uma solução de cloreto de sódio 0,9% como tratamento (Figura 8).



Grupo	Indução com CFA	Tratamentos		Observação
		Indometacina	Ômega-3	
Grupo 1	Não (NaCl 0,9%)	NaCl 0,9%		Controle Negativo
Grupo 2	Sim	NaCl 0,9%		Controle Positivo
Grupo 3	Sim	5 mg/kg		
Grupo 4	Sim	2,5 mg/kg		
Grupo 5	Sim	5 mg/kg	300 mg/kg	
Grupo 6	Sim	2,5 mg/kg	300 mg/kg	
Grupo 7	Sim	5 mg/kg	300 mg/kg	Nanoencapsulado
Grupo 8	Sim	2,5 mg/kg	300 mg/kg	Nanoencapsulado

Created in BioRender.com bio

Figura 8 - Grupos e tratamentos. NaCl, Cloreto de Sódio; CFA, Adjuvante Completo de Freund. Criado com BioRender.com (2024).

A dose de 300 mg/kg de ômega-3 foi escolhida para obter uma dose equivalente à humana de ômega-3 de 3,0 g/dia para uma pessoa de 65 kg (Reagan-Shaw et al. 2008; Park et al. 2013), enquanto a dose de 5 mg/kg de indometacina equivale à uma dose humana de 50 mg/dia para uma pessoa de 65 kg (Reagan-Shaw et al. 2008).

4.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a eutanásia, as articulações temporomandibulares (ATM) dos ratos foram previamente sorteadas (direita ou esquerda) e processadas conforme a necessidade para cada tipo de análise (Figura 9).

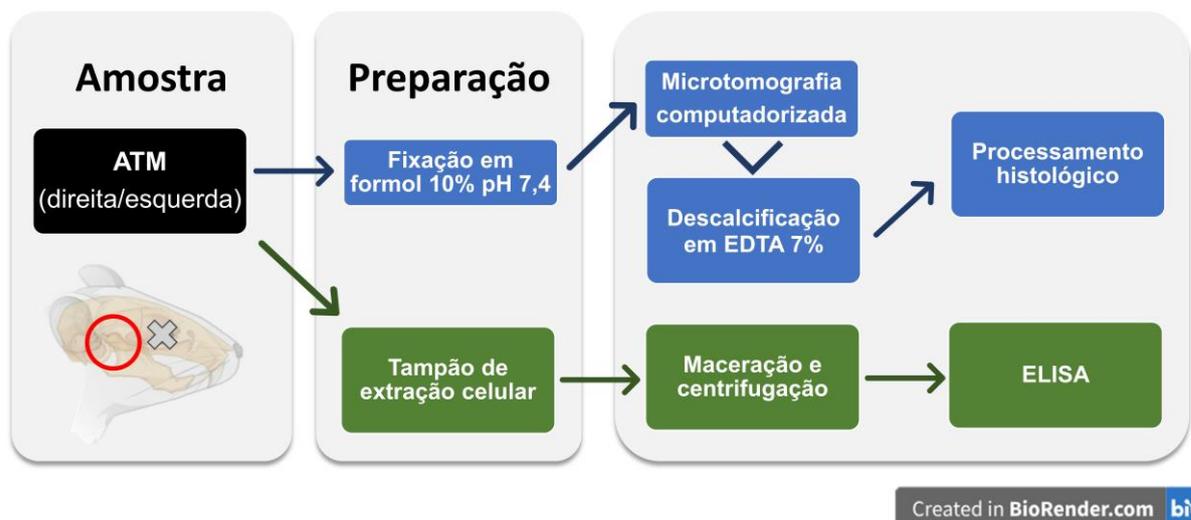


Figura 9 – Processamento das amostras de acordo com a análise. Criado com BioRender.com (2024).

4.5.1 Histologia e histomorfometria

Amostras da articulação temporomandibular foram fixadas em formaldeído 10% em tampão fosfato (pH 7,4) a 4 °C por 24 h. As amostras foram descalcificadas em solução de

EDTA 7% com o mesmo tampão, com troca diária por 90 dias. Após a descalcificação, as amostras passaram por desidratação e foram incluídas em Paraplast e cortados coronalmente em cortes seriais de 6 μm (Figura 10A) usando um micrótomo manual (Luptec MRP03). As secções foram coletadas em lâminas histológicas, identificadas e coradas com azul de toluidina ou picrossirius vermelho. Além do disco articular, a região do côndilo em sua espessura total e cada camada individualmente (fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica) foram mensuradas em três áreas distintas e a médias das medidas foram expressas em micrômetros (Figura 10B).

As fotos dos cortes histológicos foram feitas por meio de um fotomicroscópio Leica DMLP (Mannheim, Alemanha) com sistema de fotodocumentação OPTIKA OptikamB3 Digital Camera (Ponteranica, Itália), empregando-se objetivas de 10 e 20X em iluminação convencional ou polarizada.

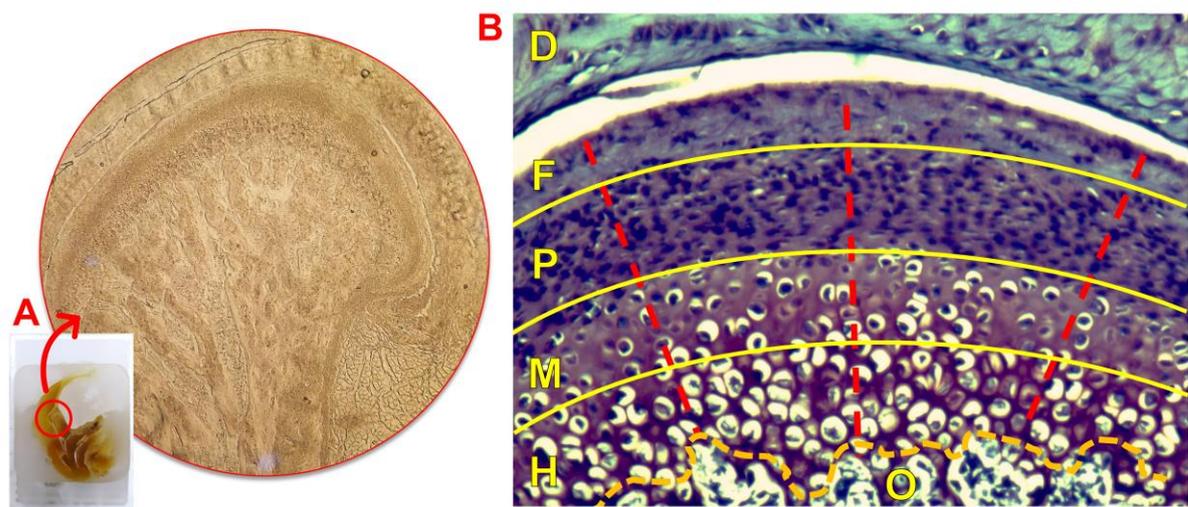


Figura 10 - Histologia da articulação temporomandibular. (A) Coleta do corte histológico em lâmina histológica representado sem o processo de coloração. (B) Histomorfometria do côndilo após o processo de coloração (imagem exemplificada com o azul de toluidina). **Letras:** D: Disco Condilar; F: Camada Fibrosa; P: Camada Proliferativa; M: Camada Maturada; H: Camada Hipertrófica; O: Osso Subcondral. **Linhas amarelas:** delimitam as camadas fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica. **Linhas tracejadas vermelhas:** indicam a região de medida de cada camada. **Linha tracejada laranja:** indica o início do osso subcondral. Fonte: Aquisição das imagens pelo autor e demarcações para histomorfometria adaptadas de Ceotto et al., 2022.

4.5.2 Imunoensaio

As ATMs foram maceradas e centrifugadas em tampão de extração celular (Tris-HCl 50 mM e PMSF 0,1 mM, pH 7,4). Os sobrenadantes das amostras foram utilizados no kit ELISA ABTS para IL-1 β , IL-6, TNF- α , e IL-10 conforme as instruções do fabricante (PeproTech Inc., Cranbury, EUA). A densidade óptica foi obtida utilizando o comprimento de onda de 405 nm com correção de 650 nm.

4.5.3 Microtomografia computadorizada

As imagens das ATMs foram obtidas no aparelho SkyScan 1174v2 Compact X-ray micro-CT® (Kontich, Bélgica). As amostras foram fixadas com cera em uma haste metálica e o escaneamento utilizou energia de 50 kV, intensidade de corrente do tubo de raios X de 800 μ A e um filtro de alumínio com espessura de 0,5 mm posicionado à frente da saída externa dos Raios X (Marana et al. 2022). As tomografias foram padronizadas em 6.43 μ m, *rotation step* de 0.3 ° e aquisição em 360 °, totalizando 1.200 projeções por amostra.

As reconstruções e as análises das reconstruções foram realizadas com os softwares SkyScan NRecon e Skyscan CT Analyser respectivamente (Kontich, Bélgica). O percentual de volume ósseo (BV), espessura trabecular (Tb.Th) e número trabecular (Tb.N) foram analisados.

4.6 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para verificação da normalidade e da homoscedasticidade. Para a comparação entre grupos, foi utilizado o teste de ANOVA-Welch e post-hoc de Games-Howell. A estatística foi executada no software GraphPad Prism 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 NANOCÁPSULAS

5.1.1 Caracterização das nanocápsulas

A morfologia das nanocápsulas foi observada em microscópio eletrônico de transmissão. A figura 11 mostra a nanocápsula vazia (A) e carregada (B). Em ambas as representações, as nanocápsulas apresentam uma forma arredondada e sem irregularidades.

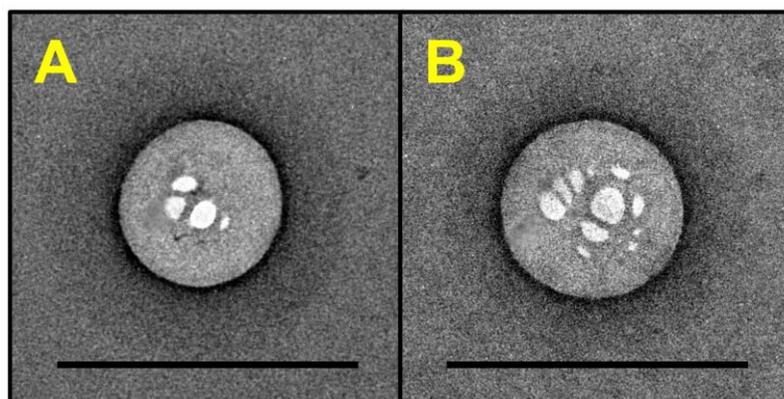


Figura 11 - Representação das nanocápsulas por microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 60.000X. **A.** Nanocápsula vazia; **B.** Nanocápsula carregada com indometacina (0,8 mg/mL). **Barra de escala:** 500 nm.

