



LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA

**“Efeitos dos anestésicos locais associados a
carreadores na modulação de mediadores
inflamatórios, viabilidade celular e apoptose.”**

Piracicaba

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA

**“Efeitos dos anestésicos locais associados a
carreadores na modulação de mediadores
inflamatórios, viabilidade celular e apoptose.”**

Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Odontologia na área de “Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.”

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo
Co-orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Volpato

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Luiz Eduardo Nunes Ferreira e orientado pelo prof. Dr. Francisco Carlos Groppo.

Assinatura do Orientador

**Piracicaba
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

F413e Ferreira, Luiz Eduardo Nunes, 1986-
Efeitos dos anestésicos locais associados a carreadores na modulação de mediadores inflamatórios, viabilidade celular e apoptose / Luiz Eduardo Nunes Ferreira. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Francisco Carlos Groppo.
Coorientador: Maria Cristina Volpato.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Anestésicos locais. 2. Lipossomos. 3. Beta-ciclodextrina. 4. Inflamação. 5. Viabilidade celular. I. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. II. Volpato, Maria Cristina, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of local anesthetics associated to carriers on the modulation of inflammatory mediators, cell viability and apoptosis

Palavras-chave em inglês:

Local anesthetics

Liposomes

Beta-cyclodextrin

Inflammation

Cell viability

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Francisco Carlos Groppo [Orientador]

Leonardo Fernandes Fraceto

Bruno Schneider Herrera

Marcelo Rocha Marques

Carina Denny

Data de defesa: 13-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



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 13 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato LUIZ EDUARDO NUNES FERREIRA aprovado.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "F. C. Groppo".

Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Leonardo Fernandes Fraceto".

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Bruno Schneider Herrera".

Prof. Dr. BRUNO SCHNEIDER HERRERA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Marcelo Rocha Marques".

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carina Denny".

Profa. Dra. CARINA DENNY

RESUMO

A associação de anestésicos locais a sistemas de liberação modificados tem sido proposta visando prolongar o efeito anestésico e reduzir a citotoxicidade e indução da apoptose sobre diversos tipos celulares. Novas formulações anestésicas produziram uma baixa toxicidade sistêmica e maior duração da anestesia, porém também foram observados efeitos adversos como o aparecimento de processos inflamatórios. Desta maneira, o objetivo do estudo foi comparar os efeitos dos anestésicos locais livres em relação aos associados a carreadores sobre a modulação dos mediadores IL-6, IL-1 α , IL-8, TNF- α , IL-10 e PGE₂, além de sua ação sobre a viabilidade celular e indução da apoptose. Células HaCaT e FGH em cultura foram expostas a diferentes concentrações dos anestésicos bupivacaína, lidocaína e ropivacaína livres ou associados a lipossomos ou HP- β -CD, por 6h e 24h. A quantificação das citocinas e PGE₂ foi realizada utilizando o teste de ELISA de captura. A viabilidade celular foi quantificada pelo método do XTT e avaliada qualitativamente por microscopia de fluorescência (LIVE/DEAD). A indução da apoptose foi estimada através de citometria de fluxo. A lidocaína associada com carreadores aumentou a liberação de citocinas, onde nos FGH a formulação lipossomal 100 μ M estimulou um aumento significativo na liberação de TNF- α , IL-8 e IL-6, já as formulações em HP- β -CD conduziram a um aumento na liberação destes mediadores após 24h. Os tratamentos com lidocaína induziram aumento na liberação de PGE₂ e pouco afetaram a viabilidade celular, onde apenas a formulação 100 μ M livre apresentou perda de viabilidade após 24h nas células HaCaT. As formulações de ropivacaína em lipossomos aumentaram a liberação de IL-1 α , TNF- α e IL-6 nos FGH e IL-8 nas células HaCaT. A liberação de PGE₂ foi semelhante aos tratamentos com lidocaína. As formulações de ropivacaína

reduziram significativamente a viabilidade celular nas células HaCaT após 24h. As formulações de bupivacaína apresentaram uma resposta inflamatória mais acentuada que a lidocaína, porém com características semelhantes em relação a associação a carreadores. A liberação de PGE₂ variou de acordo com o tipo celular. As formulações de bupivacaína causaram maior perda de viabilidade celular em comparação com a lidocaína, sendo mais acentuada pela complexação com HP- β -CD. A indução da apoptose nas células HaCaT apresentaram resultados semelhantes entre os tratamentos e o controle, onde as formulações lipossomais de bupivacaína e ropivacaína apresentaram maiores alterações quando somados os percentuais de apoptose e necrose. Concluí-se que o tipo celular, a molécula de anestésico local e o carreador utilizado foram fatores determinantes sobre a liberação de citocinas e PGE₂. Os anestésicos locais associados aos carreadores apresentaram um maior potencial inflamatório estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A viabilidade celular avaliada após tratamentos associados a carreadores variou em função do potencial citotóxico da molécula de anestésico local. Desta maneira, este estudo obteve resultados inéditos contribuindo para o aperfeiçoamento de novas formulações anestésicas.

Palavras-Chave: Anestésicos Locais, Lipossomos, Hidroxipropil- β -Ciclodextrina, Mediadores Inflamatórios, Viabilidade Celular, Apoptose.

ABSTRACT

Local anesthetics association to modified drug release systems have been proposed in order to prolong the anesthetic effect and reduce the toxicity. These new anesthetics formulations produced a low systemic toxicity and a longer anesthesia duration, however side effects were also observed such as local inflammation. The aim of this study was compare the effects of plain and carriers association local anesthetics formulations on the modulation of IL-6, IL1- α , IL-8, TNF- α , IL-10 and PGE₂ release, their effects on cell viability and apoptosis induction in HaCaT and FGH. Cells were exposed to different concentrations of bupivacaine, lidocaine and ropivacaine in a plain formulation or associated with liposome or HP- β -CD for 6h and 24h. Cytokines and PGE₂ quantification was performed by ELISA. Cell viability was measured by XTT assay and qualitatively assessed by fluorescent microscopy (LIVE/DEAD). Apoptosis induction was estimated by flow cytometry. Lidocaine in association with carriers increased cytokines release. The 100 μ M liposomal formulations stimulated a significant increase in the TNF- α , IL-8 and IL-6 release by FGH cells. HP- β -CD formulations led to an increase of these mediators in the FGH cells after 24h. Lidocaine treatments induced an increase in the release of PGE₂ and low effect on cell viability, where only 100 the μ M plain lidocaine showed cell viability loss after 24h in HaCaT cells. Liposomal ropivacaine formulations increased the release of IL- α , TNF- α and IL-6 by FGH and IL-8 by HaCaT cells. PGE₂ release was similar to lidocaine treatments. Ropivacaine formulations significantly reduced cell viability in HaCaT cells after 24h. Bupivacaine formulations showed a stronger inflammatory response than lidocaine, but with similar characteristics after carriers association. PGE₂ release varied according to cell type. Bupivacaine formulations caused more cell viability loss

when compared with lidocaine, being more accentuated by HP- β -CD complexation. Control and treatments showed similar results in apoptosis induction in HaCaT cells. Liposomal bupivacaine and ropivacaine formulations showed more alterations when aggregating the percentage of apoptosis and necrosis. In conclusion, cell type, local anesthetic molecule and the kind of carrier were determinants factors for cytokines and PGE₂ release. Local anesthetics associated with carriers showed a higher inflammatory potential by an increased in the pro-inflammatory cytokines. The benefits of carriers association on cell viability varied with the cytotoxic potential of the local anesthetic molecule. In fact, this study produced a first reported of the effects of liposomal and HP- β -CD local anesthetics formulations on the inflammatory mediators release in HaCaT and FGH. Others aspects such as cell viability and apoptosis were also evaluated, contributing to the development and improvement of new local anesthetics formulations.

Key-words: Local Anesthetics, Liposome, HP- β -CD, Inflammation, Cell Viability, Apoptosis.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| DEDICATÓRIA..... | Xiii |
| AGRADECIMENTOS..... | xv |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | xvii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 5 |
| 2.1 Anestésicos locais e mecanismos de ação..... | 5 |
| 2.2 Modulação do processo inflamatório..... | 6 |
| 2.3 Indução da necrose celular pelos anestésicos locais..... | 10 |
| 2.4 Indução da apoptose pela ativação das caspases..... | 11 |
| 2.5 Complexação dos anestésicos locais a carreadores..... | 14 |
| 3. PROPOSIÇÃO..... | 21 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 4.1 Material..... | 23 |
| 4.2. Preparação das suspensões..... | 23 |
| 4.2.1 Preparação das suspensões anestésicas em lipossomos multilamelar..... | 23 |
| 4.2.2 Preparação das suspensões anestésicas em Hidroxipropil- β -ciclodextrina..... | 24 |
| 4.3. Cultura Celular..... | 24 |
| 4.4. Condições Experimentais..... | 25 |
| 4.5. Imunoensaio..... | 25 |
| 4.6. Quantificação de PGE ₂ | 26 |
| 4.7. Viabilidade Celular..... | 27 |
| 4.8. Análise da Citotoxicidade por Microscopia de Fluorescência..... | 27 |
| 4.9. Análise da Apoptose por Citômetro de Fluxo..... | 28 |
| 4.10. Análise Estatística..... | 29 |
| 5. RESULTADOS..... | 31 |
| 5.1. Liocaína..... | 31 |
| 5.2. Ropivacaína..... | 43 |
| 5.3. Bupivcaína..... | 55 |
| 5.4. Efeitos dos anestésicos locais na apoptose celular..... | 67 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 71 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 85 |
| REFERÊNCIAS..... | 87 |

Dedicatória

Dedico a este trabalho a Deus, a meu pai Wilson Eduardo Ferreira, a minha mãe Liliana do Rocio Nunes Ferreira e a minha irmã Simone Cristina Ferreira por estarem sempre ao meu lado em todas as situações da vida e compartilharem de todo seu amor comigo.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos professores do curso de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, especialmente a Profa. Dra. Patrícia Maria Stuelp Campello, que foi a minha primeira orientadora e ao Prof. Dr. Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa.

Agradeço ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo e a Profa. Dra. Maria Cristina Volpato pela dedicação, paciência e por todos os ensinamentos e contribuições para o projeto e para minha formação acadêmica ao longo deste período.

Gostaria de agradecer especialmente a José Carlos Gregório e Eliane Melo Franco, técnicos do laboratório de Farmacologia, por todo suporte e pela grande amizade vivenciada ao longo do tempo.

Agradeço aos amigos do departamento de histologia Gustavo Narvaes e Rodrigo Augusto da Silva que sempre com muita solicitude atenderam os meus pedidos de ajuda, além de todos os ensinamentos na parte de cultura de células.

Também gostaria de agradecer aos amigos da republica Cleiton Pita Santos, Marcelo Franchin e Bruno Vilela Muniz pelos bons momentos compartilhados, e aos colegas de laboratório Luciano Serpe, Bruna Benso, Carina Denny, Talita S. Graziano, Irlan de Almeida, Marcos Guilherme da Cunha, Ana Paula Guerreiro Bentes, Paula Sampaio e em especial a Camila Batista e Lívia Câmara Galvão.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto, no processo número 2011/12666-8, e a UNICAMP pelo suporte técnico e estrutural.

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AA: ácido araquidônico

AIF: ("apoptosis-inducing factor") fator de indução de apoptose

ANOVA: análise de variância

ATP: trifosfato de adenosina

APAF-1: ("apoptotic protease-activating factor-1") fator 1 de ativação de proteases pró-apoptóticas

Bak: ("Bcl-2 antagonist killer 1") proteína 1 antagonista/exterminadora de Bcl-2

Bax: ("Bcl-2-associated X protein") proteína X associada à Bcl-2

Bcl-2: ("B-cell lymphoma protein-2") proteína 2 de linfoma de células B

Ca²⁺: íon cálcio

CD: ciclodextrinas

CSF: ("cerebrospinal fluid") fluido cerebroespinal

CO₂: dióxido de carbono

COX-2: ciclooxygenase 2

°C: grau celsius

DISC: ("death-inducing signaling complex"): complexo de sinalização indutor de morte

DMEM: ("Dulbecco's modified Eagle's medium"): meio Eagle modificado por Dulbecco

ERK: ("extracellular signal-regulated kinases"): quinases reguladas por sinal extracelular

EthD-1: Ethidium Homodimer-1

FBS: soro fetal bovino

FGH: linhagem imortalizada de fibroblastos gengivais humanos

Fig.: figura

h: hora

H⁺: íon hidrogênio

HaCaT: linhagem imortalizada de queratinócitos humanos

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico

HP-β-CD: hidroxipropil-beta-ciclodextrina

IκB: ("inhibitor kappa beta") inibidor kappa beta.

IL-1α: interleucina 1α

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

INF-γ: interferon-gamma

JNK: ("c-Jun N-terminal kinases"): quinases c-Jun N-terminal

LPS: lipopolissacarídeo

LTB₄: leucotrieno B₄

mL: mililitro

Na²⁺: íon sódio

NaCl: cloreto de sódio

NFκB: (Nuclear factor kappa beta) fator nuclear kappa beta.

PBS: ("phosphate-buffered saline") solução salina tamponada com fosfato

PGE₂: prostaglandina E₂

PLA₂: fosfolipase A₂

SNC: Sistema Nervoso Central

TNF- α : ("tumor necrosis fator α) fator de necrose tumoral α

XTT: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. INTRODUÇÃO

A busca pelo melhor e mais eficiente controle da dor tem resultado em novos agentes terapêuticos (de Jong, 1994). Basicamente, os anestésicos locais são os fármacos usados para atenuar ou eliminar a dor por meio de um bloqueio reversível da transmissão excitatória dos axônios (Strichart & Ritchie, 1987).

Embora os anestésicos locais sejam utilizados para o bloqueio temporário da condutividade nervosa, eles também têm ação em alvos que podem modular vias celulares relacionadas a resposta inflamatória, cicatrização, apoptose e necrose celular (Hollmann & Durieux, 2000; Cassuto *et al.*, 2006).

Normalmente, o uso destes medicamentos é restrito devido a sua ação curta, resultado da sua rápida dispersão do local onde foi injetado (Grant, 2002), além da inerente toxicidade sobre o sistema nervoso central e cardiovascular. Tonturas, confusão, diplopia, inquietação, convulsões e outros efeitos colaterais podem ser resultantes da utilização em altas doses ou da aplicação intravascular inadvertida (McLure & Rubin, 2005).

Novas formulações anestésicas a partir de moléculas conhecidas vêm sendo desenvolvidas utilizando sistemas de liberação modificados de fármacos, tais como lipossomos e ciclodextrinas, com o objetivo de prolongar o efeito dos anestésicos locais, melhorar a solubilidade e reduzir a sua toxicidade (Boogaerts *et al.*, 1994; Grant & Bansinath, 2001).