A Tabela 1 apresenta a média e desvio padrão do pH, potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão das NC vazias, contendo 0,4 mg/mL e 0,8 mg/mL de indometacina. Além disso, as figuras 12 e 13 apresentam a distribuição dos dados obtidos em triplicata pelo software do equipamento.

Tabela 1 - Caracterização das amostras de nanocápsulas em triplicata.

Nanocápsulas	pH	DHM	IPd	PZ (mV)
Vazias	4,17 ± 0,2	223,7 ± 2,1	0,114 ± 0,015	-13,3 ± 0,2
0,4 mg/mL	4,14 ± 0,3	241,8 ± 1,8	0,104 ± 0,016	-10,9 ± 0,2
0,8 mg/mL	4,15 ± 0,3	224,3 ± 1,4	0,091 ± 0,032	-8,6 ± 0,5

Legenda: DHM: Diâmetro hidrodinâmico médio; IPd: Índice de polidispersão. PZ: Potencial Zeta. Dados apresentados em média ± desvio padrão.

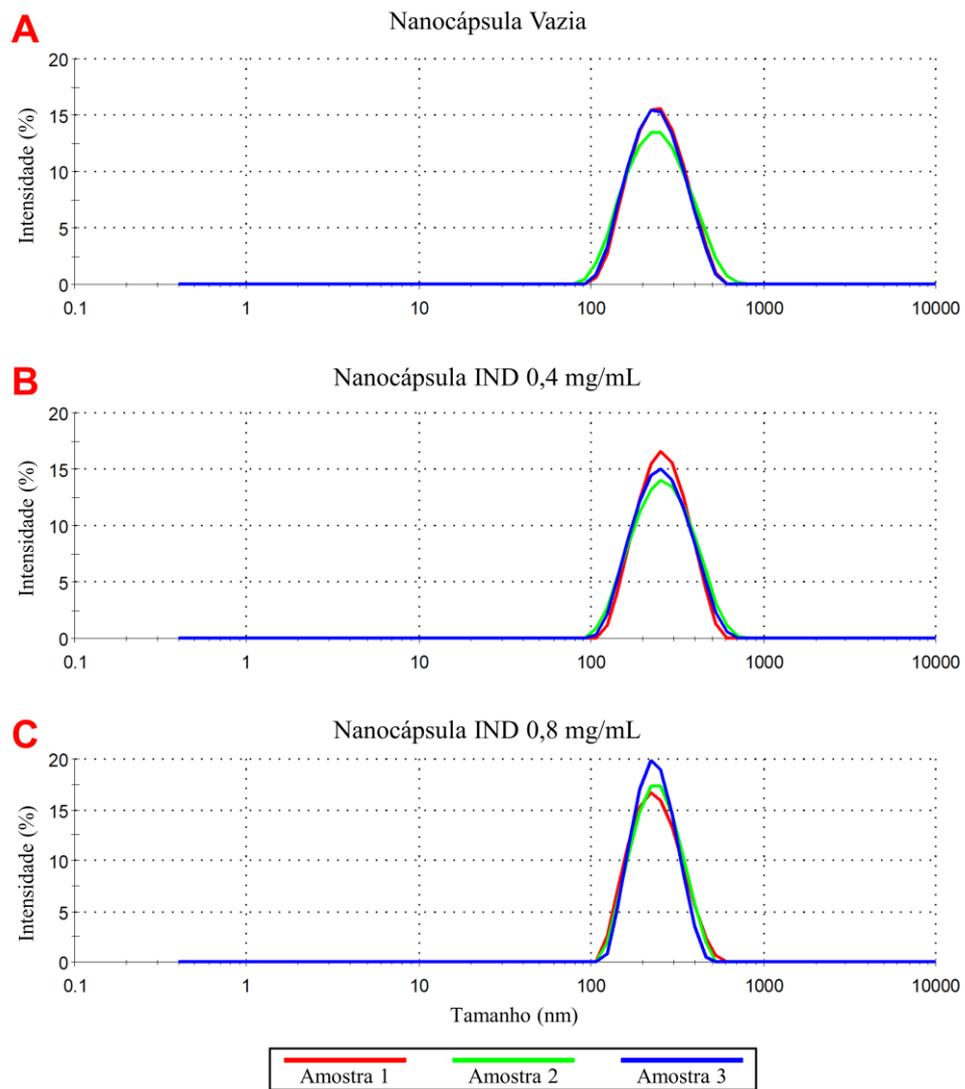


Figura 12 - Distribuição de tamanho das nanopartículas em triplicata. **A.** Nanocápsulas vazias; **B.** Nanocápsulas contendo 0,4 mg/mL de indometacina; **C.** Nanocápsulas contendo 0,8 mg/mL de indometacina.

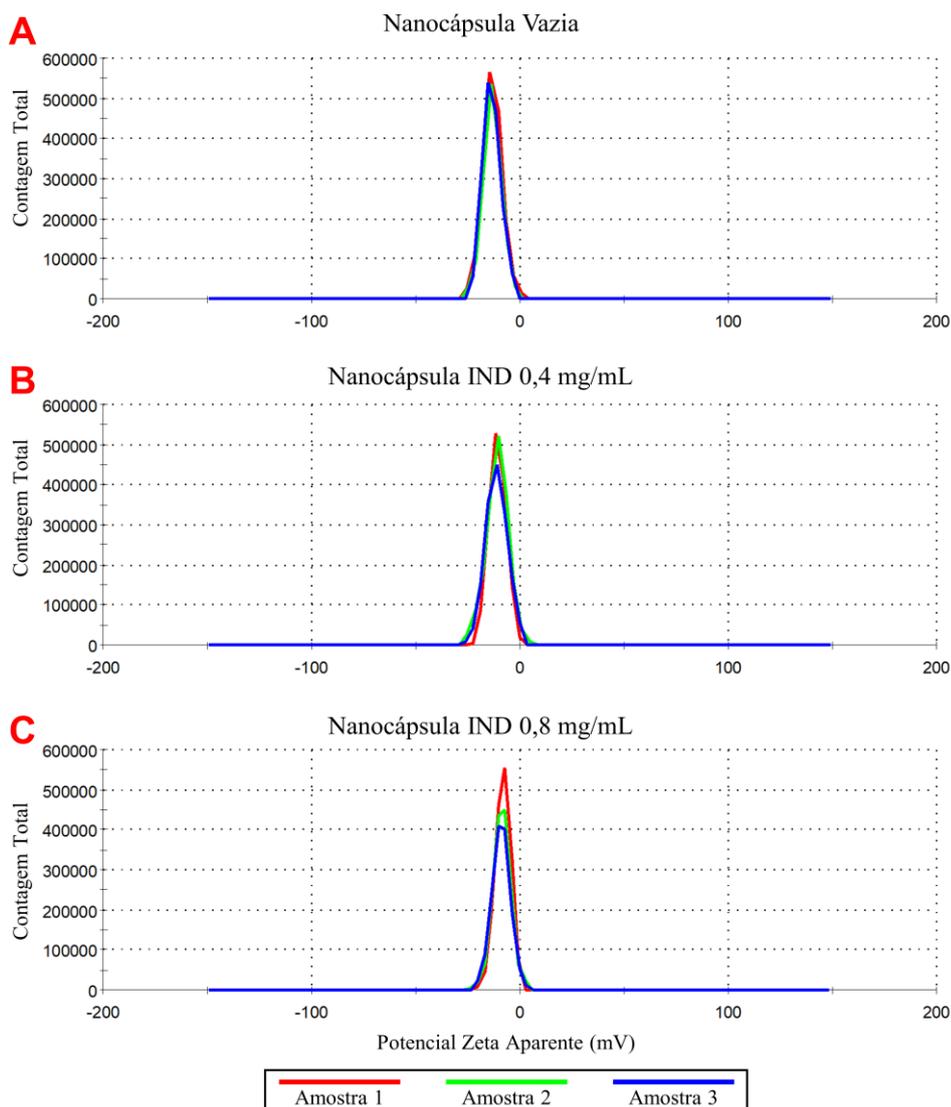


Figura 13 - Distribuição do potencial zeta em triplicata. **A.** Nanocápsulas vazias; **B.** Nanocápsulas contendo 0,4 mg/mL de indometacina; **C.** Nanocápsulas contendo 0,8 mg/mL de indometacina.

5.1.2 Quantificação de indometacina das nanocápsulas e eficiência de encapsulação

A quantificação de indometacina encapsulada utilizou um método de cromatografia líquida de alta eficiência previamente validado e convalidado por meio da exatidão, precisão e especificidade do método. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos da avaliação da exatidão do método e a Tabela 3 apresenta da avaliação da precisão interdia e intradia. A eficiência de encapsulamento foi de 89,79%, com desvio padrão de 2,64 e desvio padrão relativo de 2,94%.

Tabela 2 - Avaliação da exatidão do método

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração real média (µg/mL)	DP	DPR (%)	Exatidão (%)
2,5	2,547	0,017	0,657	101,89
7,5	7,255	0,021	0,291	96,73
17,0	17,079	0,014	0,079	100,46

Legenda: DP: Desvio padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo

Tabela 3 - Avaliação da precisão interdia e intradia do método

Interdia	Concentração real média (µg/mL)	DP	DPR (%)
Dia 1	7,310	0,010	0,135
Dia 2	7,273	0,014	0,186
Dia 3	7,365	0,017	0,224
Intradia	Concentração real média (µg/mL)	DP	DPR (%)
	7,316	0,041	0,559

Legenda: DP: Desvio padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo

A figura 14 apresenta os cromatogramas com a detecção das nanocápsulas sem indometacina (A) e do padrão de indometacina (B) para observação da especificidade do método. Não foi identificado sobreposição de picos em ambos os cromatogramas.