Os lipossomos são vesículas onde há um centro aquoso que é inteiramente envolvido por bicamadas de fosfolípidios. Devido à sua natureza anfífilica os anestésicos locais interagem com este sistema de membrana, se concentrando principalmente na região lipídica, mas mantendo uma fração das moléculas na fase aquosa (Boogaerts *et al.*, 1994; de Paula & Schreier, 1996). A literatura tem

reportado vantagens nesta associação, como uma baixa toxicidade sistêmica, melhor controle da biodistribuição e maior duração da anestesia (Grant *et al.*, 2004; de Araújo *et al.*, 2004; Cereda *et al.*, 2006). Anestésicos locais encapsulados em lipossomos tem sido testados em modelos animais e humanos. A lidocaína lipossomal foi utilizada para anestesia epidural (Mashimo *et al.*, 1992) ou aplicação tópica em humanos (Bucalo *et al.*, 1998), onde se verificou um aumento do efeito anestésico em todos estes estudos após administração das formulações lipossomais.

As ciclodextrinas correspondem a cadeias cíclicas contendo um número variado de unidades de glicoses ligadas. Estes veículos são muito úteis, pois aumentam a solubilidade, a estabilidade e biodisponibilidade de diversos fármacos (Dollo *et al.*, 2000; Loftsson & Duchêne, 2007). A ropivacaína associada à ciclodextrina mostrou aumento da duração e da intensidade do bloqueio sensorial em camundongos (de Araújo *et al.*, 2008).

Todavia, o desenvolvimento destas novas formulações, particularmente daquelas injetáveis cuja função seria promover anestesia prolongada, têm resultado em reação tecidual inflamatória. Em ratos tratados com ropivacaína lipossomal na concentração de 0,5% foram constatados a presença de células inflamatórias (de Araújo *et al.*, 2008). Uma reação inflamatória moderada também foi observada em ratos submetidos à injeção de bupivacaína lipossomal. Além disso, estes autores também relataram miotoxicidade (células C2C12) e neurotoxicidade (células PC12) *in vitro*, onde a toxicidade variou de acordo com a concentração e o tempo de exposição (Epstein-Barash *et al.*, 2009).

O desenvolvimento dos processos inflamatórios causados por formulações de anestésicos locais associados a carreadores pode estar relacionado a uma resposta imune envolvendo a ação de mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas. Entre as principais citocinas pró-inflamatórias destaca-se o TNF- α , que

está diretamente envolvido com a adesão e migração de leucócitos para o tecido (Frenette *et al.*, 1996). Além disso, juntamente com a IL-1, participa do aumento da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, proliferação de fibroblastos e indução de IL-8 e IL-6 (Oppenheim, 1991).

A IL-8 corresponde a um potente agente quimiotático para neutrófilos (Finn *et al.*, 1993), e a IL-6 é um dos principais mediadores da resposta inflamatória aguda, podendo prolongar a hiperalgesia e induzir a liberação de substâncias neuroativas (Watkins *et al.*, 1995). Este mediador também está envolvido na ativação de células T e B, produção de plaquetas, na diferenciação terminal das células B secretoras de imunoglobulinas (Sheeran & Hall, 1997).

A resposta inflamatória mediada por citocinas também pode estar relacionada a inibição de citocinas anti-inflamatórias. A citocina IL-10 corresponde a um mediador anti-inflamatório, pois inibe a atividade apresentadora de antígeno, secreção de citocinas pelas células e suprime a ativação de macrófagos. (Sheeran & Hall, 1997).

Todavia, a resposta inflamatória dos anestésicos locais pode estar relacionada a outras vias inflamatórias, podendo envolver mediadores como as prostaglandinas E₂ (PGE₂). Este mediador corresponde a um importante mediador pró-inflamatório que causa os sinais clássicos da inflamação como rubor, inchaço e dor, promovendo alodinia e hiperalgesia (Legler *et al.*, 2010).

Recentemente a segurança dos anestésicos locais tem sido questionada. Muitos estudos têm reportado efeitos citotóxicos de anestésicos locais sobre diferentes tipos celulares em cultura ou "in vivo" (Perez-Castro *et al.*, 2009; Grishko *et al.*, 2010). Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o efeito citotóxico dos anestésicos locais, tais como: induzir o colapso das membranas mitocondriais, bloqueio prolongado dos canais de potássio e alterações

na homeostase do cálcio (Xu *et al.*, 2000; Perez-Castro *et al.*, 2009; Grishko *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2011).

A indução da apoptose pelos anestésicos locais foi reportada como um dos principais efeitos citotóxicos promovidos por estes fármacos (Boselli *et al.*, 2003). Os anestésicos locais podem causar disfunções mitocondriais através do colapso do potencial da membrana mitocondrial, dissociação do consumo de oxigênio e interferência na fosforilação da adenosina difosfato. Esses efeitos levam a liberação do citocromo C que, no citosol, se liga a protease do fator de ativação de apoptose-1, induzindo a cascata de caspases, as quais culminam com a morte celular por apoptose (Friederich *et al.*, 2002; Kamyra *et al.*, 2005; D'amelio *et al.*, 2010).

Com isso, o presente estudo avaliou como as diferentes formulações de anestésicos associadas ou não a carreadores influenciam na modulação da liberação de mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10 e PGE₂ sobre queratinócitos e fibroblastos gengivais humanos. Também comparou os efeitos das diferentes formulações sobre viabilidade celular e indução da apoptose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos de ação dos anestésicos locais

Os anestésicos locais correspondem a um grande número de moléculas de diferentes estruturas químicas como amino-ésteres, amino-amidas, amino-cetonas, amidas, álcoois, tio-ésteres, tio-amidas e outros (Fraceto *et al.*, 2008). São fármacos que impedem a condução dos impulsos elétricos nociceptivos reversivelmente, gerando uma perda da sensibilidade à dor, sendo empregados em vários tipos de procedimentos, apresentando ampla utilização na clínica odontológica (Sambrook & Goss, 2011).

Os anestésicos locais diferem em relação potência, latência, duração do bloqueio sensorial e toxicidade. O perfil farmacológico de cada molécula anestésica é determinado pelas propriedades físico-químicas, tais como lipossolubilidade, pKa e grau de ligação as proteínas. (de Paula & Schreier, 1995; Nau & Wang, 2004).

A família dos anestésicos locais do grupo amino-amidas tem sido preferencialmente utilizado na prática clínica, uma vez que estes fármacos exibem propriedades alérgicas menores que outras famílias de anestésicos locais, como os aminoésteres (Yagiela *et al.*, 1998).

A literatura tem como consenso que o efeito clínico dos anestésicos locais é devido a interação com locais específicos nos canais de sódio voltagem dependentes. No entanto, os anestésicos locais também se ligam a outras proteínas transmembrana e intracelular, como os canais de potássio, canais receptores de nicotina e acetilcolina e proteína G (de Paula & Schreier, 1995; Nau & Wang, 2004).

Os canais de Na⁺ voltagem dependentes são glicoproteínas de membranas, que se encontram principalmente em axônios e músculos, sendo ativados pela despolarização da membrana, abrindo seu poro central e permitindo a entrada de

sódio que leva a propagação do estímulo nervoso (Fraceto *et al.*, 2008). As moléculas dos anestésicos locais em seu estado não ionizado entram por difusão no citoplasma da célula nervosa, e após serem ionizadas obtém acesso ao sítio de ligação no interior do canal de Na⁺ quando este está aberto, onde após a despolarização vão estabilizar o canal de Na⁺ no estado inativo (Strichartz & Ritchie, 1987; Courtney & Strichartz, 1987; Butterworth & Strichartz, 1990). Além disso, na porção S6 de domínio IV da subunidade α do canal de sódio voltage dependente, apresenta um proçãõ hidrofóbica que permite a ligação da forma neutral do anestésico local (Fraceto *et al.*, 2008).

Aparentemente os mecanismos pelos quais essas moléculas exercem efeitos citotóxicos não estão relacionados com o seu papel no bloqueio dos canais de sódio voltage dependentes (Kamya *et al.*, 2005; Grishko *et al.*, 2010). As moléculas dos anestésicos locais interagem com os fosfolipídios das membranas celulares resultando em uma desregulação da atividade de enzimas como a proteína kinase C, fosfolipase A₂ e com o metabolismo energético da mitocôndria, além de interferir em outras vias de comunicação celular (Szewczyk & Wojtczak, 2002).

2.2 Modulação do processo inflamatório pelos anestésicos locais

O processo inflamatório se caracteriza pelo recrutamento de leucócitos para os tecidos lesionados, além da ativação das células imune e inflamatórias. O processo de lesão tecidual é complexo e exige comunicação intracelular entre os leucócitos infiltrados, endotélio, epitélio residente, macrófagos e musculatura lisa. A ativação do processo inflamatório pode ser iniciada por lesões físicas, infecções ou por uma resposta imune local, requerendo uma cascata de sinalização completamente orquestrada (Herlaar & Brown, 1999).

As citocinas são importantes mediadores das respostas inflamatórias, estando envolvidas em virtualmente todos os aspectos da imunidade e inflamação (Licinio, 1997). A ligação dessas proteínas a receptores transmembrana resulta em alterações na expressão do RNA e síntese proteica (Kraychete *et al.*, 2006), afetando a dinâmica da matriz extracelular, aumentando a expressão de fibronectina e a permeabilidade do endotélio a infiltração e aderência de neutrófilos, leucócitos e macrófagos, resultando na inflamação do tecido (Choudhary *et al.*, 2008). A citocina produzida em resposta a um estímulo determina inicialmente o desenvolvimento da resposta imune e subsequentemente a natureza da resposta: citotóxica, humoral, mediada por células ou alérgica (Borish & Steinke, 2003).

Entre as principais citocinas envolvidas na infiltração celular e nos danos ao tecido característicos da inflamação, podemos destacar TNF, IL-1, IL-6 e IL-8. O TNF- α é um importante mediador que induz imunidade antitumoral através de efeitos citotóxicos diretos em células cancerígenas, além de estimular a resposta imune antitumoral. Esta citocina interage com células endoteliais induzindo a produção de moléculas de adesão como ICAM, V-CAM e E selectinas, permitindo a penetração de granulócitos no local da inflamação. Também é um potente ativador de neutrófilos, mediando aderência, quimiotaxia, degranulação e estresse oxidativo (Beutler & Cerami, 1989).

A IL-1 compartilha diversas atividades biológicas com o TNF- α , entre elas, o estímulo sobre células endoteliais para produção de moléculas de adesão (ICAM, V-CAM e E selectinas) para aderência de leucócitos. Esta citocina também estimula a liberação de IL-2 levando a uma maior ativação de linfócitos de IL-2, além de aumentar a proliferação de células B e aumentar a síntese de imunoglobulinas (Borish & Steinke, 2003).

A IL-8, também conhecido como CXCL-8, corresponde a uma quimiocina, sendo um potente quimioatraente para neutrófilos (Luther & Cyster, 2001). Já a IL-6 corresponde a uma importante citocina na resposta inflamatória aguda, atuando principalmente sobre a ativação e diferenciação de células T (Borish & Steinke, 2003).

Anestésicos locais têm sido reportados como atenuadores da resposta inflamatória (Peck *et al.*, 2004). Os mecanismos pelos quais os anestésicos locais exercem efeitos sobre a resposta inflamatória continuam pouco elucidados. Efeitos simultâneos inibitórios da lidocaína sobre várias citocinas e quimiocinas sugerem um efeito sobre uma via celular central comum (Henkel *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1995).

Uma das principais vias de transdução de sinais é através do fator nuclear- κ B (NF κ B), este corresponde a um fator de transcrição ubíquo que através de genes alvo induz a produção de proteínas que respondem ao estresse, danos ao DNA, crescimento e tumorigênese (Srivastava *et al.*, 2009) . Desta forma, o NF κ B regula processos chave na inflamação, apoptose, resposta ao stress, cicatrização de ferida e angiogense. Entre as proteínas relacionadas ao NF κ B, o p65 é o membro mais comumente estudado, pois interage com a proteína inibidora de NF κ B (I κ B) no citoplasma das células. Sobre diferentes tipos de estímulos fisiológicos ou patológicos, o I κ B é fosforilado e degradado. A p65 é então translocada para o núcleo da célula, regulando a transcrição dos genes alvo do NF κ B (Lan *et al.*, 2012).

Feng *et al.* (2008) verificaram *in vivo* a redução de lesões pulmonares induzidas por LPS pela lidocaína através da inibição da ativação do NF κ B. A ativação do NF κ B é necessária para a expressão de IL-2, INF- γ e TNF- α e outros mediadores inflamatórios (Arends & Wyllie, 1991). A lidocaína também pode reduzir a liberação de citocinas em parte pela inibição da expressão de RNAm,

através da inibição da fosforilação do I κ B, uma atividade que resulta na redução da degradação do I κ B e interferindo na sua translocação nuclear e ligação com NF κ B (Lang *et al.*, 2010).

A literatura tem reportado efeito dos anestésicos locais sobre a modulação de PGE₂. Prostaglandinas são potentes lipídios bioativos de vida curta pertencente a família dos eicosanoides (Funk, 2001). As PGE₂ são produzidas por todos os tipos celulares como epitélio, fibroblastos e células inflamatórias. O processo de síntese das PGE₂ envolve a família das fosfolipase A₂ que mobilizam o ácido araquidônico (AA) das membranas celulares, onde a ciclooxigenases então convertem o AA em PGH₂ e sobre ação da PGE₂ sintetase é gerado o mediador PGE₂ (Park *et al.*, 2006). Nas condições fisiológicas a taxa de síntese de PGE₂ é controlada pela expressão local e atividade da COX-2 (Kalinski *et al.*, 2012).

O papel da PGE₂ no sistema imune e na inflamação é diversificado e complexo (Harris *et al.*, 2002), pois regulam múltiplos aspectos na inflamação e também apresentam múltiplas funções em diferentes tipos celulares (Yu & Chadee, 1998). Na inflamação, PGE₂ está envolvida em todos os processos que levam aos clássicos sinais de inflamação: vermelhidão, inchaço e dor (Funk, 2001; Harris *et al.*, 2002).

A literatura apresenta divergências quanto ao efeito dos anestésicos locais sobre PGE₂, sendo que a expressão dessa molécula pode variar de acordo com a espécie estudada, tipo de lesão, anestésico utilizado e o local de aplicação (Carvalho *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que a aplicação intratecal de lidocaína induz a um aumento transitório nos níveis PGE₂ no fluido cerebrospinal (CSF) resultando também em hiperalgesia mecânica (Umbrain *et al.*, 2008). Por sua vez, Huang *et al.* (2008) demonstraram *in vitro* os efeitos da bupivacaína na redução da

expressão de COX-2 e na produção de PGE₂ em macrófagos estimulados com endotoxina.

Tem sido demonstrado que a bupivacaína exerce efeitos inibitórios sobre os receptores de PGE₂ em cultura de células (Honemann *et al.*, 2001). Testes utilizando células em cultura também demonstraram um aumento transitório do cálcio intracelular, sendo mais acentuado após exposição a lidocaína em relação a outros anestésicos locais (Johnson *et al.*, 2002; Umbrain *et al.*, 2009).

O aumento do cálcio intracelular induzido pela lidocaína pode ativar várias enzimas intracelulares, incluindo a fosfolipase A₂ (PLA₂). A ativação do PLA₂ induz a um aumento do ácido araquidônico no citosol, o qual entra na cascata de cicloxigenases conduzindo a síntese de uma variedade de prostaglandinas que são liberadas no espaço extracelular. O aumento do cálcio intracelular também pode induzir a transcrição de RNAm de COX-2, conseqüentemente resultando em um aumento da liberação de PGE₂ (Umbrain *et al.*, 2008).

2.3 Indução da necrose celular pelos anestésicos locais

A lesão celular induzida por estímulos químicos ou estresse físicos é, até certo ponto, reversível, mas se o estímulo persistir ou for severo o suficiente desde o início, a célula atinge um "ponto em que não há retorno" e sofre lesão celular irreversível e finalmente, morte celular. A diferenciação entre necrose e apoptose celular é baseada em critérios morfológicos e bioquímicos. A necrose é caracterizada pelo rápido inchaço e lise celular, podendo apresentar degradação do DNA (Wyllie *et al.*, 1980). Quando o dano celular às membranas é severo, as enzimas lisossômicas entram no citoplasma e digerem a célula e os componentes celulares vazam, resultando em necrose (Kumar *et al.*, 2005).

A necrose induzida pelos anestésicos locais tem sido demonstrada *in vitro*, especialmente produzida pela bupivacaina (Dragoo *et al.*, 2008), e *in vivo* em condrócitos (Gomoll *et al.*, 2006). As células de linfoma histiocístico (U937) em cultura, tiveram sua viabilidade fortemente reduzida após o contato com lidocaína em concentrações acima de 15 mM. Não foi verificado aumento da fragmentação do DNA, porém ocorreu um rápido rompimento das membranas celulares, indicando que a lidocaína em altas concentrações exerce efeitos tóxicos diretos, induzindo a necrose nas células U937 (Kamiya *et al.*, 2005).

Além disso, Hansen *et al.* (2007) informaram sobre um grupo de pacientes que desenvolveram condrolise após o tratamento cirúrgico onde foi utilizada a bupivacaina para o controle da dor através de cateteres intra-articulares. Além disso, tem sido relatado a ocorrência clínica relevante de miopatia e mionecrose após bloqueios periféricos e infiltrações com bupivacaina (Zink & Graf, 2004).

2.4 Indução da apoptose pela ativação da cascata de caspases

Apoptose é um importante processo de morte programada das células, que está presente em uma grande variedade de células de diferentes sistemas biológicos, incluindo o sistema imune, o desenvolvimento embrionário e a renovação das células do organismo (Arends & Wyllie, 1991).

Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose ocorre em várias funções normais e não está necessariamente associada à lesão celular. A apoptose pode acontecer por estímulos nocivos (apoptose patológica) como na lesão do DNA pela radiação e drogas citotóxicas anticancerígenas, quando os mecanismos de reparo não puderem lidar com a lesão, a célula ativa a via da apoptose. Esses estímulos prejudiciais, assim como o calor e a hipóxia, podem

induzir a apoptose se a lesão for moderada, mas doses maiores dos mesmos estímulos resultam em necrose (Cohen, 1997).

Apoptose é caracterizada pela condensação e fragmentação da cromatina nuclear, compactação das organelas citoplasmáticas, dilatação do retículo endoplasmático, diminuição no volume da célula e alterações na membrana plasmática, resultando no reconhecimento e fagocitose das células apoptóticas (Arends & Wyllie, 1991; Cohen, 1997).

O processo de apoptose celular é amplamente controlado por uma família de proteases de aspartato-cisteína específicas, denominada de caspases. As caspases correspondem a uma classe de aproximadamente 12 proteases, que são sintetizadas como pro-enzimas inativas, sendo ativadas por clivagem em locais específicos, agindo como iniciadores e executores do processo apoptótico (Werdehausen *et al.*, 2007).

Até o momento, existem dois mecanismos bem caracterizados para ativação da cascata de caspases: a via extrínseca, a qual é iniciada pelo receptor de morte de superfície celular e a via intrínseca caracterizada por mudanças na integridade da mitocôndria (Budihardjo *et al.*, 1999).

Vários estudos conduzidos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a indução da apoptose pelos anestésicos locais sobre condrócitos, células neuronais humanas, células neuronais do gânglio da raiz dorsal de ratos e pré-adipócitos (Jacobs *et al.*, 2005; Perez-Castro *et al.*, 2009; Gold *et al.*, 1998; Keck *et al.*, 2010). A lidocaína em diferentes concentrações promoveu uma redução no crescimento de células de linfoma histiocístico além de reduzir a atividade celular *in vitro*. Concentrações próximas a 12 mM de lidocaína induziram a condensação da cromatina e a fragmentação internucleossomal do DNA, características típicas da apoptose, sendo que este efeito foi dose e tempo dependente (Kamiya *et al.*, 2005).

Werdehausen *et al.* (2007) demonstraram que a lidocaína induz a ativação da via intrínseca, pois o bloqueio da caspase-8 na via extrínseca não afetou a indução da apoptose nas células após a exposição a lidocaína. Já o bloqueio da ativação da caspase-9, assim como a utilização de células com super expressão de Bcl-2, reduziram as taxas de apoptose celular após o contato com a lidocaína.

Efeitos citotóxicos da lidocaína assim como outros anestésicos locais, responsáveis por induzir a apoptose em diversos tipos celulares podem estar relacionados a distúrbios mitocondriais. Os anestésicos locais são aminas ligeiramente ácidas em sua forma protonada, apresentando uma constante de dissociação ácida de aproximadamente 8, sugerindo a hipótese que os anestésicos locais agem como desacopladores mitocondriais, colapsando o gradiente de prótons (Sun & Garlid, 1992; Johson *et al.*, 2004). A bupivacaína e outros anestésicos locais podem inibir o complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria, desacoplar a fosforilação oxidativa, diminuir a produção de ATP, resultando em um colapso do potencial de membrana mitocondrial, levando a liberação do citocromo C e desencadeando o processo apoptótico, no qual a mitocôndria pode participar como iniciadora, efetora ou amplificadora de sinais (Arends *et al.*, 1991; Perez-Castro *et al.*, 2009; Tereda *et al.*, 1990; Friederich & Schmitz, 2002; Penninger & Kroemer, 2003).

Além disso, estudos com a bupivacaína e células de Schwann demonstraram que a indução da apoptose pode ocorrer através da geração de espécies reativas de oxigênio (Park *et al.*, 2004). Espécies reativas de oxigênio afetam a despolarização do potencial de membrana interna e contribuem para a abertura dos poros de transição permeáveis da mitocôndria (Zorov *et al.*, 2000).

2.5 Associação de anestésicos locais a carreadores

2.5.1 Anestésicos locais encapsulados em lipossomos

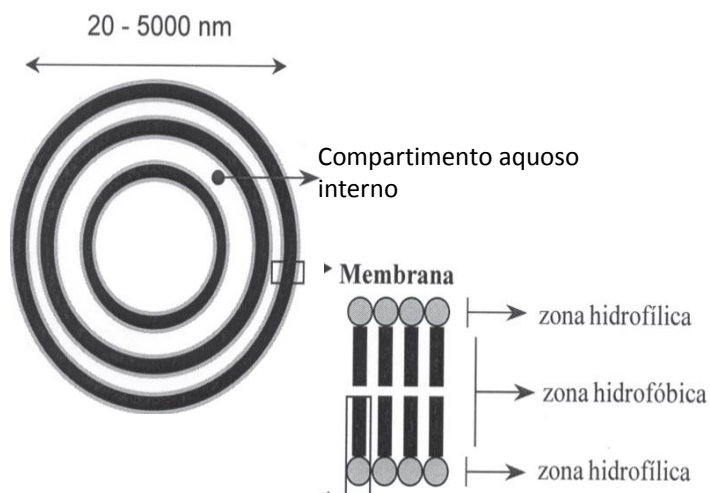
As principais propriedades desejadas para a molécula de anestésicos locais correspondem a um longo período de ação aliado a uma baixa toxicidade e com uma solubilidade adequada em água e lipídios (Kuzma *et al.*, 1997). A busca por essas moléculas ideais continuam, sendo a aplicação de sistemas de liberação controlado uma alternativa na tentativa de aprimorar as propriedades biofarmaceuticas e farmacológicas (Cereda *et al.*, 2006).

Novas formulações anestésicas vêm sendo desenvolvidas associando os anestésicos locais a carreadores tais como lipossomos, ciclodextrinas, nanopartículas e outros. Estes carreadores atuam como reservatórios no local de injeção, promovendo a lenta liberação do anestésico no tecido circundante. Pesquisas recentes têm demonstrados benefícios na utilização de sistemas de liberação controlado de drogas para aprimoramento de efeitos terapêuticos e farmacológicos dos anestésicos locais (Tófoli *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2008).

Lipossomos são vesículas compostas por uma ou mais membranas de bicamada fosfolipídica dispersa em ambiente aquoso, com diâmetro entre 20 nm a 5000 nm, que imitam membranas celulares (figura 1). A natureza das bicamadas lipídicas permitem a formação de um compartimento aquoso interno, tornando os lipossomos versáteis carreadores para um amplo espectro de drogas. Fármacos lipossolúveis podem ser transportados através da associação com a bicamada lipídica (Yamaguchi & Mizushima, 1994; Lian & Ho, 2001). Já moléculas hidrossolúveis se concentram no interior aquoso da molécula (Grant, 2002).

Lipossomos têm sido comumente testados como carreadores de fármacos oferecendo uma liberação controlada de agentes biologicamente ativos. Os compostos incorporados a lipossomos são protegidos da ação externa do meio,

particularmente enzimas e inibidores, além de conduzir a um aumento da potencia, biodisponibilidade dos fármacos no local de ação, aumentar o tempo de meia-vida *in vivo* e reduzir a toxicidade sistêmica (Ranade 1989; de Araújo *et al*, 2004; Grant *et al.*, 2004).



Demicheli *et. al.* (2005)

Figura 1- Características estruturais dos lipossomos.

Desde a década de 70 os lipossomos têm sido investigados como carreadores de fármacos visando melhorar a ação de agentes terapêuticos em locais específicos do corpo (Goyal *et al.*, 2005). Estes têm sido considerados mais adequados devido a sua capacidade de fácil modificação da superfície celular quando comparado com outros carreadores (Gislain *et al.*, 1983), além de permitirem a liberação de fármacos dentro das células pela fusão ou mecanismos de endocitose (Goyal *et al.*, 2005).

O uso de lipossomos associados a fármacos inclui antígenos, com ou sem imunomoduladores, na vacinação, quimioterápicos de baixo peso molecular, agentes terapêuticos para doenças infecciosas causadas por protozoários, fungos,

bactérias ou vírus, anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, terapias genicas e anestésicos locais (Grant, 2002).

Devido à natureza anfifílica dos anestésicos locais, estes interagem com o sistema de membranas dos lipossomos permanecendo principalmente na região da bicamada lipídica, mas mantendo uma fração da molécula na fase aquosa (de Paula & Schreier, 1995). Essa associação tem demonstrado efeitos benéficos como aumento da disponibilidade do composto, prolongamento da duração de anestesia e analgesia e redução da toxicidade para o sistema nervoso central e cardiovascular (Gesztos & Mezei, 1988; Boogaerts *et al.*, 1993; Bucalo *et al.*, 1998; de Araújo *et al.*, 2003).

Vários estudos têm demonstrado os benefícios da associação de anestésicos locais com os lipossomos. Tófoli *et al.* (2011), observaram maior duração da anestesia no canino superior, após técnica infiltrativa na maxila em humanos, utilizando mepivacaína 3% encapsulada em lipossomas unilamelares em relação à solução comercial de mepivacaína 3%. Nesse estudo foi demonstrado ainda que, mesmo na concentração de 2% a mepivacaína lipossomal apresentou duração de ação semelhante à da solução comercial na concentração de 3%.

Articaína associada a lipossomas produziu uma maior duração anestésica que a droga livre sem epinefrina na mesma concentração, tanto em tecido mole quanto em pulpar de ratos (Berto *et al.*, 2010). Nesse mesmo estudo também foi observado que a suspensão anestésica lipossomal de articaína a 3% não apresentou diferença significativa de duração anestésica do tecido mole, em ratos, se comparada com a solução comercial de articaína 4% com epinefrina 1:100.000.

A bupivacaína associada a lipossomas causou uma menor toxicidade quando comparada com a forma livre na mesma concentração em cultura de miócitos (Epstein-Barash *et al.*, 2009). A Bupivacaína encapsulada em lipossomos multilamelares induziu uma importante redução da toxicidade cardiovascular e

sobre o sistema nervoso central em experimentos *in vivo* com ratos, onde o anestésico associado ao carreador se acumulou principalmente no baço e fígado, exibindo um reduzido acúmulo no coração e SNC (Tökés *et al.*, 1980).

Boogaerts *et al.* (1993) verificaram os efeitos da injeção intravascular de bupivacaína livre ou associada a epinefrina, em comparação com formulações lipossomais, em coelhos. O limiar para o aparecimento dos sinais de toxicidade foi significativamente mais elevado no grupo do anestésico associado ao lipossoma.

Araújo *et al.* (2008) verificaram que a encapsulação da ropivacaína em lipossomos promoveu um aumento do efeito analgésico em camundongos no bloqueio do ciático e infraorbital em ratos, além de uma diminuição da citotoxicidade, quando comparado com a forma livre.

A ropivacaína a 1% encapsulada em lipossomas apresentou eficácia semelhante ao EMLA[®] (controle positivo) em promover anestesia tópica em mucosa vestibular após 2 minutos de aplicação em voluntários sádios (Franz-Montan *et al.*, 2007). Em um estudo posterior, a ropivacaína a 2% encapsulada em lipossomas aplicado na mesma região, por 30 minutos foi semelhante à benzocaína a 20% (Benzotop[®] - formulação comercial mais utilizada em Odontologia) em reduzir dor à punção, mas não foi capaz de induzir anestesia pulpar (Franz-Montan *et al.*, 2010).

2.5.2 Complexação dos anestésicos locais com ciclodextrinas

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos produzidos pela hidrólise enzimática de amido, formando complexos ligados a seis (α -CD), sete (β -CD) ou oito (γ -CD) unidades de α -1,4 D-glicose. (Duchêne & Wouessisjewe, 1990). As ciclodextrinas formam espacialmente um composto cônico com um grupo hidroxil hidrofílico na superfície externa e uma cavidade central relativamente hidrofóbica

(figura 2). As CD são capazes de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas, cujo objetivo é melhorar a hidrosolubilidade dos compostos mais hidrofóbicos (Venturini *et. al.* 2008; Loftson & Duchene, 2007; de Paula *et. al.*, 2010).