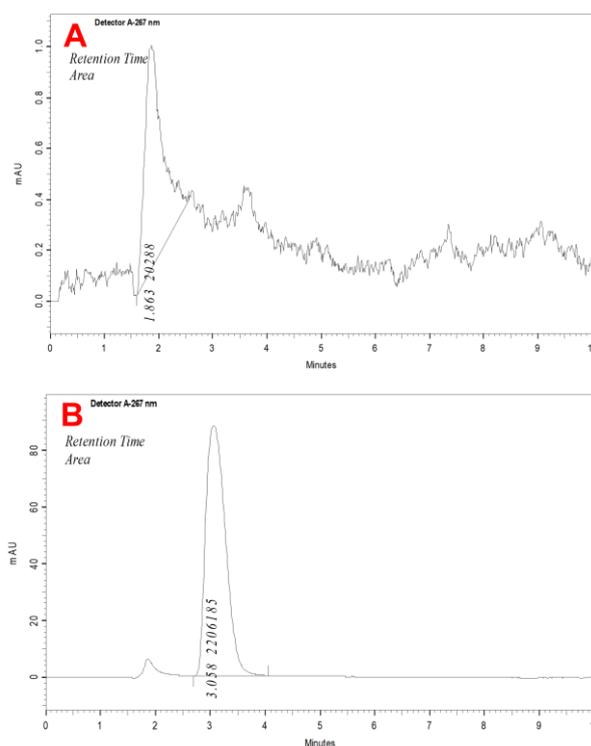


Figura 14 - Cromatogramas da detecção das nanocápsulas sem indometacina (A) e do padrão de indometacina (B) em mili-absorbância.

5.2 VIABILIDADE CELULAR

5.2.1 Densidade celular

A densidade celular que atingisse entre 0,75 e 1,25 na densidade óptica pelo espectrofotômetro, considerada ótima para ser utilizada no ensaio de viabilidade celular foi obtida no plaqueamento de 62.500 células/mL (6.250 células/100 μ L), com R^2 de 0,9971, conforme observado na Figura 15.

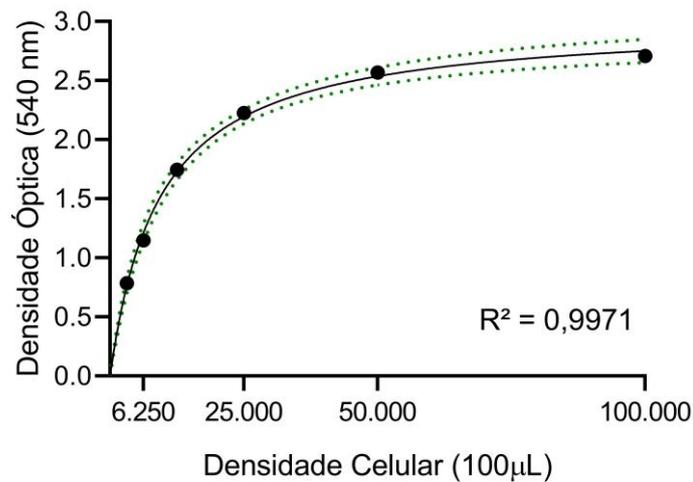


Figura 15 - Curva de densidade óptica em 540 nm em função da densidade celular. Os pontilhados em verde representam os limites do intervalo de confiança de 95%.

5.2.2 Viabilidade celular por redução de MTT

A inibição de crescimento 50 (IC50) dos tratamentos foi calculada e observada uma diferença estatisticamente significativa das células tratadas com nanocápsulas carregadas com indometacina e nanocápsulas vazias em comparação com os tratamentos não encapsulados ($p < 0,0001$), porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos não encapsulados ($p = 0,8200$) e entre os dois tratamentos com nanocápsulas ($p = 0,8733$) (Figura 16). A IC50 obtida (\pm desvio padrão) para indometacina, indometacina + ω -3, NC indometacina + ω -3 e NC vazias foram 16,03 ($\pm 1,02$), 16,74 ($\pm 1,04$), 100,6 ($\pm 1,24$) e 126,6 ($\pm 1,23$) μ M respectivamente.

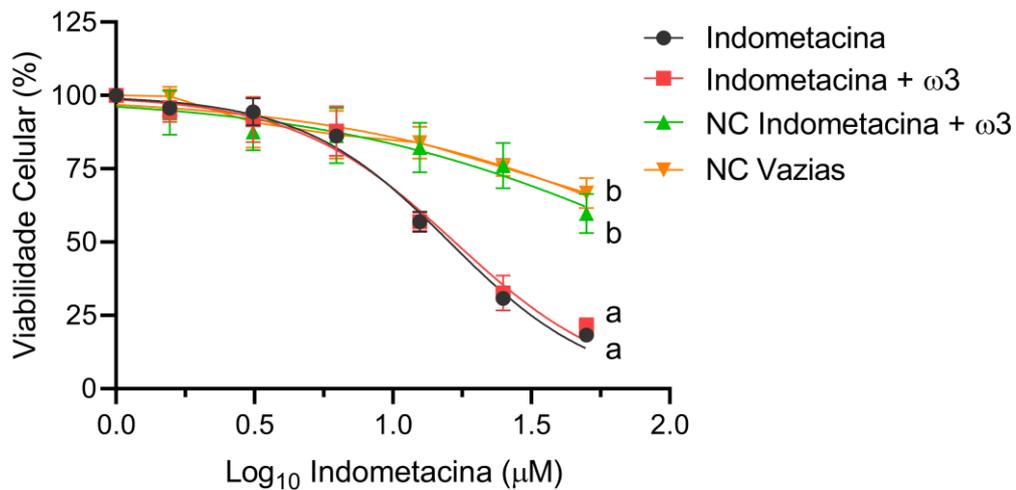


Figura 16 - Curvas de tratamento obtidas pelo ensaio de redução de MTT normalizado em porcentagem de viabilidade celular, onde o grupo NC Vazias representa a mesma proporção em volume do grupo NC Indometacina + ω -3. O gráfico apresenta média e desvio padrão e as comparações entre curvas foram realizadas utilizando ANOVA-Welch e post-hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significante entre IC50.

5.3 HISTOLOGIA E HISTOMORFOMETRIA

Foram feitas análises histomorfométricas para analisar a espessura da cartilagem e morfologia do côndilo e espessura do disco articular. A figura 17 apresenta as mensurações da cartilagem separadas por grupo e a figura 18 apresenta a espessura total das camadas e a espessura do disco articular.

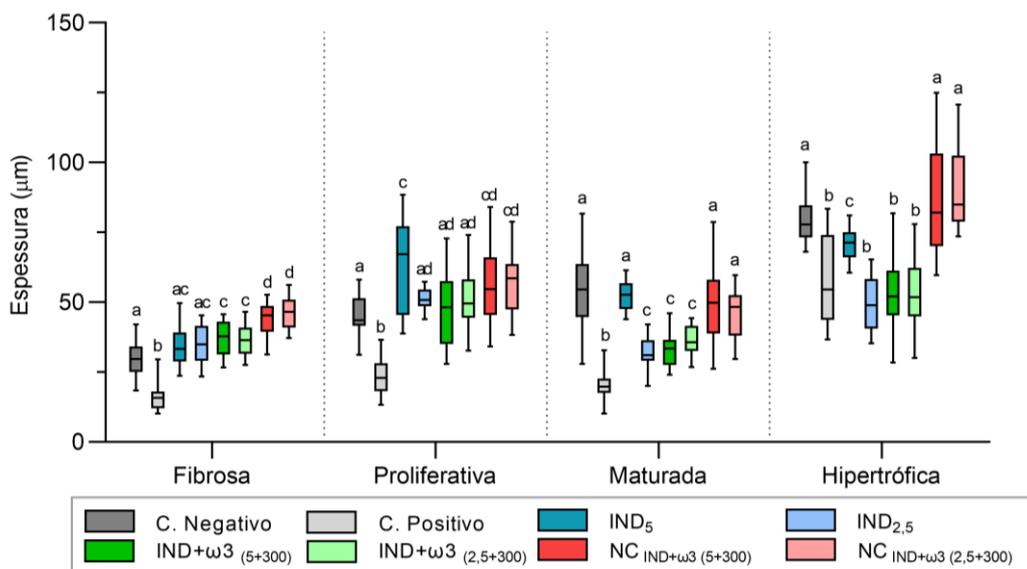


Figura 17 - Mensuração das camadas fibrosa, proliferativa, maturada e hipertrófica do côndilo em micrômetros. Os diagramas de caixa apresentam a mediana (linha interna da caixa), 1º e 3º quartil (limites da caixa) e limite superior e inferior (suíças). As comparações entre grupos da mesma camada foram realizadas utilizando ANOVA-Welch e post-hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante entre grupos da mesma camada.

Na camada fibrosa, o grupo Controle Negativo apresentou a média da espessura ($29,75 \pm 5,77$) significativamente menor em comparação com os grupos Controle Positivo ($16,05 \pm 4,42$), $IND + \omega 3_{(5+300)}$ ($37,02 \pm 6,32$), $IND + \omega 3_{(2,5+300)}$ ($36,88 \pm 5,17$), $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($43,91 \pm 5,67$) e $NC_{IND + \omega 3_{(2,5+300)}}$ ($46,17 \pm 5,45$) ($p < 0,05$). Os grupos $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($43,91 \pm 5,67$) e $NC_{IND + \omega 3_{(2,5+300)}}$ ($46,17 \pm 5,45$) apresentaram a média significativamente maior em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$) mas sem diferença entre si ($p > 0,05$). O grupo Controle Positivo apresentou a média significativamente menor ($16 \pm 4,42$) em comparação aos demais grupos.