Benefícios terapêuticos de drogas tradicionalmente administradas são frequentemente limitadas pelas propriedades físico-químicas, toxicológicas ou pelas barreiras fisiológicas. O desenvolvimento de complexos de inclusão em ciclodextrinas tornou possível manipular algumas dessas propriedades (Loftson & Duchene, 2007). Apesar da existência das ciclodextrinas e suas aplicações na indústria farmacêutica já estarem bem documentadas a décadas, só recentemente passou-se a explorar suas propriedades na liberação controlada de fármacos. Atualmente muitos fármacos associados a ciclodextrinas já foram aprovados e estão disponíveis no mercado (Davis & Brewster, 2004), como por exemplo: dexametsona (Glymesason, Japão), nimesulida (Nimedex, Europa) e piroxicam (Flogene, Brasil).

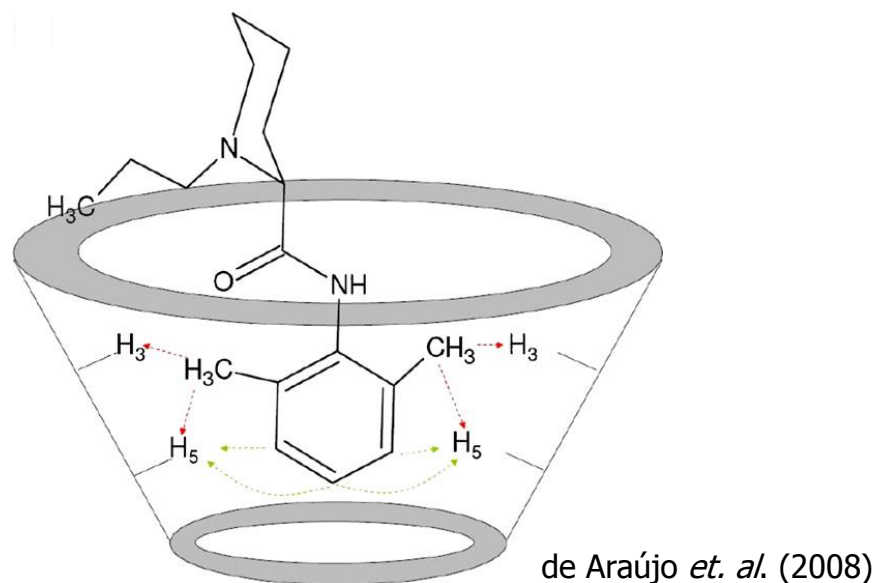


Figura 2- Ropivacaína complexada em hidroxipropil-β-ciclodextrina.

A complexação de anestésicos locais em ciclodextrinas tem promovido mudanças na solubilidade aquosa, estabilização físico-química e melhoramento das propriedades farmacodinâmicas (Dollo *et al.*, 1996). Associação de etidocaína, lidocaína, prilocaína, mepivacaína e bupivacaína com a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) tem demonstrado melhoras no índice terapêutico e eficácia farmacológica (Dollo *et al.*, 1996; 1998, 2000; Freveville *et al.*, 1996; Estebe *et al.*, 2002; de Araújo *et al.*, 2005, 2006). A bupivacaína em ciclodextrina promoveu um aumento da duração da anestesia em modelos animais de bloqueio epidural, espinhal e do nervo ciático (Freveville *et al.*, 1996; Dollo *et al.*, 2000; Estebe *et al.*, 2002).

A ropivacaína complexada a ciclodextrinas levou a um aumento do bloqueio motor do nervo ciático em ratos, onde a complexação da ropivacaína em HP- β -CD promoveu um aumento da eficiência farmacológica do anestésico local, permitindo um aumento da disponibilidade de ropivacaína no local de ação e uma anestesia de longa duração com menores efeitos tóxicos. A Prilocaína associada a ciclodextrinas conduziu a um aumento da duração do bloqueio do nervo infra-orbital em animais (Cereda *et al.*, 2004).

Apesar da literatura apresentar uma gama de estudos envolvendo a complexação de anestésicos locais em sistemas de liberação controlado, os efeitos destas novas formulações sobre as diferentes vias de sinalização celular ainda permanecem um campo a ser explorado.

3. PROPOSIÇÃO

O principal objetivo foi verificar o potencial inflamatório, a citotoxicidade e indução da apoptose por formulações de lidocaína, ropivacaína e bupivacaína associados a lipossomos e hidroxipropil- β -ciclodextrina.

Objetivos específicos:

- 1) Preparar as formulações dos anestésicos locais lidocaína, ropivacaína e bupivacaína associados a carreadores lipossomais ou hidroxipropil- β -ciclodextrina.
- 2) Quantificar a liberação de mediadores inflamatórios IL-6, IL-1 α , IL-8, TNF- α , IL-10 e PGE₂ pelos queratinócitos humanos (HaCaT) e fibroblastos gengivais humanos (FGH) quando expostas as formulações livres ou associadas a carreadores.
- 3) Comparar a interferência das diferentes formulações e concentrações anestésicas sobre a viabilidade celular nas células HaCaT e FGH.
- 4) Avaliar a apoptose induzida pelas formulações de ropivacaína e bupivacaína nas células HaCaT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Foram utilizados os seguintes sais anestésicos (cloridratos): lidocaína (Sigma Chem. Co.), bupivacaína e ropivacaína (Cristália Ind. Quím. Farm. Ltda). Além dos sais anestésicos, para a preparação das formulações lipossomais foram utilizados: acetato de α -tocoferol, fosfatidilcolina de ovo e colesterol (Sigma Chem. Co.) e tampão HEPES 20mM com NaCl 150 mM. Para a preparação da formulação de hidroxipropil- β -ciclodextrina foram utilizados: sais de anestésicos, hidroxipropil- β -ciclodextrina (Roquette Serv. Tech. Lab., França), tampão HEPES 20mM com NaCl 0,9% (GIBCO).

4.2 Preparações das suspensões

As suspensões lipossomais e de hidroxipropil- β -ciclodextrina foram preparadas no laboratório de Biomembranas do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob orientação da Profa. Dra. Eneida de Paula.

4.2.1 Preparação das suspensões anestésicas em lipossomos multilamelar.

Vesículas multilamelares foram preparadas pelo método de hidratação de filme seco retirando-se alíquotas de fosfatidilcolina de ovo, colesterol e α -tocoferol (na proporção molar de 4:3:0,07) de uma solução estoque em clorofórmio e evaporando-se sob fluxo de N₂ seguido de vácuo por 2h, à temperatura ambiente (Boogaerts *et al.*, 1993, 1994). Após a secagem foi adicionado o tampão HEPES 20mM, pH 7,4 com NaCl 150 mM, e a dispersão foi agitada por 5 minutos em vórtex, passando a apresentar vesículas multilamelares concêntricas, separadas

por cavidades aquosas com concentração lipídica de 15 mM. Em seguida as formulações lipossomais 1 mM foram diluídas em PBS, autoclavadas e armazenadas em 4 °C protegidas da luz.

4.2.2 Preparações das suspensões anestésicas em hidroxipropil ciclodextrina.

O complexo de inclusão sólido foi obtido misturando-se quantidades apropriadas de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e o sal anestésico em água, para obtenção de razão molar de 1:1. A amostra foi deixada sob agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, a solução foi liofilizada e guardada a -20° C para posterior uso (Dollo *et al.*, 1998; Loftsson & Masson, 2001).

O complexo foi preparado em quantidade suficiente para obter a concentração adequada de cada anestésico e, posteriormente, foi dissolvido em tampão (HEPES 20mM pH 7,4 com NaCl 150 mM). Após a ressuspensão do liofilizado a preparação diluída na concentrações desejadas foi esterilizada em autoclave e armazenadas em 4 °C protegidas da luz.

4.3 Cultura Celular

Foram utilizados queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente da linhagem HaCaT, essas células correspondem ao tipo celular predominante nos tecidos de revestimento. Também foram utilizados fibroblastos gengivais humanos (BCRJ 0089) imortalizados que compõem o tecido conjuntivo da mucosa oral. Essas células foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, Associação Técnico Científica Paulo Ehrlich.

HaCaT e FGH foram mantidas em Meio Eagle de Dulbecco modificado - DMEM (GIBCO[®], United Kingdom) acrescido de 10% de soro fetal bovino (GIBCO[®]) e penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram cultivadas em placas de petri para cultura de tecido de 61 cm² (TPP[®]) em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. A cultura foi duplicada duas vezes por semana por tratamento com 0,5 mM EDTA (GIBCO[®]) seguido de tripsina (GIBCO[®]) para a liberação das células. Aproximadamente 4 x 10⁴/mL HaCaT e FGH foram adicionadas a placas de cultura de tecidos com 24 e 96 poços, onde eram mantidas até atingirem a semi-confluência para a utilização nos experimentos.

4.4 Condições Experimentais

HaCaT e FGH crescidos foram expostos aos anestésicos locais livres e associados a lipossomos e HP-β-CD nas concentrações de 1 µM, 10 µM e 100 µM (HUANG *et al.*, 2008). Grupo controle foi formado por células tratadas com PBS, para determinar os níveis basais de expressão das citocinas. As células foram incubadas a 37°C por 6h e 24h. Terminado os períodos de incubação foram testados os efeitos dos anestésicos locais livres ou associados a carreadores sobre a viabilidade celular, liberação citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL1-α, IL-6 e TNF-α), IL-10, PGE₂ e apoptose.

4.5 Imunoensaio

Para a quantificação da liberação das citocinas IL-6, IL-8, IL-1α, TNF-α e IL-10 foram coletados os sobrenadantes da cultura celular após 6h e 24h exposição das células HaCaT e FGH as diferentes formulações de soluções anestésicas.

A liberação das citocinas foi quantificado pelo ensaio de imunoabsorbância ligado a enzima (ELISA). Placas de 96 poços foram cobertas com 100 µL/poço, com anticorpos de captura para cada citocina de acordo com as instruções do fabricante (Peprotech Inc.). As placas foram deixadas à temperatura ambiente, *overnight*. Depois foram lavadas com 0,05% Tween 20 em PBS três vezes, processo repetido antes de cada etapa. Foram adicionados 300 µL de tampão de bloqueio 1% BSA em PBS a cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora, e foram acrescentados 100 µL das amostras ou das soluções-padrão.

Após incubação à temperatura ambiente por 2 horas, 100 µL do anticorpo de detecção foram adicionados aos poços. Após nova incubação por 2h em temperatura ambiente, 100 µL de uma solução de conjugado de avidina foi adicionado em cada poço. Seguidos 20 min, 100 µL de solução para substrato (ABTS) foi adicionado e a reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm com correção de 650 nm.

As concentrações das citocinas IL-6, IL-1 α , TNF- α , IL-8 e IL-10 foram expressas em pg/mL, estabelecida através de uma correlação entre os dados das absorbâncias e a curva de calibração determinada pelo fabricante.

4.6 Quantificação de PGE₂

Os sobrenadantes das culturas de células foram colhidos e armazenados em freezer com temperatura - 20°C. A quantificação de PGE₂ foi realizada utilizando uma reação de imunoabsorbância ligado à enzima (R&D Systems). O teste seguiu o protocolo do fabricante. A quantificação da liberação PGE₂ foi feita em um leitor de microplaca com comprimento de onda de 450 nm com correção para 540 nm.

4.7 Viabilidade Celular

As células cultivadas foram submetidas a uma solução de tripsina e uma concentração de 7×10^4 /mL dos tipos celulares foram dispostos em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 18 horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente foram adicionados os anestésicos locais livres ou associados aos carreadores nas diferentes concentrações. Terminadas as incubações (6h e 24h), a viabilidade celular foi estimada utilizando o método da redução do XTT (TOX-2, Sigma).

O teste de viabilidade foi executado conforme as instruções do fabricante, onde 40 µL da solução estoque de XTT foi pipetado em cada poço da placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 4 horas, após esse período as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm com correção para 690 nm.

4.8 Análise da Citotoxicidade por Microscopia de Fluorescência

Os resultados do XTT foram confirmados por microscopia de fluorescência. As células HaCaT e FGH foram cultivadas como descritas anteriormente e transferidas para as placas de cultura de células de 24 poços. As placas foram incubadas por 24 horas e em seguida foram aplicados os tratamentos. Terminados os períodos de incubação a citotoxicidade dos anestésicos locais livre, e associados a lipossomos ou HP-β-CD foi verificada através da marcação pelos reagentes LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity for mammalian cells (Invitrogen Life Technologies).

Células vivas convertem a calceína permeável não fluorescente em calceína impermeável fluorescente verde, ao qual se distribui uniformemente pelo

citoplasma da célula, por meio da atividade de esterases. As células mortas ou com a membrana danificada são marcadas com ethidium homodimer-1 pela da ligação a ácidos nucléicos, emitindo uma fluorescência vermelha. Este marcador é excluído pelas membranas das células intactas.

Os reagentes EthD-1 e calceína-AM foram combinadas formando uma solução com concentração final de 2 μM de calceína-AM e 4 μM de EthD-1 (reagent LIVE/DEAD[®]). Aproximadamente 300 μL dessa solução foram adicionados às placas de cultura de células, cobrindo toda a extensão. As células foram incubadas por 30 a 45 minutos na temperatura ambiente.

As imagens foram feitas no microscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha). A calceína foi visualizada utilizando filtro na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617nm (Em).

4.9 Análise da Apoptose por Citômetro de Fluxo

Uma suspensão de 4×10^5 células HaCaT por foram plaqueadas nas placas de 6 poços e incubadas por 24 horas. A apoptose foi determinada pela marcação da membrana com Anexina V-FITC (BD Pharmingen[™]), responsável por identificar células nos estágios iniciais da apoptose. A dupla marcação com 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD) serve para marcar as células necróticas. Estas avaliações foram feitas por citometria de fluxo - BD FACSCalibur[™], no laboratório de cultura de células do departamento de patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Após os tratamentos, as células foram tripsinizadas, em seguida colocadas em tubos de 15 mL contendo 5 mL de DMEM com 10% de FBS. As células do

grupo controle foram divididas em dois tubos, um deles corresponde ao Back (não marcado) e o outro o Controle (marcado). Também foi realizado um controle positivo utilizando staurosporina.

As células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de ligação. Em seguida, 100 μ L da solução foi transferido para tubos eppendorf onde foram adicionados 5 μ L de Anexina V-FITC e 0,5 μ L de 7-AAD em cada amostra, com exceção do tubo Back (não marcado). Os tubos foram agitados em vórtex suavemente e incubados por 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Finalmente, foram adicionadas as amostras de 400 μ L de tampão de ligação contendo paraformaldeído 0,1% e analisados no citômetro de fluxo.