Na camada proliferativa, o grupo Controle Negativo apresentou a média da espessura significativamente menor ($45,85 \pm 6,90$) em relação aos grupos IND_5 ($64,08 \pm 16,33$) e $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($47,19 \pm 12,14$) e maior em relação ao grupo Controle Positivo ($23,71 \pm 6,69$) ($p < 0,05$). O grupo IND_5 ($64,08 \pm 16,33$) apresentou a média significativamente maior em relação aos demais grupos, com exceção dos grupos $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($56,57 \pm 13,76$) e $NC_{IND + \omega 3_{(2,5+300)}}$ ($56,74 \pm 10,21$) ($p < 0,05$). Os grupos $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($56,57 \pm 13,76$) e $NC_{IND + \omega 3_{(2,5+300)}}$ ($56,74 \pm 10,21$) apresentaram a média significativamente maior em relação aos grupos Controle Negativo ($45,85 \pm 6,90$) e Positivo ($23,71 \pm 6,69$) ($p < 0,05$) mas não apresentou diferença entre si ($p > 0,05$). O grupo Controle Positivo apresentou a média significativamente menor ($23,71 \pm 6,69$) em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Na camada maturada, o grupo Controle Negativo apresentou a média de espessura significativamente maior ($53,79 \pm 13,36$) em relação aos grupos Controle Positivo ($20,39 \pm 4,94$), $IND_{2,5}$ ($32,46 \pm 4,69$), $IND + \omega 3_{(5+300)}$ ($32,52 \pm 5,56$) e $IND + \omega 3_{(2,5+300)}$ ($36,33 \pm 5,23$) ($p < 0,05$). Os grupos $IND_{2,5}$ ($32,46 \pm 4,69$), $IND + \omega 3_{(5+300)}$ ($32,52 \pm 5,56$) e $IND + \omega 3_{(2,5+300)}$ ($36,33 \pm 5,23$) apresentaram a média significativamente menor em relação aos grupos Controle Negativo ($53,79 \pm 13,36$), IND_5 ($52,21 \pm 5,39$), $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($49,10 \pm 11,66$) e $NC_{IND + \omega 3_{(2,5+300)}}$ ($45,99 \pm 8,94$) ($p < 0,05$) e maior em relação ao Controle Positivo ($20,39 \pm 4,94$) ($p < 0,05$), contudo, não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

Na camada hipertrófica, o grupo Controle Negativo ($79,77 \pm 8,45$), $NC_{IND + \omega 3_{(5+300)}}$ ($84,74 \pm 17,57$) e $NC_{IND + \omega 3_{(2,5+300)}}$ ($89,90 \pm 13,68$) apresentaram a média de espessura significativamente maior em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) mas não entre si ($p > 0,05$). O grupo IND_5 apresentou a média significativamente maior ($70,88 \pm 6,14$) em relação aos grupos Controle Positivo ($56,80 \pm 14,57$), $IND_{2,5}$ ($49,83 \pm 9,67$), $IND + \omega 3_{(5+300)}$ ($53,72 \pm 12,90$) e $IND + \omega 3_{(2,5+300)}$ ($53,60 \pm 11,85$) ($p < 0,05$), que por sua vez, apresentaram a média significativamente menor em relação aos demais grupos ($p < 0,05$).

Em relação à espessura total da cartilagem do côndilo (Figura 18), o grupo Controle Negativo apresentou a média significativamente maior ($205,6 \pm 26,33$) que os grupos Controle Positivo ($116,2 \pm 20,58$), $IND_{2,5}$ ($168,4 \pm 12,49$), $IND+\omega 3_{(5+300)}$ ($170,4 \pm 26,65$) e $IND+\omega 3_{(2,5+300)}$ ($178,0 \pm 17,26$) ($p < 0,05$). Os grupos $NC_{IND+\omega 3(5+300)}$ ($234,3 \pm 33,80$) e $NC_{IND+\omega 3(2,5+300)}$ ($238,8 \pm 17,42$) apresentaram a média significativamente maior que aos demais grupos, com exceção ao grupo IND_5 ($221,5 \pm 2,60$) ($p < 0,05$) mas não apresentaram entre si ($p > 0,05$). O grupo Controle Positivo apresentou a média significativamente menor ($116,2 \pm 20,58$) que todos os grupos ($p < 0,05$).

Ao mensurar o disco articular (Figura 18), o grupo Controle Negativo apresentou diferença significativa ($245,9 \pm 92,72$) apenas em relação ao grupo Controle Positivo ($74,76 \pm 18,47$) ($p > 0,05$), que por sua vez, apresentou diferença significativa em relação a todos os grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos IND_5 ($195,9 \pm 43,01$) e $IND_{2,5}$ ($193,0 \pm 29,97$) ($p > 0,05$), mas foram significativamente menores que os grupos $IND+\omega 3_{(5+300)}$ ($270,5 \pm 12,34$), $IND+\omega 3_{(2,5+300)}$ ($253,6 \pm 20,44$), $NC_{IND+\omega 3(5+300)}$ ($266,6 \pm 29,81$) e $NC_{IND+\omega 3(2,5+300)}$ ($323,7 \pm 13,72$) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos $IND+\omega 3_{(5+300)}$ ($270,5 \pm 12,34$), $IND+\omega 3_{(2,5+300)}$ ($253,6 \pm 20,44$), $NC_{IND+\omega 3(5+300)}$ ($266,6 \pm 29,81$) ($p > 0,05$) mas os grupos apresentaram espessura significativamente menor em comparação ao grupo $NC_{IND+\omega 3(2,5+300)}$ ($323,7 \pm 13,72$) ($p < 0,05$).

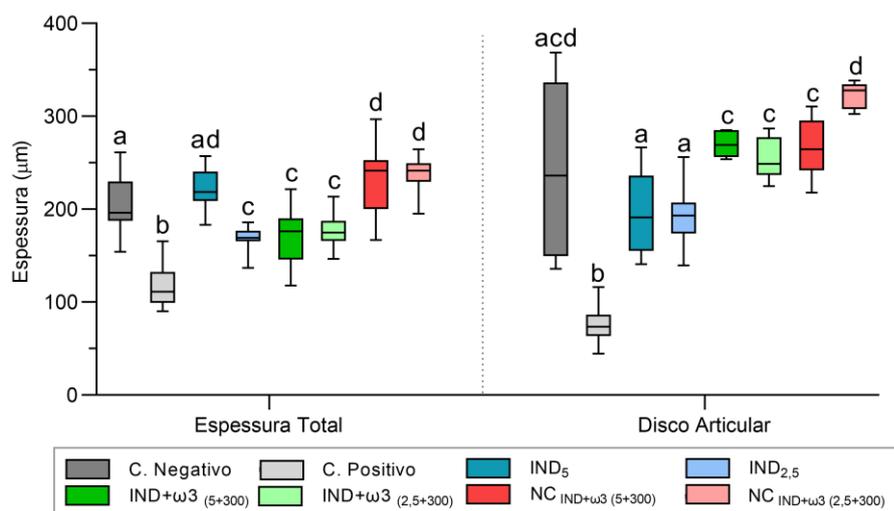


Figura 18 - Mensuração da espessura total da cartilagem do côndilo e do disco articular em micrômetros. Os diagramas de caixa apresentam a mediana (linha interna da caixa), 1º e 3º quartil (limites da caixa) e limite superior e inferior (suíças). As comparações entre grupos foram realizadas utilizando ANOVA-Welch e post-hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre grupos.

Na figura 19, a coloração azul de toluidina foi utilizada para visualização dos proteoglicanos. No grupo Controle Negativo (A), é possível observar todas as camadas bem definidas, contudo, no grupo Controle Positivo (B), as camadas proliferativa e maturada estão bem reduzidas e não estão bem definidas, além disso, o disco articular aparece bem reduzido e colado à camada fibrosa. Nos grupos IND_{2,5}, IND+ ω 3_(2,5+300) e NC IND+ ω 3_(2,5+300) (D, F e H) mostram diminuição na densidade de proteoglicanos, nos grupos IND₅, IND+ ω 3₍₅₊₃₀₀₎ e NC IND+ ω 3₍₅₊₃₀₀₎ (C, E e G) mostram um aumento na densidade de proteoglicanos.

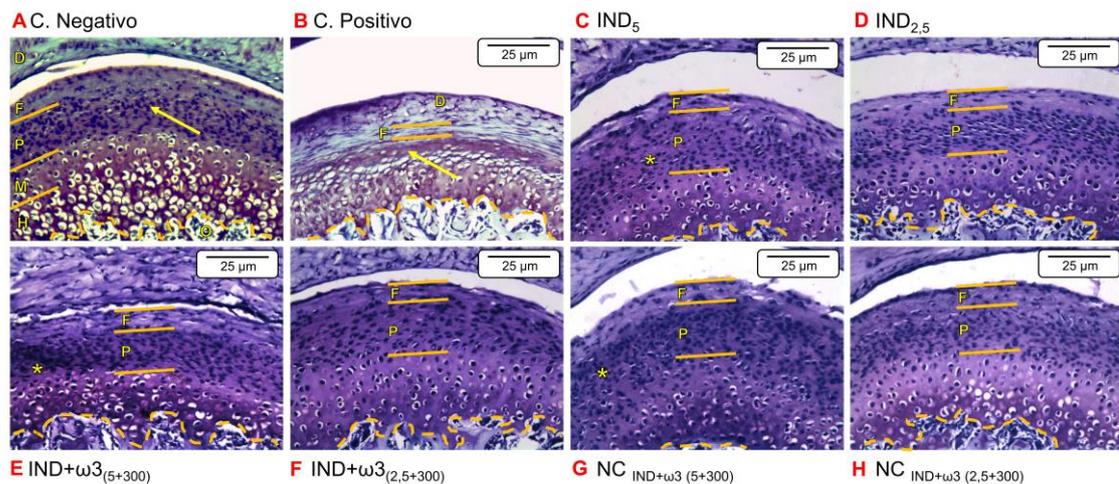


Figura 19 - Imagens representativas da morfologia da articulação temporomandibular em azul de toluidina, com magnificação de 20X. **Legenda:** D: Disco articular; F: Camada fibrosa; P: Camada proliferativa; M: Camada maturada; H: Camada hipertrófica. Linha tracejada: Delimitação da camada hipertrófica e osso subcondral. Figura A: Apresenta as camadas bem organizadas e definidas, assim como a intensidade do azul dos proteoglicanos na camada proliferativa. Figura B: Apresenta disco articular bem reduzido e aderido à camada fibrosa (entre linhas paralelas). A camada fibrosa e a camada proliferativa (seta) se apresentam com grande descaracterização. Os grupos que receberam a indometacina na concentração de 5 mg/mL (Figuras C, E e G) apresentam uma organização e definição nos proteoglicanos (asterisco) e na camada fibrosa (F) inferior em comparação aos grupos tratados com indometacina na concentração de 2,5 mg/mL (Figuras D, F e H).