4.10 Análise Estatística

Para se testar a hipótese nula de que qualquer diferença encontrada nos tratamentos seria meramente ao acaso, esses dados foram testados quanto à sua normalidade de distribuição (teste de Shapiro-Wilks) e equivalência das variâncias (teste de Levene). Os dados de viabilidade celular apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias sendo aplicados ANOVA e Tukey como análise pos-hoc. Para análise estatística dos dados referentes a liberação de citocinas e PGE₂ foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Student Newman-Keuls). Para os dados de indução da apoptose foram utilizados o teste de qui-quadrado de aderência. Todas as análises foram realizadas pelo pacote estatístico Bioestat[®] 5.0 com nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

5.1 Lidocaína

5.1.1 Efeitos das formulações de lidocaína livre ou associadas a carreadores sobre a liberação de citocinas pelos FGH e HaCaT.

A Figura 3 demonstra os resultados da liberação de IL-1 α pelas células HaCaT e FGH após 6h e 24h de exposição as formulações de lidocaína em diferentes concentrações.

A lidocaína encapsulada a lipossomas reduziu significativamente a liberação de IL-1 α em relação ao controle e a formulação livre nas células HaCaT durante as primeiras 6h. Quando em HP- β -CD, a lidocaína nas concentrações 100 μ M e 1 μ M aumentaram a liberação de IL-1 α em relação ao controle. Após 24h tanto a lidocaína e a lidocaína lipossomal reduziram significativamente a liberação de IL-1 α em relação controle, já as formulações em HP- β -CD não diferiram significativamente em relação ao controle.

Nos FGH verificou-se pouca alteração na liberação de IL-1 α ao longo do tempo. Nas primeiras 6h apenas a lidocaína 1 μ M lipossomal e a 100 μ M em HP- β -CD aumentaram significativamente a liberação em relação ao controle e lidocaína livre nas mesmas concentrações. Após 24 h verificou-se um aumento tardio na liberação IL-1 α pela formulação 10 μ M HP- β -CD, que foi significativamente maior do que o controle, porém não houve diferenças entre a lidocaína e as formulações associadas a carreadores.

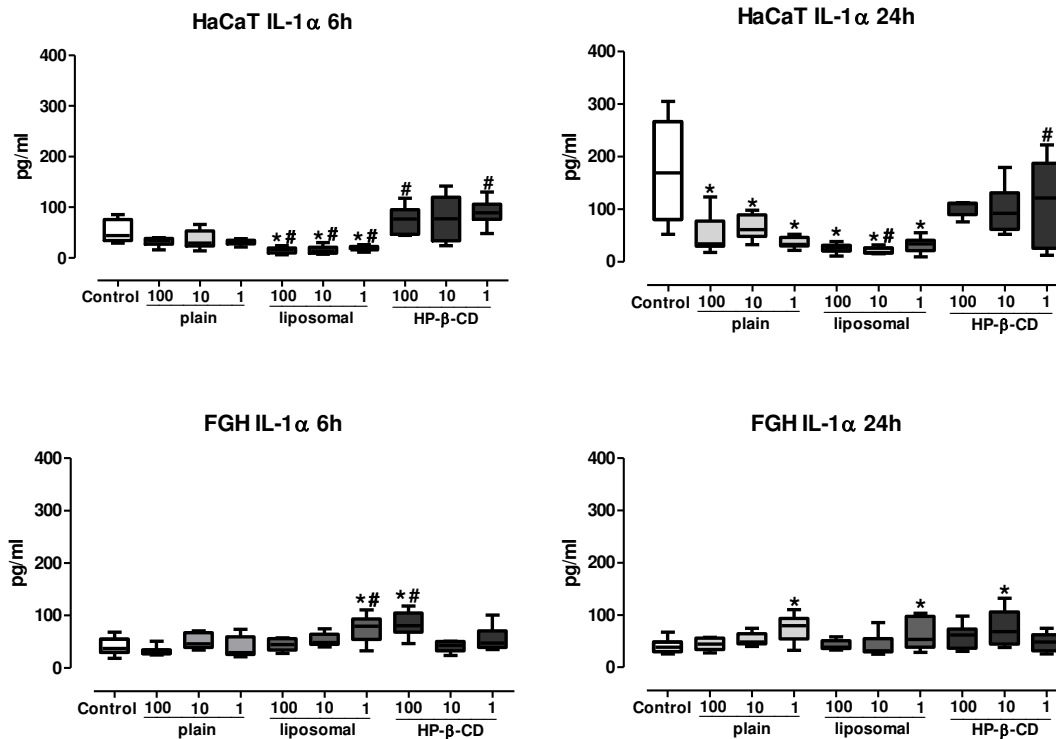


Figura 3 - Efeitos modulatórios da lidocaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-1 α pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados da secreção de IL-6 pelas células HaCaT e FGH ao longo do tempo estão apresentados na figura 4. A secreção de IL-6 variou de acordo com o tipo celular. Formulações lipossomais e em HP- β -CD reduziram significativamente a liberação IL-6 pelas células HaCaT nas primeiras 6h em relação ao controle e lidocaína nas mesmas concentrações. A lidocaína, em diferentes concentrações, não diferiu significativamente do controle ao longo do tempo e, após 24h, apenas

as formulações em lipossomas mantiveram uma redução significativa na liberação de IL-6. Lidocaína lipossomal 100 μ M aumentou significativamente a liberação IL-6 nos FGH ao longo do tempo em relação ao controle e lidocaína livre. Formulações 10 μ M e 1 μ M de lidocaína e lidocaína em HP- β -CD, aumentaram significativamente a liberação de IL-6 nos FGH após 24h de exposição em relação ao controle.

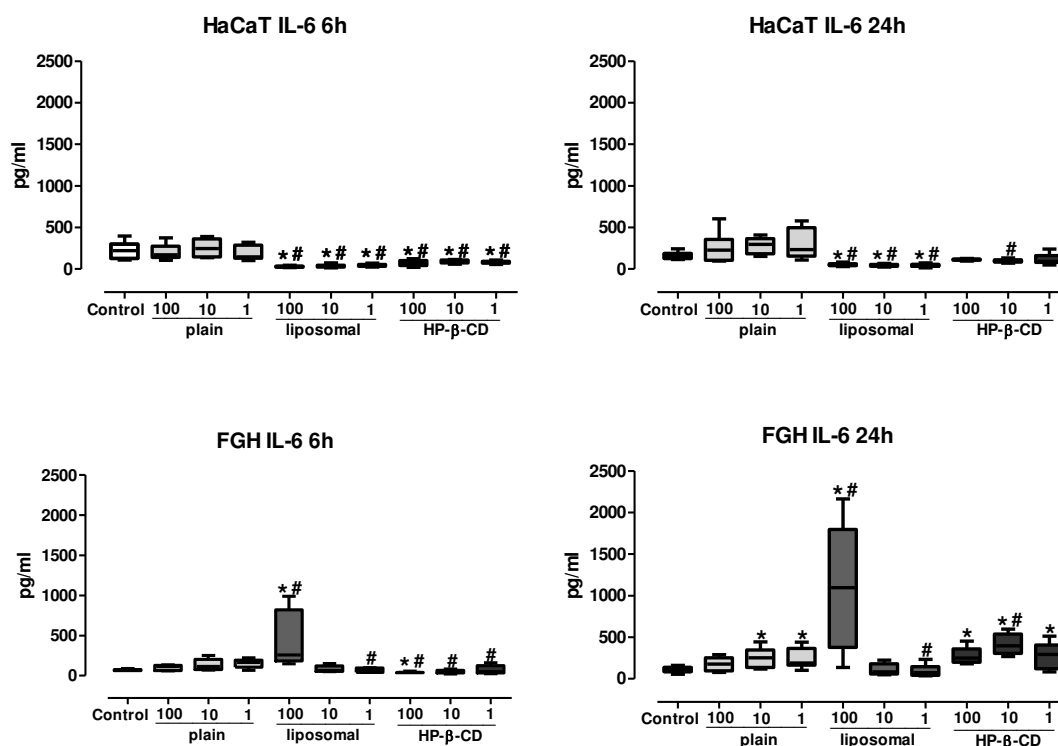


Figura 4 - Efeitos modulatórios da lidocaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-6 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

A liberação de IL-8 também apresentou padrões diferentes de acordo com o tipo celular envolvido (figura 5). A lidocaína lipossomal aumentou a secreção de IL-8 em relação ao controle e lidocaína nas células HaCaT após 6h. Formulações lipossomais mantiveram-se diferentes em relação as formulações de lidocaína após 24h, porém não diferiram do controle. Já as formulações lidocaína e HP- β -CD reduziram significativamente a liberação de IL-8. Nos FGH observou-se um aumento significativo na liberação de IL-8 pela lidocaína lipossomal 100 μ M ao longo do tempo. Após 24h, apenas lidocaína 1 μ M foi similar ao controle, os demais tratamentos aumentaram significativamente a liberação de IL-8 pelos FGH. Além disso, a complexação em lipossomos e HP- β -CD aumentaram a liberação de IL-8 em relação a lidocaína em todas concentrações testadas.

O efeito das formulações sobre a liberação de TNF- α apresentou variação entre as células, mas pouca variação ao longo do tempo (figura 6). A lidocaína lipossomal e em HP- β -CD significativamente reduziram a liberação de TNF- α nas células HaCaT em relação ao controle e lidocaína ao longo do tempo. Lidocaína não apresentou diferença em relação ao controle. Nos FGH, a formulação 100 μ M lipossomal aumentou significativamente a liberação de TNF- α ao longo do tempo em relação ao controle e lidocaína. A Lidocaína lipossomal nas concentrações 10 μ M and 1 μ M aumentaram a liberação de TNF- α em relação as formulações de lidocaína após 6h de exposição. Formulações em HP- β -CD não diferiram do controle e das formulações de lidocaína em 6h, porém aumentaram significativamente a liberação de TNF- α após 24h.

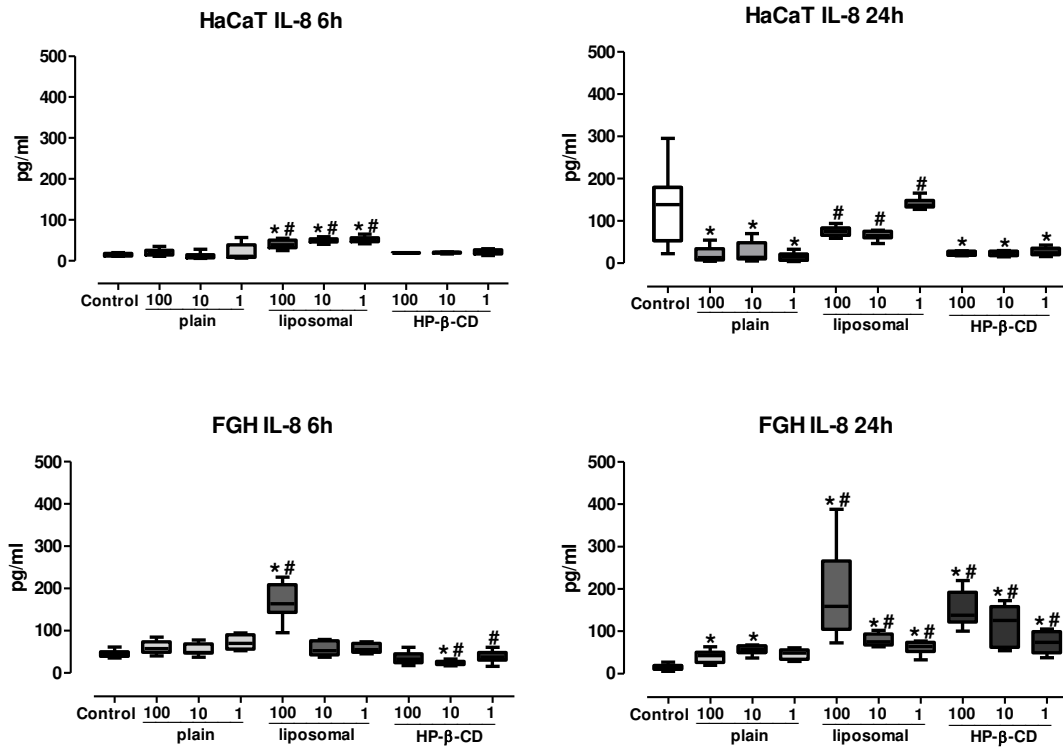


Figura 5 - Efeitos modulatórios da lidocaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-8 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

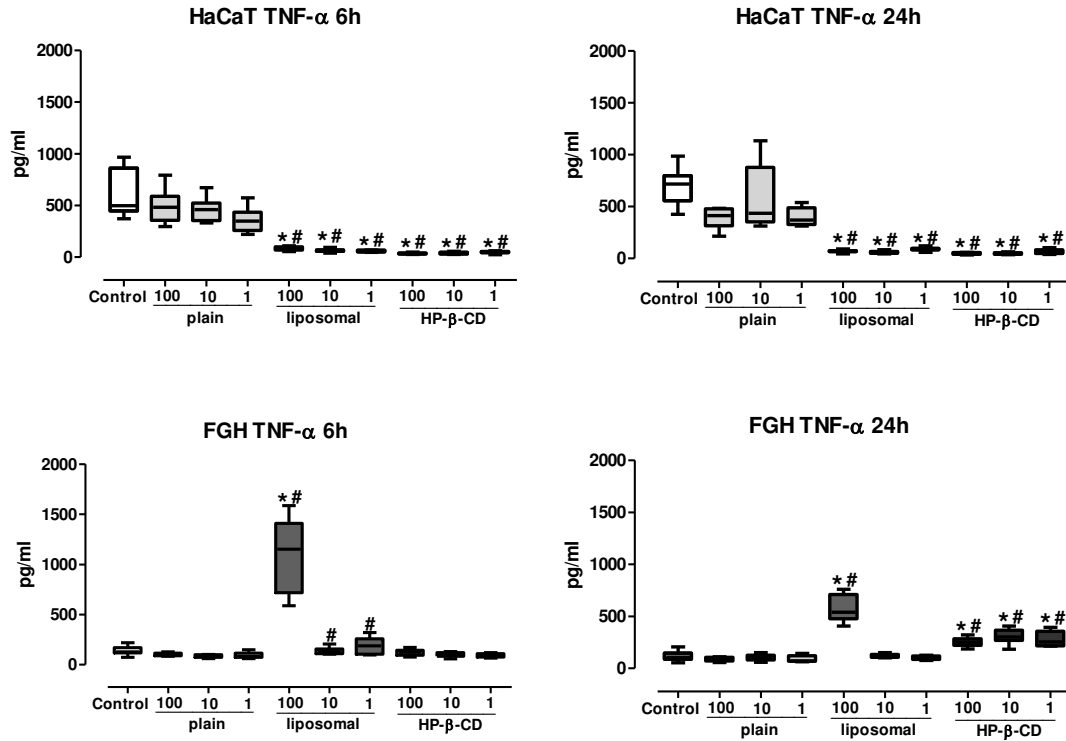


Figura 6 - Efeitos modulatórios da lidocaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de TNF- α pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração.