Na figura 20, a coloração picrossirius vermelho foi utilizada para visualização das fibras colágenas utilizando luz polarizada, observando colágeno tipo 1 em laranja e colágeno tipo 3 em verde (Coelho et al. 2018). No grupo Controle Negativo (A), é possível ver a camada proliferativa definida e a fibras colágenas organizadas no cêndilo, contudo, no grupo Controle Positivo (B), a camada proliferativa é reduzida e há uma desorganização do colágeno do cêndilo. Nos demais grupos (C, D, E, F, G, H), é possível observar fibras colágenas verdes na camada proliferativa próxima de fibras alaranjadas das demais camadas, ainda que não estejam totalmente organizadas, as fibras colágenas apresentaram uma melhor organização em comparação ao grupo Controle Positivo (B)

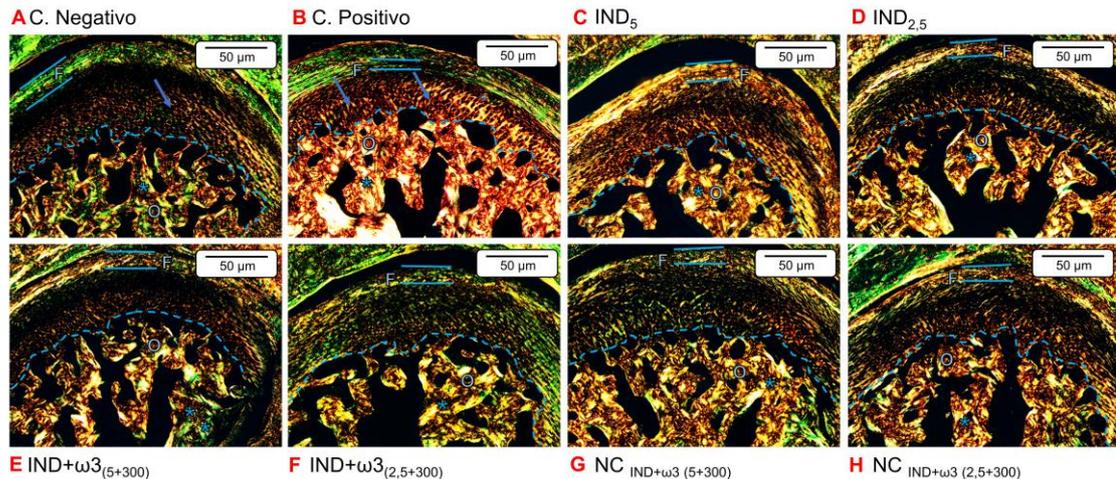


Figura 20 - Imagens representativas da morfologia da articulação temporomandibular em picrossirius vermelho com luz polarizada, com magnificação de 10X. Linha tracejada: Delimitação da camada hipertrófica e osso subcondral (O). Linhas em paralelo delimitam a camada fibrosa (F) da cartilagem. Figura A: Seta aponta organização das fibras colágeno com arranjos bem definidos e asterisco mostra balanço entre fibras vermelhas e verdes. Figura B: Setas apontam desorganização dos arranjos das fibras de colágeno e asterisco mostra ausência de fibras verdes (colágeno tipo III). Figuras C-H: Asterisco mostra a presença de fibras verdes (colágeno tipo III) em balanço com fibras vermelhas. Com exceção da figura B, todas as imagens apresentam fibras verdes e vermelhas de maneira uniforme.

5.4 IMUNOENSAIO

As articulações temporomandibulares foram submetidas ao ELISA para quantificar as citocinas IL-1 β , IL-10, IL-6 e TNF- α (Figura 21). Na quantificação da IL-1 β , o grupo Controle Positivo apresentou a média significativamente maior (652,4 \pm 90,94) que todos os grupos ($p < 0,05$). Os grupos IND₅ (352,4 \pm 99,43), IND_{2,5} (345,8 \pm 93,90), IND+ ω 3₍₅₊₃₀₀₎ (265,9 \pm 130,4) e NC IND+ ω 3₍₅₊₃₀₀₎ (138,1 \pm 33,02) não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Os grupos Controle Negativo (82,59 \pm 39,46), IND+ ω 3_(2,5+300) (66,88 \pm 30,17) e NC IND+ ω 3_(2,5+300) (69,35 \pm 64,85) apresentaram média significativamente menores que os demais grupos ($p < 0,05$) com exceção dos grupos IND+ ω 3₍₅₊₃₀₀₎ (265,9 \pm 130,4) e NC IND+ ω 3₍₅₊₃₀₀₎ (138,1 \pm 33,02) ($p > 0,05$).

Na quantificação da IL-10, o grupo Controle Positivo apresentou a média significativamente menor (254,7 \pm 69,78) que todos os grupos ($p < 0,05$), contudo, os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Na quantificação da IL-6 e TNF- α , o grupo Controle Positivo apresentou a média significativamente maior que todos os grupos ($p < 0,05$), contudo, os demais grupos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

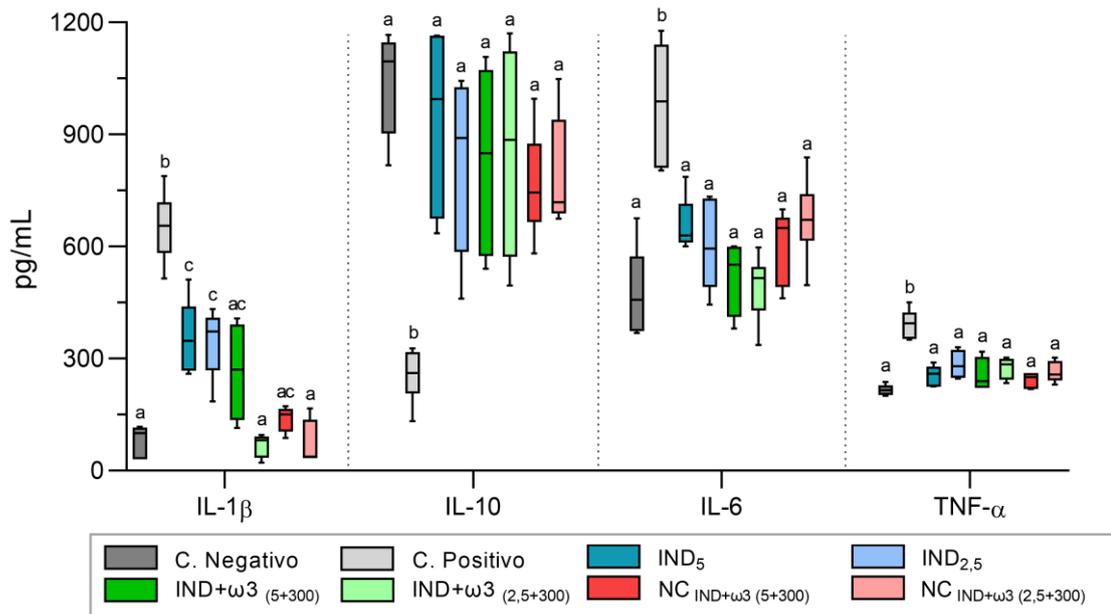


Figura 21 - Quantificação de IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α das articulações temporomandibulares dos ratos. Os diagramas de caixa apresentam a mediana (linha interna da caixa), 1 $^{\circ}$ e 3 $^{\circ}$ quartil (limites da caixa) e limite superior e inferior (suíças). As comparações entre grupos da mesma citocina foram realizadas utilizando ANOVA-Welch e post-hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre grupos da mesma citocina.

5.5 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Foi realizada análise da arquitetura óssea das articulações temporomandibulares analisando o percentual de volume ósseo, espessura trabecular e número trabecular. A figura 22 apresenta os resultados obtidos.

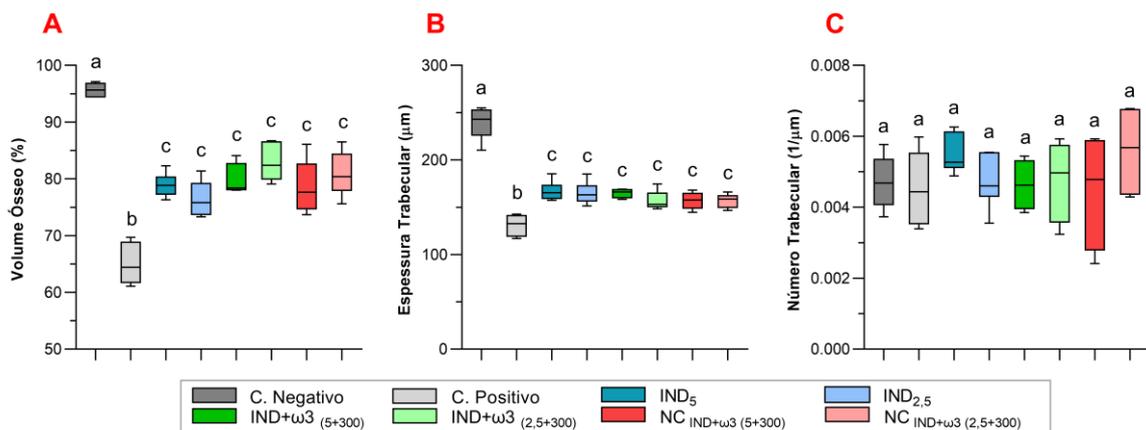


Figura 22 – Resultados da análise da microarquitetura óssea do côndilo: (A) Percentual de volume ósseo; (B) Espessura trabecular; (C) Número trabecular. Dados apresentados em média \pm desvio padrão. As comparações entre grupos foram realizadas utilizando ANOVA-Welch e post-hoc de Games-Howell. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre grupos da mesma variável.

6. DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

Nesse estudo, o nanoencapsulamento da indometacina com o ômega-3 como núcleo oleoso, utilizando a técnica de emulsão-difusão, permitiu que nanocápsulas (NC) poliméricas se formassem dentro da escala nanométrica independente da concentração do fármaco, ainda, a indometacina, de caráter lipofílico, se manteve solúvel no núcleo oleoso da NC (AbdElhamid et al. 2021), resultando em uma suspensão leitosa. Devido à baixa solubilidade da indometacina em água (Alsali e Chan 2022), a falha do nanoencapsulamento do fármaco poderia ser observada em microscopia eletrônica de varredura ou transmissão (Štukelj et al. 2019), pois as NC são suspensas em água, como fase externa, e precipitaria imediatamente o fármaco. Além disso, a suspensão que apresentou um pH ácido, restringiria mais ainda sua solubilidade no meio externo (Alsali e Chan 2022). Logo, após a centrifugação para verificação da eficiência de encapsulamento, as amostras não apresentaram o fármaco insolúvel na fase externa, o que permitiu administrar as NC sem a possibilidade de o fármaco livre estar presente.

Após a síntese, a caracterização das nanocápsulas é importante para se investigar a estabilidade e homogeneidade do sistema além de permitir a reprodutibilidade da técnica empregada. As NC apresentaram uniformidade em sua distribuição com um índice de polidispersão (IPd) comumente aceito para nanopartículas poliméricas (Danaei et al. 2018). Além do IPd, os valores do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) das NC são dados importantes para determinar possíveis interações fisiológicas pois tem impacto direto com o tamanho das NC (Maguire et al. 2018), logo, as NC apresentarem o DHM <250 nm pode ter facilitado sua distribuição por capilares sinusoides no organismo (Sarin 2010; Danaei et al. 2018).

O potencial zeta (PZ) por sua vez, indica a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica das NC e o plano de cisalhamento, apresentando uma magnitude da atração eletrostática entre as NC, que poderá influenciar na floculação do sistema coloidal (Bhattacharjee 2016). Apesar do PZ obtido no estudo ser considerado relativamente instável quando a NC está carregada de indometacina, a suspensão não apresentou qualquer tipo de instabilidade. A razão para que isso aconteça pode ser teorizada pela baixa interação atrativa das forças de van der Waals utilizando a constante de Hamaker, considerando que, mesmo apresentando o PZ baixo, juntamente da interação atrativa baixa das forças de van der Waals, isso seja suficiente para permitir a estabilidade coloidal das NC (Missana e Adell 2000).

Para conferir o encapsulamento da indometacina, a quantificação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência e a convalidação do método apresentou desvio padrão relativo baixo avaliando a exatidão, precisão interdia e intradia do método. A avaliação das NC sem indometacina foi necessária para analisar possíveis sobreposições de picos em comparação ao padrão de indometacina. Em vista que o cromatograma para as NC sem indometacina não apresentou sobreposições, a quantificação de indometacina das NC carregadas foi feita e a eficiência de encapsulamento foi calculada em aproximadamente 90%. Além do cálculo da eficiência, a quantificação é necessária para o planejamento de possíveis correções na administração das NC.

6.2 VIABILIDADE CELULAR POR REDUÇÃO DE MTT

O teste de viabilidade celular avalia as células vivas remanescentes após um determinado tratamento. A utilização de fármacos insolúveis em água, como a indometacina, é uma limitação na cultura celular, pois o meio de cultura utilizado é aquoso e os fármacos não conseguem se solubilizar, contudo, algumas substâncias podem ser utilizadas como cossolventes para ajudar na solubilidade dessas substâncias (Timm et al. 2013). Sendo assim, a solubilização indevida dos fármacos pode apresentar resultados do tipo falso-negativo, enquanto na verdade, não há a distribuição correta do fármaco nas diluições subsequentes dos tratamentos. Nesse estudo, não foi possível dissolver a indometacina em água, dimetilsulfóxido ou etanol (absoluto ou em frações), porém foi possível dissolver em tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4. Apesar do sucesso com a indometacina, o ômega-3 apresentou baixa solubilidade em água e no mesmo tampão, sendo então, uma limitação do estudo.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular apresentaram o valor de DL50 das formulações de NC superior aos tratamentos não encapsulados, assegurando a compatibilidade das NC com os tratamentos convencionais. Ainda, é possível observar que as NC vazias reduziram a viabilidade celular sem diferença significativa em comparação com as NC carregadas com indometacina, podendo supor que a NC por si só apresenta alguma toxicidade, possivelmente em decorrência da fagocitose dos macrófagos RAW 264.7 (Wróblewska et al. 2023) ou por alterações do meio de cultura. A redução da toxicidade da indometacina foi observada em outros estudos utilizando nanocarreadores, como para tratamento de córnea, onde também aumentou a permeabilidade (Nagai et al. 2014), no controle da inflamação em pata de ratos e cultura celular (Almeida Junior et al. 2021) e na redução da citotoxicidade em cultura celular de células hepáticas (Alkoholief et al. 2022).

Sendo assim, a administração das NC nos animais pôde acontecer de forma segura e com toxicidade reduzida em comparação com a administração na forma livre.

6.3 ANÁLISE IMUNOLÓGICA E MORFOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR

Modelos animais são amplamente utilizados em estudos para indução de artrite reumatoide (AR) e apresentam como características patológicas o inchaço das extremidades, hiperplasia, proliferação de tecido sinovial, destruição da cartilagem articular e inflamação excessiva (Olson et al. 2013; Liu et al. 2015; Morin et al. 2015; Yuce et al. 2021). O modelo de indução escolhido nesse estudo, utilizando Adjuvante Completo de Freund (CFA) e colágeno tipo II (CII) na cauda dos animais, induz inflamação e degeneração da articulação temporomandibular, compatível com um estágio crônico da AR. Esse modelo, também utilizado em outros estudos (Barbin et al. 2020; Ceotto et al. 2022; Marana et al. 2022), tem o início da AR rápido, geralmente desenvolvendo-se de 10 a 13 dias após a imunização e com um pico após 20 dias, seguido por um declínio gradual (Ananias et al. 2023).

A quantificação de citocinas tem como finalidade a verificação do estado imunológico com base na patologia de interesse. Nesse estudo, a IL-1 β apresentou um aumento em sua concentração no grupo Controle Positivo em comparação ao Controle Negativo e os grupos tratados, sendo semelhante em outros estudos utilizando o mesmo modelo de indução sistêmica de AR com injeção intradérmica de CFA e CII na cauda (Barbin et al. 2020; Ceotto et al. 2022; Ananias et al. 2023). Em contraste com a IL-1 β , o TNF- α é detectado em tecido sinovial da ATM de animais saudáveis (Figueroba et al. 2018). Os níveis aumentados da IL-1 β e TNF- α no grupo Controle Positivo demonstra a gravidade da AR e está fortemente relacionado a concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias (Kavanaugh e Wells 2014).

No presente estudo, observou-se um aumento nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α juntamente da IL-6 no grupo Controle Positivo, estas estão associadas à metástase de células tumorais e à patologia da AR. (Patil et al. 2019). A IL-6 é produzida abundantemente pela maioria das células do sistema imunológico inato e que representam uma ponte estratégica que conecta o sistema imunológico inato e adaptativo (Nakahara et al. 2003). A IL-10 foi encontrado no grupo Controle Positivo em uma concentração reduzida, o que pode indicar uma resposta à liberação de citocinas pró-inflamatórias de macrófagos e neutrófilos (Liu et al. 2011), também observado em animais com AR de outros estudos (Barbin et al. 2020; Ceotto et al. 2022; Ananias et al. 2023). A IL-10 é de suma importância

devido sua ação anti-inflamatória, que pode suprimir respostas pró-inflamatórias e limitar o dano tecidual causado pela inflamação (Boshtam et al. 2017).

Os tratamentos com indometacina, ômega-3 junto da indometacina de forma livre e ômega-3 junto da indometacina encapsulados, provocaram mudanças significativas nas concentrações das IL-1 β , IL-10, IL-6 e TNF- α . A redução significativa das concentrações da IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos grupos tratados foi devido a atuação sinérgica da indometacina sobre a expressão dos genes relacionados à apoptose celular (Liu et al. 2019) e pela atividade anti-inflamatória dos ácidos graxos DHA e EPA presentes no óleo de peixe, que foi evidenciada em modelos *in vivo* (Barbin et al. 2020; Ceotto et al. 2022) e *in vitro* em cultura de sinoviócitos (Caron et al. 2019).

Apesar da IL-10, IL-6 e TNF- α não terem apresentado diferença significativa entre os grupos que receberam tratamentos, houve diferença estatisticamente significante em comparação com o grupo Controle Positivo, o que permite observar um controle sobre a inflamação, principalmente pela elevação da IL-10, de atividade anti-inflamatória, que se apresenta reduzida na artrite reumatoide (Ni et al. 2022). Além disso, a expressão da IL-6 na artrite reumatoide pode, através de diferentes mecanismos de ação, estimular a síntese de interleucinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (Boshtam et al. 2017), algo que é possível observar nesse estudo, a concentração da IL-6 e IL-10 dos grupos tratados semelhante ao grupo Controle Negativo.

Para verificação da microarquitetura óssea da articulação temporomandibular, a microtomografia computadorizada foi utilizada para aferir o volume ósseo, espessura trabecular e número trabecular. No grupo Controle Positivo, houve uma redução no volume ósseo e na espessura trabecular nos animais com AR induzida, ainda, outros estudos em animais observaram redução no volume ósseo e espessura trabecular na articulação temporomandibular após 2–4 semanas da indução da osteoartrite, sendo a redução mais evidente na 2ª semana (Xu et al. 2016; Cui et al. 2020). Após o tratamento dos animais, foi possível observar um aumento do volume ósseo e espessura trabecular, mas não suficiente para restabelecer sua microarquitetura próximo do grupo Controle Negativo, e ainda, sem modificar o número de trabéculas. A indometacina na densidade óssea em modelos de artrite tem sido investigada, apresentando resultados positivos em função da sua concentração, mas ainda não sendo suficiente para uma reversão total (Aota et al. 1996). Contudo, a melhora nas características ósseas não acontece na osteoporose, causando uma piora na reabsorção óssea conforme a dose da indometacina aumenta (Saino et al. 1997). O ômega-3 por sua vez, pôde

ajudar na redução de prejuízos ósseos, ainda que tempo dependente, mostrando uma melhor mudança em períodos curtos (Bonnet e Ferrari 2011; Marana et al. 2022; Benova et al. 2023).

Ao analisar a cartilagem condilar da ATM, foi possível notar uma diminuição na espessura da cartilagem articular no grupo Controle Positivo com AR induzida, um resultado encontrado em outros estudos com AR induzida na cauda por CFA + CII (Barbin et al. 2020; Ceotto et al. 2022). Além da redução da cartilagem articular, houve uma diminuição nas camadas fibrosa, proliferativa e maturada no mesmo grupo, resultado também observado em outros estudos (Ceotto et al. 2022; Ananias et al. 2023). Podemos observar no grupo Controle Positivo uma redução na densidade de proteoglicanos (coloração azul de toluidina) que também foi observada na ATM em outros estudos de AR induzida (Barbin et al. 2020; Ceotto et al. 2022; Ananias et al. 2023). A perda de proteoglicanos reduz a capacidade adaptativa de resistência, compressão e tensão, predispondo a articulação às deformidades. Além disso, o número reduzido de células fibrocartilaginosa pode comprometer sua capacidade de autorreparação (Tanaka et al. 2005).

Um aumento significativo foi observado na espessura da cartilagem articular nos grupos que receberam os tratamentos em comparação com o grupo Controle Positivo. O impacto da indometacina sobre a cartilagem tem sido muito estudado, mas aparentemente não apresenta um efeito negativo sobre a matriz extracelular da cartilagem articular em situações saudáveis (Palmoski e Brandt 1983; Desa et al. 1988), contudo isso não acontece em uma situação em que há uma depleção prévia de proteoglicanos, podendo ainda aumentar a depleção já presente (Palmoski e Brandt 1983).