A liberação da citocina anti-inflamatória apresentou pouca variação ao longo do tempo, onde os FGH tiveram uma menor produção de IL-10 em relação HaCaT (figura 7). A HP- β -CD 100 μ M e 1 μ M apresentaram um aumento significativo na liberação de IL-10 em 6h nas HaCaT, após 24h nenhum tratamento registrou diferença em relação ao controle. Os resultados de FGH não mostraram diferenças

entre os tratamentos e o grupo controle em 6h. Formulações em HP- β -CD e 100 μ M lipossomal significativamente aumentaram a liberação de IL-10 após 24h.

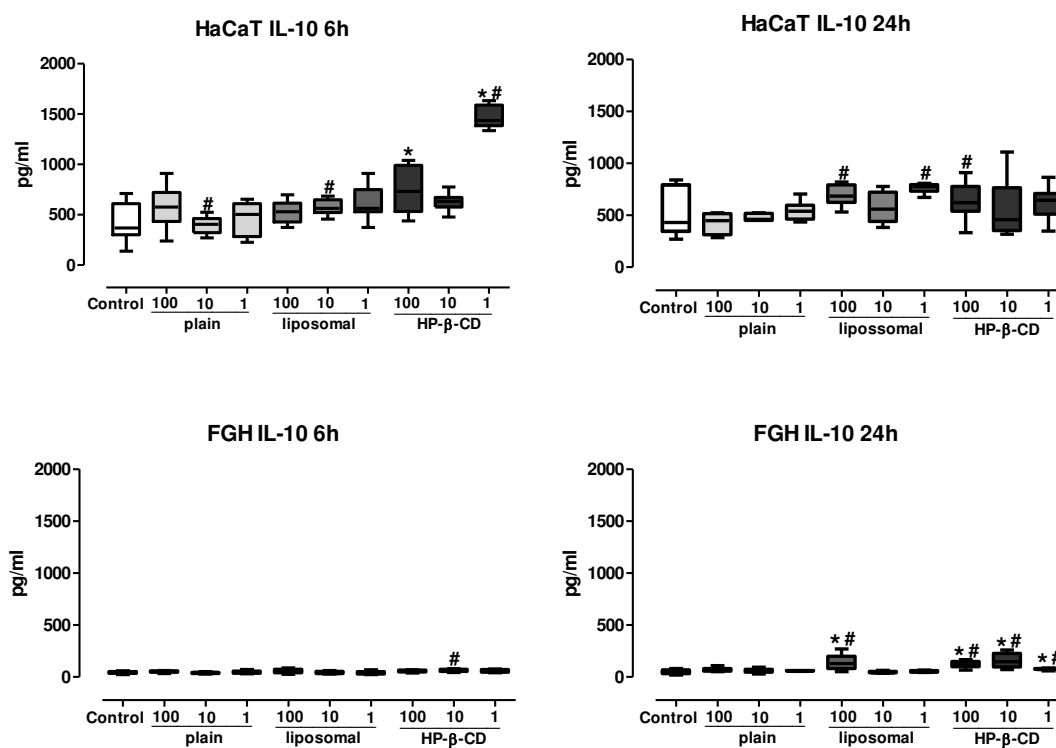


Figura 7 - Efeitos modulatórios da lidocaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-10 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

5.1.2 Efeitos das formulações de lidocaína livre ou associadas aos carreadores sobre a liberação de PGE₂ pelas células HaCaT e FGH.

Foi testado o sobrenadante coletado após 6h e 24h de exposição as diferentes formulações de lidocaína sobre HaCaT e FGH. Os dados da quantificação de PGE₂ estão demonstrados na figura 8. Nas células HaCaT verificou-se um aumento significativo na liberação de PGE₂ pelas formulações anestésicas após 6h. Formulações lipossomais 100 µM, 10 µM e em HP-β-CD foram significativamente maiores que a lidocaína em 6h. Após 24h houve um aumento significativo na liberação PGE₂ nas concentrações 100 µM e 10 µM da lidocaína. Todos os tratamentos foram significativamente diferentes do controle, porem HP-β-CD 100 µM reduziu significativamente a liberação de PGE₂ em relação a lidocaína.

Os efeitos das formulações de anestésicos locais sobre a liberação de PGE₂ pelos FGH apresentaram pouca variação ao longo do tempo. Nas primeiras 6h apenas HP-β-CD 10 µM e 1 µM não diferiram do controle. Porém após 24h de exposição, as formulações em HP-β-CD aumentaram significativamente a liberação de PGE₂ em relação ao controle. As formulações 1 µM de lidocaína livre, 10 µM e 1 µM lipossomal não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle (figura 6).

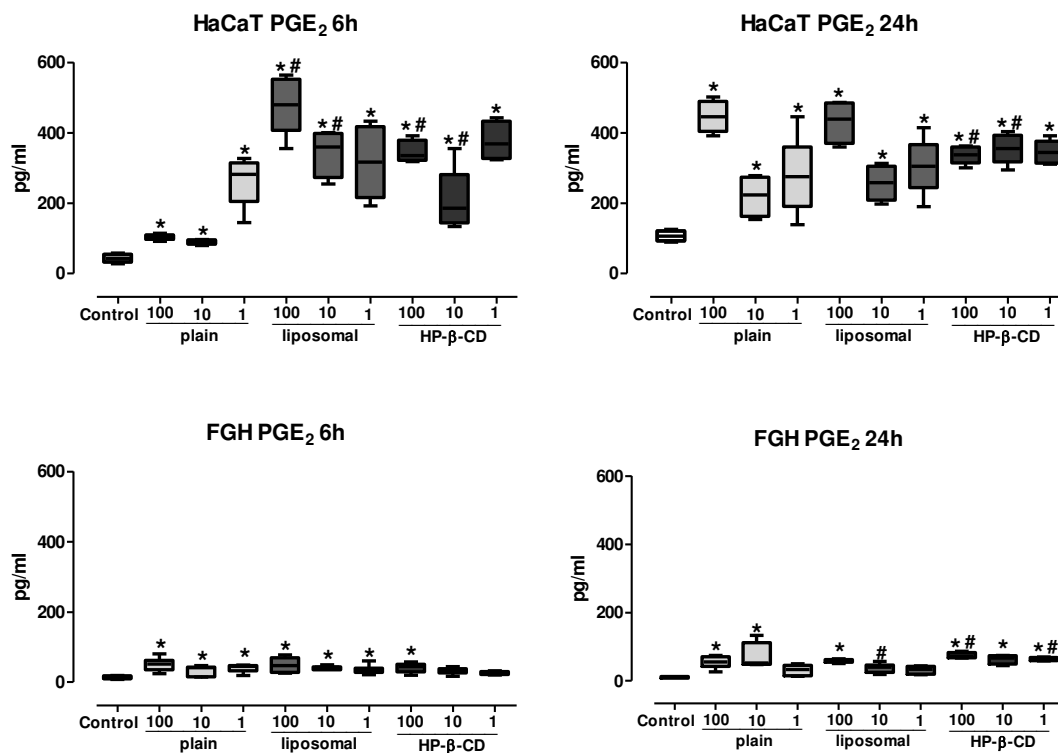


Figura 8 - Efeitos modulatórios da lidocaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de PGE₂ pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

5.1.3 Efeitos das formulações de lidocaína livre ou associadas a carreadores sobre viabilidade celular.

Figura 9 mostra o efeito das formulações de lidocaína em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular nas células HaCaT e FGH.

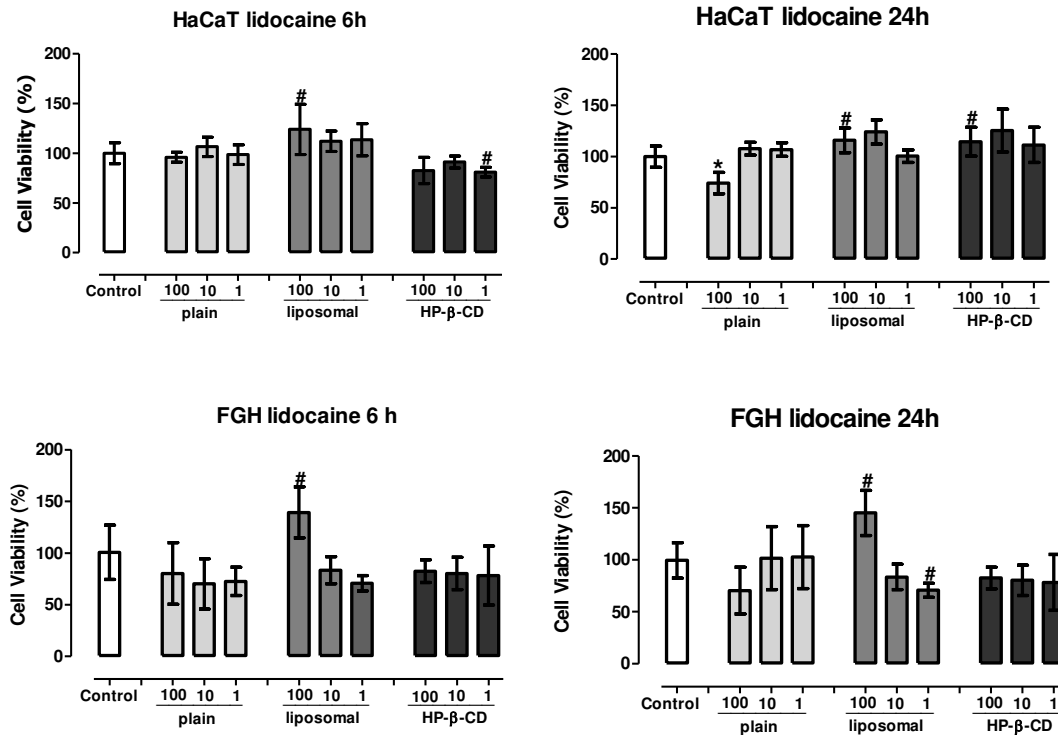


Figura 9 - Efeitos da lidocaína livre e associada a carreadores sobre as células HaCaT e FGH após 6h e 24h. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico do XTT. Os dados representam a média (\pm DP) e estão expressos como porcentagem em relação ao controle. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados com *. # representa diferença estatística entre lipossomal e HP- β -CD quando comparados a formulação livre entre as mesmas concentrações (ANOVA, Tukey).

Após 6h de exposição não houve redução significativa da viabilidade celular em relação ao controle pelas formulações de lidocaína nas células HaCaT e FGH. Lidocaina 100 μ M reduziu significativamente a viabilidade celular nas células HaCaT após 24h, porém a lidocaína 100 μ M complexada aos carreadores não apresentou redução da viabilidade ao longo do tempo. Não houve redução significativa de viabilidade pelos tratamentos após 24h de contato com FGH. Os resultados foram confirmados qualitativamente através da marcação de

fluorescência LIVE/DEAD, figuras 10 e 11. Verificou-se pouca presença de células mortas, marcadas em vermelho, porém os espaços vazios observados nas placas podem ser resultados de células mortas que soltaram da placa ou efeitos das formulações reduzindo a proliferação celular.

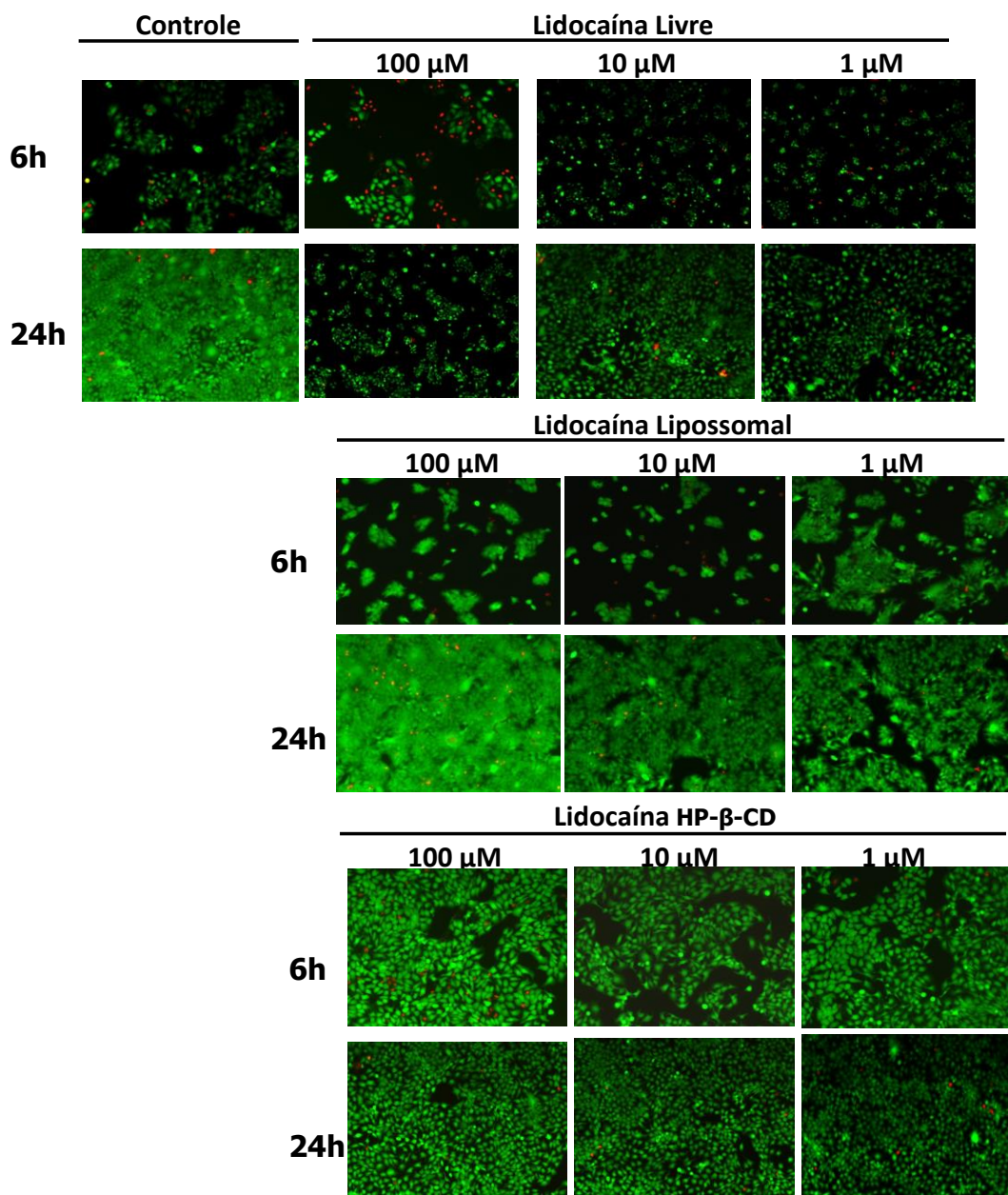


Figura 10 - Viabilidade celular das células HaCaT por microscopia de fluorescência (Live/Dead) após 6h e 24h de exposição a lidocaína livre e associada a carreadores.