Por outro lado, o ômega-3 apresenta um controle sobre as metaloproteinases, enzimas responsáveis pela degradação da matriz de colágeno observada nas lâminas histológicas coradas com picrossirius vermelho e vistas com luz polarizada (Shinto et al. 2011), em adição, é possível observar matrizes verdes nos grupos que receberam tratamentos, sendo um indício de reparo na matriz (Mathew-Steiner et al. 2021), o que fica evidente ao analisar o disco articular, mensura sua espessura, observando uma redução bastante acentuada no grupo Controle Positivo em relação aos demais grupos. Ao receber tratamento, os discos articulares tiveram sua espessura aumentada, o que pode acontecer devido o controle do ômega-3 sobre as metaloproteinases e controle da doença como um todo, reduzindo as citocinas inflamatórias e aumenta a anti-inflamatória IL-10. Apesar da coloração de picrossirius vermelho com luz polarizada ser utilizada para quantificação de diferentes fibras de colágeno em cortes histológicos, as cores das fibras dependerão do posicionamento da

amostra em função da luz polarizada, logo, a utilização da técnica para verificação apenas da variedade das fibras pode ser uma opção segura (Coelho et al. 2018).

O estudo apresentou resultados significativos nos tratamentos com ômega-3 e nanocápsulas para o controle da inflamação e melhora da organização da ATM de forma superior ao comparar com os tratamentos utilizando apenas indometacina. Ainda, foi possível observar que a dose da indometacina reduzida pela metade apresentou resultados significativos, sugerindo que uma redução da dose também pode ser efetiva. Contudo, é necessário que estudos clínicos utilizando ômega-3 e nanocápsulas administradas via oral sejam conduzidos para elucidar a efetividade desses tratamentos em humanos em períodos de tempos curtos e longos.

7. CONCLUSÃO

A síntese e caracterização das nanocápsulas atingiram o objetivo de se produzir um carreador para a indometacina e ômega-3, além disso, as nanocápsulas sintetizadas apresentaram citotoxicidade reduzida quando comparadas com os tratamentos na forma livre, apresentando então uma alternativa viável para estudos *in vivo*. Além disso, os animais tratados com as nanocápsulas apresentaram uma melhora na organização do tecido articular, representando uma alternativa útil no tratamento da artrite reumatoide na articulação temporomandibular.

REFERÊNCIAS *

Abdelhamid AS, Zayed DG, Heikal L, Khattab SN, Mady OY, El-Gizawy SA, et al. Recent advances in polymer shell oily-core nanocapsules for drug-delivery applications. *Nanomed* 2021;16:1613–25. <https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0037>.

Albagieh H, Alomran I, Binakresh A, Alhatarisha N, Almeteb M, Khalaf Y, et al. Occlusal splints-types and effectiveness in temporomandibular disorder management. *Saudi Dent J* 2023;35:70–9. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2022.12.013>.

Alkoholief M, Kalam MA, Anwer MK, Alshamsan A. Effect of Solvents, Stabilizers and the Concentration of Stabilizers on the Physical Properties of Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanoparticles: Encapsulation, In Vitro Release of Indomethacin and Cytotoxicity against HepG2-Cell. *Pharmaceutics* 2022;14:870. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040870>.

Almeida Junior S, Pereira PM, Tótolí V de S, Neves ES, Monochio M, Alvarenga AWO, et al. Incorporation of indomethacin into a mesoporous silica nanoparticle enhances the anti-inflammatory effect Indomethacin into a mesoporous silica. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci* 2021;157:105601. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105601>.

Alomar X, Medrano J, Cabratosa J, Clavero JA, Lorente M, Serra I, et al. Anatomy of the Temporomandibular Joint. *Semin Ultrasound CT MRI* 2007;28:170–83. <https://doi.org/10.1053/j.sult.2007.02.002>.

Alsalmi MS, Chan KLA. Amino acid hydrotropes to increase the solubility of indomethacin and carbamazepine in aqueous solution. *Int J Pharm* 2022;617:121591. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121591>.

Ananias FEF, Dos Santos VAB, Groppo FC, Henriques GEP, Toledo JR, da Silva Pais R, et al. Inflammatory and degenerative effects of induced osteoarthritis/rheumatoid arthritis models on temporomandibular joint of rats. *Arch Oral Biol* 2023;150:105693. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105693>.

Andre A, Kang J, Dym H. Pharmacologic Treatment for Temporomandibular and Temporomandibular Joint Disorders. *Oral Maxillofac Surg Clin N Am* 2022;34:49–59. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2021.08.001>.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Aota S, Nakamura T, Suzuki K, Tanaka Y, Okazaki Y, Segawa Y, et al. Effects of indomethacin administration on bone turnover and bone mass in adjuvant-induced arthritis in rats. *Calcif Tissue Int* 1996;59:385–91. <https://doi.org/10.1007/s002239900144>.

Armijo-Olivo S, Pitance L, Singh V, Neto F, Thie N, Michelotti A. Effectiveness of Manual Therapy and Therapeutic Exercise for Temporomandibular Disorders: Systematic Review and Meta-Analysis. *Phys Ther* 2016;96:9–25. <https://doi.org/10.2522/ptj.20140548>.

Barbin T, Groppo FC, Toledo FC, Costa YM, Clemente-Napimoga JT, Figueroba SR. The effect of omega-3 in temporomandibular joint synovial tissues of rats with induced arthritis: pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2020;49:1319–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2020.01.012>.

Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001;1:377–85.

Benova A, Ferencakova M, Bardova K, Funda J, Prochazka J, Spoutil F, et al. Omega-3 PUFAs prevent bone impairment and bone marrow adiposity in mouse model of obesity. *Commun Biol* 2023;6:1–17. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05407-8>.

Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Controlled Release* 2016;235:337–51. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.

Bonnet N, Ferrari SL. Effects of long-term supplementation with omega-3 fatty acids on longitudinal changes in bone mass and microstructure in mice. *J Nutr Biochem* 2011;22:665–72. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.05.006>.

Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation* 2017;40:340–9. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0477-1>.

Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:469–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.08.010>.

Caporali R, Todoerti M, Sakellariou G, Montecucco C. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Drugs* 2013;73:31–43. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0008-4>.

Caron JP, Gandy JC, Brown JL, Sordillo LM. Omega-3 fatty acids and docosahexaenoic acid oxymetabolites modulate the inflammatory response of equine recombinant interleukin1 β -stimulated equine synoviocytes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2019;142:1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.02.007>.

Ceotto BH, Figueroba SR, Ferreira LEN, Amorim KS, Sánchez JB, Gercina AC, et al. The effect of association of aspirin and omega 3 in rat temporomandibular joint with induced arthritis. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges* 2022;239:151812.

<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2021.151812>.

Coelho PGB, Souza MV de, Conceição LG, Vitoria MIV, Bedoya SAO. Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy. *An Bras Dermatol* 2018;93:415–8. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187544>.

Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Vauthier C. Nanocapsule Technology: A Review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2002;19:99–134.

<https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i2.10>.

Croft AP, Campos J, Jansen K, Turner JD, Marshall J, Attar M, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* 2019;570:246–51.

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1263-7>.

Cruz L, Soares LU, Costa TD, Mezzalira G, da Silveira NP, Guterres SS, et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharm* 2006;313:198–205.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.035>.

Cui SJ, Zhang T, Fu Y, Liu Y, Gan YH, Zhou YH, et al. DPSCs Attenuate Experimental Progressive TMJ Arthritis by Inhibiting the STAT1 Pathway. *J Dent Res* 2020;99:446–55.

<https://doi.org/10.1177/0022034520901710>.

Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018;10:57.

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

Dennis EA, Norris PC. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2015;15:511–23. <https://doi.org/10.1038/nri3859>.

Desa FM, Chander CL, Howat DW, Moore AR, Willoughby DA. Indomethacin and cartilage breakdown. *J Pharm Pharmacol* 1988;40:667. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1988.tb05337.x>.

Dyerberg J, Bang HO, Hjorne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr* 1975;28:958–66. <https://doi.org/10.1093/ajcn/28.9.958>.

Dym H, Israel H. Diagnosis and treatment of temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am* 2012;56:149–61, ix. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2011.08.002>.

Fan Y, Cui C, Li P, Bi R, Lyu P, Li Y, et al. Fibrocartilage Stem Cells in the Temporomandibular Joint: Insights From Animal and Human Studies. *Front Cell Dev Biol* 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665995>.

Figueroba SR, Desjardins MP, Ferreira LEN, Berto LA, Valdrighi HC, Groppo FC. The influence of altered occlusion on pro-inflammatory cytokine levels in the TMJ synovial tissues of rats. *Arch Oral Biol* 2014;59:1164–71. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.07.003>.

Figueroba SR, Groppo MF, Faibish D, Groppo FC. The action of anti-inflammatory agents in healthy temporomandibular joint synovial tissues is sex-dependent. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2018;47:205–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.08.006>.

Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–61. <https://doi.org/10.1038/nature01661>.

Fonseca FC, Orlando RM, Turchetti-Maia RM, de Francischi JN. Comparative effects of the ω 3 polyunsaturated fatty acid derivatives resolvins E1 and D1 and protectin DX in models of inflammation and pain. *J Inflamm Res* 2017;10:119–33. <https://doi.org/10.2147/JIR.S142424>.

Habu M, Tominaga K, Sukedai M, Alstergren P, Ohkawara S, Kopp S, et al. Immunohistochemical study of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in an antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2002;31:45–54. <https://doi.org/10.1046/j.0904-2512.2001.10057.x>.

Holwegner C, Reinhardt AL, Schmid MJ, Marx DB, Reinhardt RA. Impact of local steroid or statin treatment of experimental temporomandibular joint arthritis on bone growth in young rats. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 2015;147:80–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2014.09.016>.

Jung SM, Kim KW, Yang C-W, Park S-H, Ju JH. Cytokine-Mediated Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res* 2014;2014:263625. <https://doi.org/10.1155/2014/263625>.

Kaneyama K, Segami N, Nishimura M, Suzuki T, Sato J. Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2002;40:418–23. [https://doi.org/10.1016/S0266-4356\(02\)00215-2](https://doi.org/10.1016/S0266-4356(02)00215-2).

Kavanaugh A, Wells AF. Benefits and risks of low-dose glucocorticoid treatment in the patient with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl* 2014;53:1742–51. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keu135>.

Liu M, Mao W, Guan H, Li L, Wei B, Li P. Effects of taurochenodeoxycholic acid on adjuvant arthritis in rats. *Int Immunopharmacol* 2011;11:2150–8. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.09.011>.

Liu Q, Wu Z, Hu D, Zhang L, Wang L, Liu G. Low dose of indomethacin and Hedgehog signaling inhibitor administration synergistically attenuates cartilage damage in osteoarthritis by controlling chondrocytes pyroptosis. *Gene* 2019;712:143959. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.143959>.