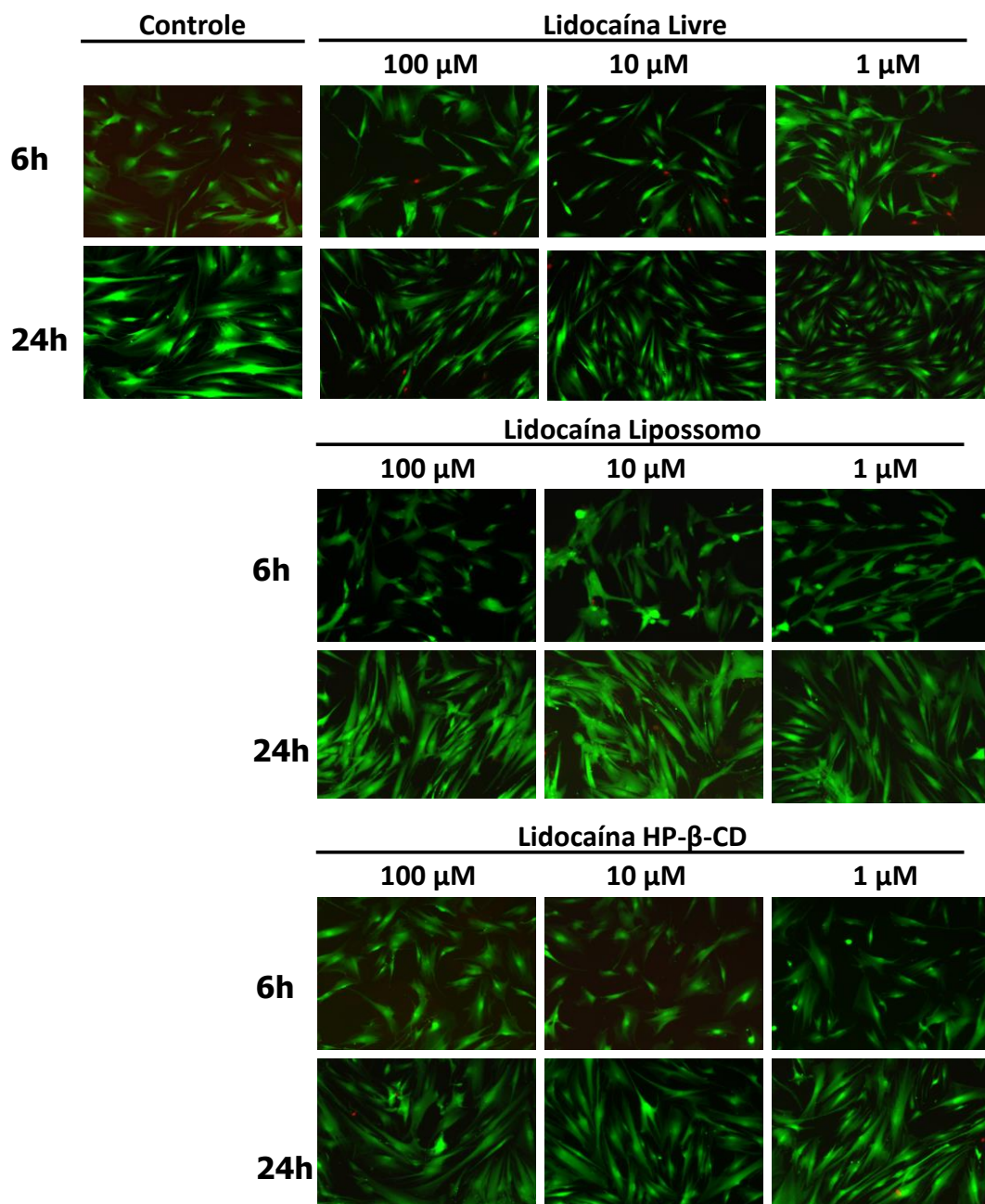


Figura 11 - Viabilidade celular das células FGH por microscopia de fluorescência (Live/Dead) após 6h e 24h de exposição a lidocaína livre e associada a carreadores.

5.2 Ropivacaína

5.2.1 Efeitos das formulações de ropivacaína livre ou associadas a carreadores sobre a liberação de citocinas pelos FGH e HaCaT.

A figura 12 demonstra o efeito da ropivacaína, ropivacaína lipossomal e em HP- β -CD sobre a liberação de IL-1 α nas células HaCaT e FGH após 6h e 24h de exposição. Observou-se um comportamento distinto entre os tipos celulares. Nas células HaCaT verificou-se uma redução significativa na liberação de IL-1 α pela ropivacaína 100 μ M em relação ao controle. Os demais tratamentos não diferiram do controle com exceção a formulação 1 μ M lipossomal nas primeiras 6h de tratamento. Após 24h verificou-se uma redução significativa pelas formulações de ropivacaína em relação ao controle. A associação a carreadores não modificou significativamente a liberação de IL-1 α em comparação com o grupo controle, porém todos tratamentos aumentaram a secreção de IL-1 α em relação as formulações de ropivacaína.

A secreção de IL-1 α nos FGH foi aumentada significativamente ($p < 0,05$) pelos tratamentos 100 μ M e 10 μ M lipossomal em 6h. Os demais tratamentos não diferiram do controle. Após 24h, apenas o tratamento 100 μ M lipossomal apresentou uma maior liberação de IL-1 α quando comparado controle, as outras concentrações lipossomais reduziram significativamente a liberação de IL-1 α quando comparados ao controle. Formulações em HP- β -CD não diferiram significativamente do controle (figura 12).

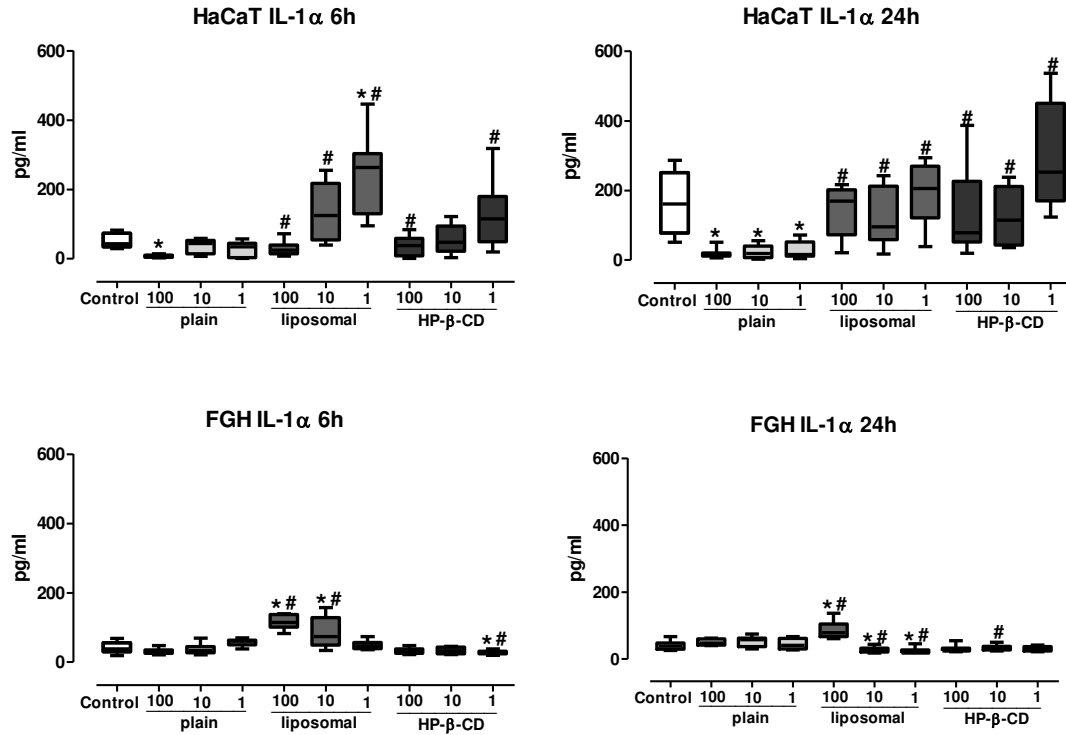


Figura 12 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-1α pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

A liberação de IL-6 pelas células HaCaT e FGH variou pouco ao longo do tempo após o contato com as formulações de ropivacaína livre e complexada aos carreadores. Sobre as células HaCaT houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de IL-6 induzido pelas formulações de ropivacaína em relação ao controle ao longo do tempo. Nos FGH, a formulação 100 μM lipossomal promoveu um aumento significativo na liberação de IL-6 em comparação ao controle ao longo do

tempo. Já as formulações em HP- β -CD conduziram a um aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de IL-6 em relação ao controle apenas após 24h de exposição (figura 13).

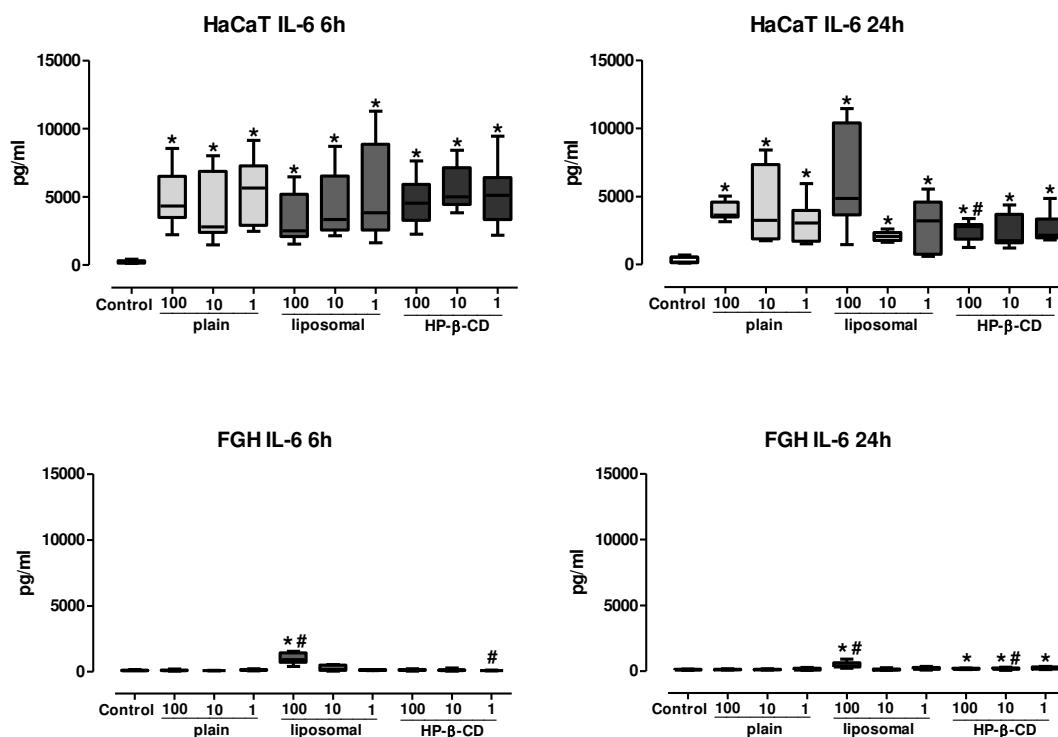


Figura 13 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada carreadores sobre a secreção de IL-6 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

A secreção de IL-8 foi modulada de maneira distinta pelas células HaCaT e FGH após exposição as formulações de ropivacaína (figura 14). Nas primeiras 6h verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na secreção de IL-8 pelas

formulações lipossomais em relação ao controle e a ropivacaína, nas células HaCaT. Após 24h, as formulações associadas em carreadores não apresentaram diferenças na secreção de IL-8 quando comparados ao grupo controle, porém aumentaram significativamente a liberação desta citocina em relação as formulações de ropivacaína, que por sua vez reduziram significativamente ($p < 0,05$) a liberação de IL-8 quando comparados ao grupo controle.

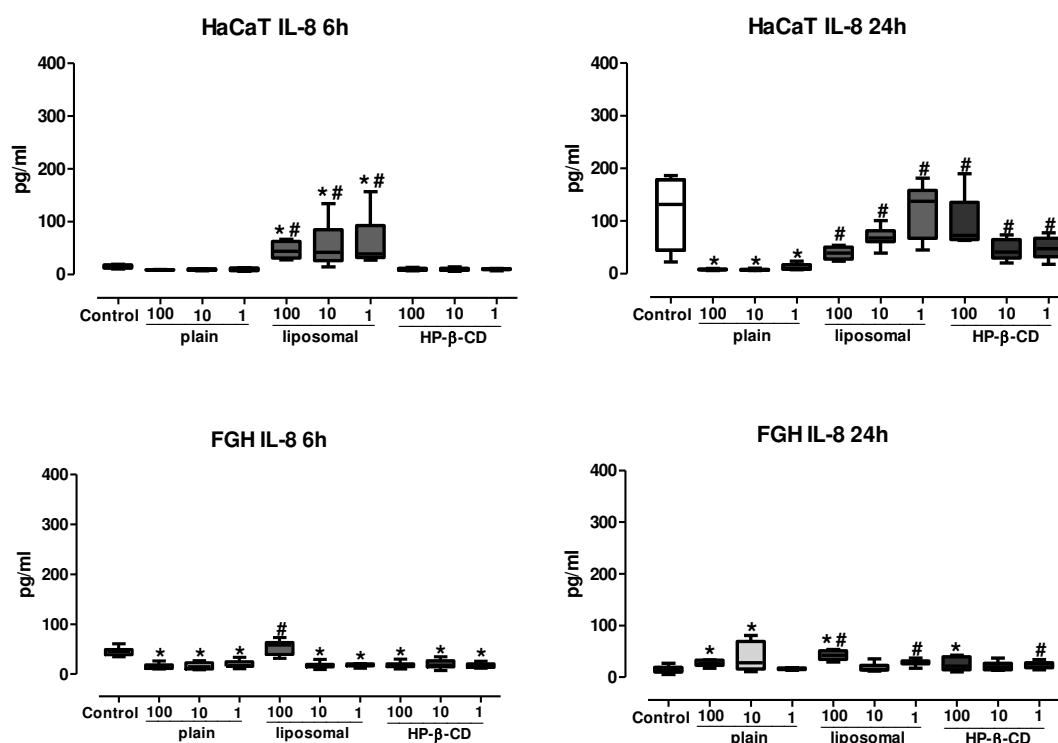


Figura 14 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-8 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

As formulações de ropivacaína reduziram significativamente a liberação de IL-8 nos FGH, com exceção da formulação 100 μ M lipossomal, ao qual não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle nas primeiras 6h. Todavia, após 24h, as formulações 100 μ M e 10 μ M ropivacaína, 100 μ M lipossomal e 100 μ M HP- β -CD aumentaram significativamente a liberação de IL-8 em relação ao controle. A concentração 100 μ M lipossomal ainda induziu a um aumento significativo em relação a ropivacaína na mesma concentração (figura 14).