Liu Q, Zhu X-Z, Feng R-B, Liu Z, Wang G-Y, Guan X-F, et al. Crude triterpenoid saponins from *Anemone flaccida* (Di Wu) exert anti-arthritic effects on type II collagen-induced arthritis in rats. *Chin Med* 2015;10:20. <https://doi.org/10.1186/s13020-015-0052-y>.

Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache* 2016;56:436–46. <https://doi.org/10.1111/head.12769>.

Maguire CM, Rösslein M, Wick P, Prina-Mello A. Characterisation of particles in solution – a perspective on light scattering and comparative technologies. *Sci Technol Adv Mater* 2018;19:732–45. <https://doi.org/10.1080/14686996.2018.1517587>.

- Marana RR, Benedicto Dos Santos VA, Groppo FC, Ferreira LEN, Sánchez JB, Barbin T, et al. Omega 3 polyunsaturated fatty acids: Potential anti-inflammatory effect in a model of ovariectomy and temporomandibular joint arthritis induction in rats. *Arch Oral Biol* 2022;134:105340. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105340>.
- Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* 2021;8. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>.
- Missana T, Adell A. On the Applicability of DLVO Theory to the Prediction of Clay Colloids Stability. *J Colloid Interface Sci* 2000;230:150–6. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7003>.
- Mohamad N, de Oliveira-Souza AIS, de Castro-Carletti EM, Müggenborg F, Dennett L, McNeely ML, et al. The effectiveness of different types of acupuncture to reduce symptoms and disability for patients with orofacial pain. A systematic review and meta-analysis. *Disabil Rehabil* 2024:1–17. <https://doi.org/10.1080/09638288.2024.2310766>.
- Moinard-Chécot D, Chevalier Y, Briançon S, Beney L, Fessi H. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *J Colloid Interface Sci* 2008;317:458–68. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.081>.
- Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.
- Morin C, Blier PU, Fortin S. Eicosapentaenoic acid and docosapentaenoic acid monoglycerides are more potent than docosahexaenoic acid monoglyceride to resolve inflammation in a rheumatoid arthritis model. *Arthritis Res Ther* 2015;17:142. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0653-y>.
- Nagai N, Ito Y, Okamoto N, Shimomura Y. A nanoparticle formulation reduces the corneal toxicity of indomethacin eye drops and enhances its corneal permeability. *Toxicology* 2014;319:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.02.012>.
- Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:1521–9. <https://doi.org/10.1002/art.11143>.

Nalamachu S, Wortmann R. Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: a review of the literature. *Postgrad Med* 2014;126:92–7. <https://doi.org/10.3810/pgm.2014.07.2787>.

Ni S, Shan F, Geng J. Interleukin-10 family members: Biology and role in the bone and joint diseases. *Int Immunopharmacol* 2022;108:108881. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.108881>.

Nicoll SB, Hee CK, Davis MB, Winkelstein BA. A rat model of temporomandibular joint pain with histopathologic modifications. *J Orofac Pain* 2010;24:298–304.

Olson MV, Liu Y-C, Dangi B, Paul Zimmer J, Salem N, Nauroth JM. Docosahexaenoic acid reduces inflammation and joint destruction in mice with collagen-induced arthritis. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc AI* 2013;62:1003–13. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0658-4>.

Ozmen EE, Unuvar BS. The effects of dry needling and face yoga on pain, depression, function, and sleep quality in patients with temporomandibular dysfunction. *Explore N Y N* 2024;S1550-8307(24)00006-5. <https://doi.org/10.1016/j.explore.2024.01.006>.

Palmoski MJ, Brandt KD. Relationship between matrix proteoglycan content and the effects of salicylate and indomethacin on articular cartilage. *Arthritis Rheum* 1983;26:528–31. <https://doi.org/10.1002/art.1780260412>.

Park Y, Lee A, Shim S-C, Lee JH, Choe J-Y, Ahn H, et al. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in patients with rheumatoid arthritis: a 16-week randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-design multicenter study in Korea. *J Nutr Biochem* 2013;24:1367–72. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.11.004>.

Parolini C. The Role of Marine n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Inflammatory-Based Disease: The Case of Rheumatoid Arthritis. *Mar Drugs* 2023;22:17. <https://doi.org/10.3390/md22010017>.

Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, et al. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *Int J Mol Sci* 2019;20:4367. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biol* 2020;18:e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>.

Racine RA, Deckelbaum RJ. Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:123–8. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3280129652>.

Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2008;22:659–61. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>.

Romero-Reyes M, Bassiur JP. Temporomandibular Disorders, Bruxism and Headaches. *Neurol Clin* 2024;42:573–84. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2023.12.010>.

Ruiz-Lopez N, Usher S, Sayanova OV, Napier JA, Haslam RP. Modifying the lipid content and composition of plant seeds: engineering the production of LC-PUFA. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:143–54. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6217-2>.

Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2007;3:20–31. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>.

Saini RK, Prasad P, Sreedhar RV, Akhilender Naidu K, Shang X, Keum Y-S. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Emerging Plant and Microbial Sources, Oxidative Stability, Bioavailability, and Health Benefits—A Review. *Antioxidants* 2021;10:1627. <https://doi.org/10.3390/antiox10101627>.

Saino H, Matsuyama T, Takada J, Kaku T, Ishii S. Long-term treatment of indomethacin reduces vertebral bone mass and strength in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 1997;12:1844–50. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.11.1844>.

Sarin H. Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. *J Angiogenesis Res* 2010;2:14. <https://doi.org/10.1186/2040-2384-2-14>.

Schaffazick SR, Guterres SS, De Lucca Freitas L, Pohlmann AR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quimica Nova* 2003;26:726–37. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422003000500017>.

Shinto L, Marracci G, Bumgarner L, Yadav V. The Effects of Omega-3 Fatty Acids on Matrix Metalloproteinase-9 Production and Cell Migration in Human Immune Cells: Implications for Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis* 2011;2011:134592. <https://doi.org/10.4061/2011/134592>.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011;7:55. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55>.

Souto EB, Severino P, Santana MHA. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir da Polimerização de Monômeros - Parte I. *Polimeros* 2012;22:96–100. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000006>.

Štukelj J, Svanbäck S, Kristl J, Strachan CJ, Yliruusi J. Image-Based Investigation: Biorelevant Solubility of α and γ Indomethacin. *Anal Chem* 2019;91:3997–4003. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05290>.

Sundar S, Kundu J, Kundu SC. Biopolymeric nanoparticles. *Sci Technol Adv Mater* 2010;11:014104. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>.

Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:259–69. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200002\)43:2<259::AID-ANR4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200002)43:2<259::AID-ANR4>3.0.CO;2-W).

Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, et al. Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 2005;123:275–81. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0773-6>.

Timm M, Saaby L, Moesby L, Hansen EW. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology* 2013;65:887–94. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9530-6>.

Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987;56:279–85.

<https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>.

Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem* 2007;282:22254–66.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M703169200>.

Wiktorowska-Owczarek A, Berezińska M, Nowak JZ. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ* 2015;24:931–41.

<https://doi.org/10.17219/acem/31243>.

Wróblewska A, Szczygieł A, Szermer-Olearnik B, Pajtasz-Piasecka E. Macrophages as Promising Carriers for Nanoparticle Delivery in Anticancer Therapy. *Int J Nanomedicine* 2023;18:4521–39. <https://doi.org/10.2147/IJN.S421173>.

Xu L, Guo H, Li C, Xu J, Fang W, Long X. A time-dependent degeneration manner of condyle in rat CFA-induced inflamed TMJ. *Am J Transl Res* 2016;8:556–67.

Yuce P, Hosgor H, Rencher SF, Yazir Y. Effects of Intra-Articular Resveratrol Injections on Cartilage Destruction and Synovial Inflammation in Experimental Temporomandibular Joint Osteoarthritis. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg* 2021;79:344.e1-344.e12. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.09.015>.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA 1 (2020)

CERTIFICADO CEUA nº 7/2020



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO DAS NANOCAPSULAS DE INDOMETACINA E ÔMEGA 3 EM POLI(ε-CAPROLACTONA) NA ARTRITE INDUZIDA EM ATM DE RATOS**, registrada com o nº **5599-1/2020**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Sidney Figueroba Raimundo e Victor Augusto Benedicto dos Santos**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **18/09/2020**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	18/01/2021 a 16/12/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/09/2020 a 16/12/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **19 de outubro de 2020**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da

CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica

Informar código 5688A8A3 86CE4FF9 B824BA77 1999BDF5

ANEXO 2 – CERTIFICADO CEUA 2 (2023)

CERTIFICADO CEUA nº 284/2023



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO DAS NANOCAPSULAS DE INDOMETACINA E ÔMEGA 3 EM POLI(ε-CAPROLACTONA) NA ARTRITE INDUZIDA EM ATM DE RATOS**, registrada com o nº **6354-1/2023**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e Victor Augusto Benedicto dos Santos, Sidney Figueroba Raimundo**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **22/11/2023**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/01/2024 a 25/11/2024
Vigência da autorização para manipulação animal:	22/11/2023 a 25/11/2024
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH(Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH(Wistar)
No. de animais:	6
Idade/Peso:	3.00 Meses / 400.00 Gramas
Sexo:	6 Machos
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **14 de dezembro de 2023**.

 Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
 Presidente da CEUA/Unicamp

 Eduardo Villaverde Haszler
 Secretário Executivo

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO 3 – RELATÓRIO DE PLÁGIO

ORIGINALITY REPORT			
3%	%	3%	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS
PRIMARY SOURCES			
1	Fernanda Elisa Ferreira Ananias, Victor Augusto Benedicto dos Santos, Francisco C. Groppo, Guilherme Elias Pessanha Henriques et al. "Inflammatory and degenerative effects of induced osteoarthritis/rheumatoid arthritis models on temporomandibular joint of rats", Archives of Oral Biology, 2023 Publication	1%	
2	Mariana de Oliveira Daltoé. "Avaliação in vitro da estabilidade de cor, da rugosidade superficial e da microdureza de materiais restauradores estéticos, após imersão em bebidas infantis ou envelhecimento artificial acelerado", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2020 Publication	1%	
3	Ytalo Freitas Fernandes. "Avaliação do uso de enxerto ósseo suíno no reparo de defeitos ósseos críticos criados cirurgicamente na calvária de ratos. Estudo histomorfométrico e microtomográfico", Universidade de Sao	1%	

Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao
Academica (AGUIA), 2022

Publication

-
- 4** Monika P. Tagliari, Andréa Granada, Gislaine Kuminek, Hellen K. Stulzer, Marcos A. S. Silva. **1%**
"Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato", Química Nova, 2012

Publication

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On