Os efeitos das formulações de ropivacaína sobre os diferentes tipos celulares na liberação de TNF- α estão apresentados na figura 15. Verificou-se um padrão diferenciado na modulação de TNF- α pelas células HaCaT e FGH. Nas células HaCaT houve pouca variação ao longo do tempo, onde todos os tratamentos reduziram significativamente ($p < 0,05$) a secreção de TNF- α , porém os tratamentos com lipossomos estimularam uma maior liberação de TNF- α em relação as formulações livres ao longo do tempo. As formulações em HP- β -CD aumentaram significativamente a liberação de TNF- α em relação a formulação livre somente após 24h.

Os resultados mostraram-se constantes para os FGH, onde apenas a formulação 100 μ M lipossomal levou a um estímulo de resposta inflamatória, pois aumentou significativamente ($p < 0,05$) a liberação de TNF- α ao longo do tempo. Os demais tratamentos não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (figura 15).

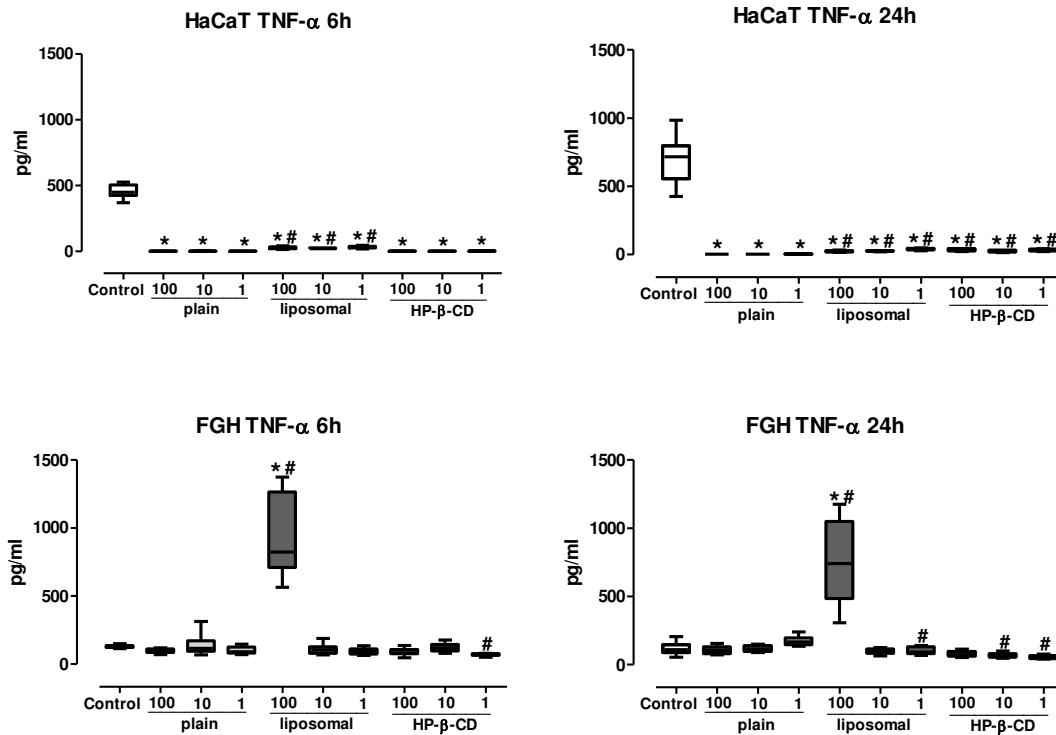


Figura 15 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de TNF- α pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

A secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas células HaCaT e FGH estão apresentadas na figura 15. Novamente observou-se um padrão diferenciado de modulação entre os diferentes tipos celulares. Nas primeiras 6h ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) na liberação de IL-10 pelas formulações 100 μ M e 10 μ M livre, 100 μ M e 1 μ M HP- β -CD em relação ao controle nas células HaCaT. Já as formulações em lipossomos não apresentaram diferença estatística em relação ao controle.

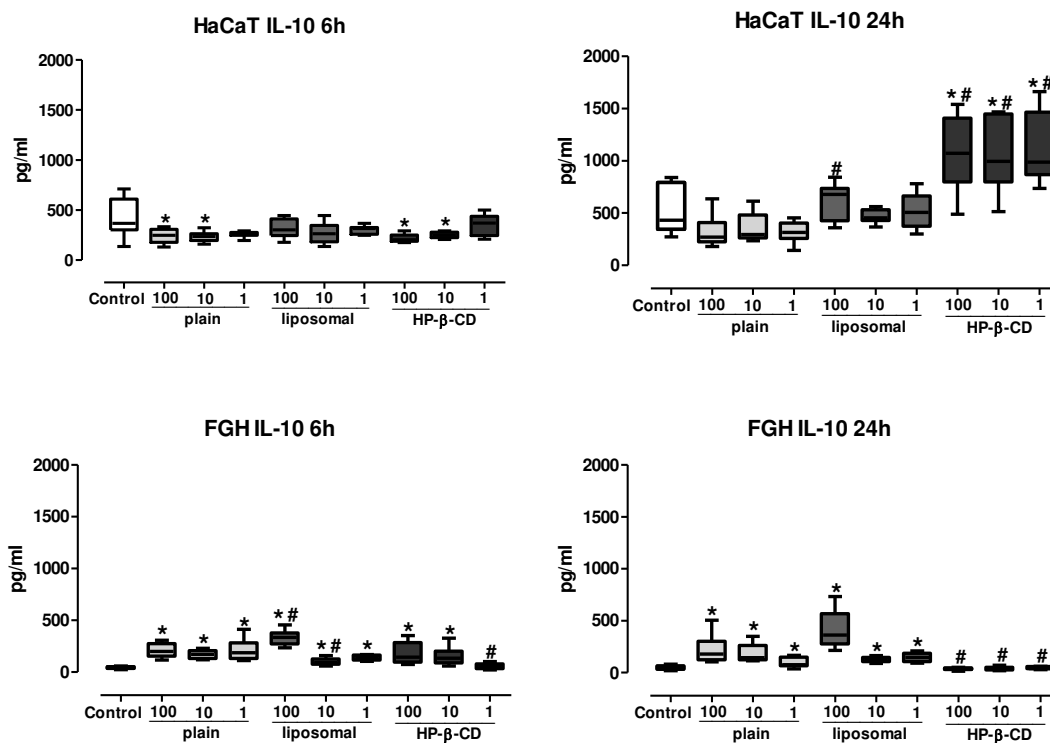


Figura 16 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-10 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

Nos FGH houve um aumento significativo na liberação de IL-10 em relação ao controle por todos os tratamentos, com exceção da formulação 1 μ M HP-β-CD, após 6h. Ao término das 24h, observou-se um aumento na secreção de IL-10 pelas células HaCaT tratadas com HP-β-CD, onde este grupo aumentou significativamente a liberação do mediador anti-inflamatório em relação ao controle e a ropivacaína. Já nos FGH ocorreu um aumento significativo na secreção de IL-

10 em relação ao controle pelas formulações de ropivacaína e ropivacaína lipossomal. As formulações em HP- β -CD não apresentaram diferenças quando comparados ao grupo controle (figura 16).

5.2.2 Efeitos das formulações de ropivacaína livre ou associadas a carreadores sobre a liberação de PGE₂ pelos FGH e HaCaT.

A liberação de PGE₂ após 6h e 24h de exposição as formulações de ropivacaína, apresentou padrões distintos entre os tipos celulares e entre os intervalos de tempo. Ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na liberação de PGE₂ nas células HaCaT pelas formulações de ropivacaína em relação ao controle, com exceção da formulação 1 μ M em HP- β -CD, a qual não apresentou diferença estatística em relação ao controle (figura 17). Após 24h, verificou-se um aumento na secreção de PGE₂ no grupo controle que não mais apresentou diferença estatística em relação a ropivacaína. Todavia, as formulações em lipossomos mantiveram uma secreção de PGE₂ significativamente maior quando comparado ao grupo controle. As formulações em HP- β -CD reduziram significativamente a secreção de deste mediador em comparação ao grupo controle após 24h. Nos FGH todos os tratamentos com ropivacaína induziram a um aumento significativo na secreção de PGE₂ ao longo do tempo.

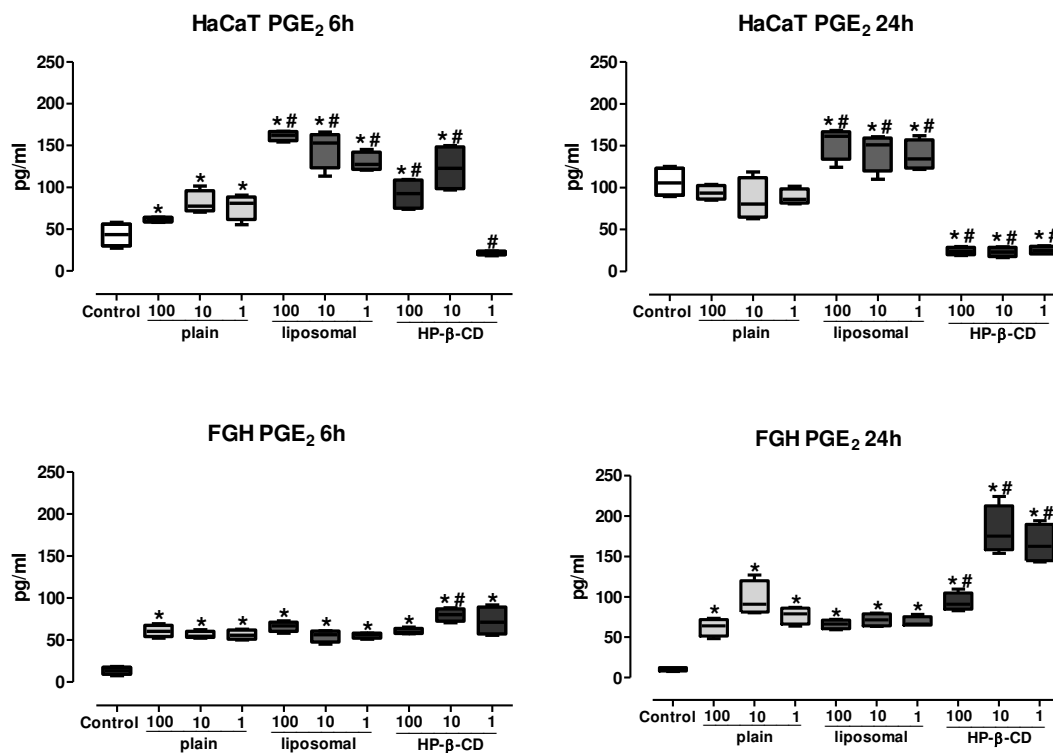


Figura 17 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de PGE₂ pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas (p < 0.05) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

5.2.3 Efeitos das formulações de ropivacaína livre ou associadas a carreadores sobre viabilidade celular.

A viabilidade celular variou de maneira diferente entre os tipos celulares ao longo do tempo após o contato com as diferentes formulações de ropivacaína. Nos

FGH não houve diferença estatística entre o controle e as formulações de ropivacaína ao longo do tempo (figura 18).

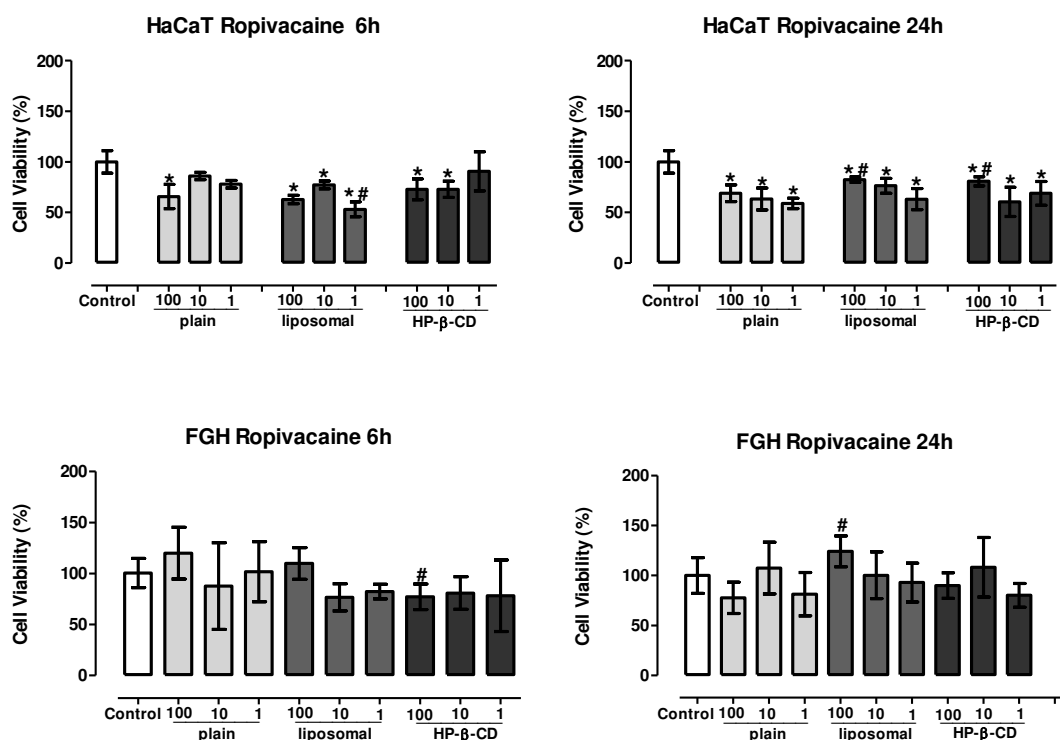


Figura 16 - Efeitos da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre as células HaCaT e FGH após 6h e 24h. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico do XTT. Os dados representam a média (\pm DP) e estão expressos como porcentagem em relação ao controle. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados com *. # representa diferença estatística entre lipossomal e HP- β -CD quando comparados a formulação livre entre as mesmas concentrações (ANOVA, Tukey).

Nas células HaCaT a viabilidade celular ($p < 0,05$) foi significativamente reduzida pelas formulações lipossomais ao longo do tempo. As formulações 100 μ M ropivacaína, 100 μ M e 10 μ M HP- β -CD reduziram significativamente a viabilidade celular em comparação ao controle após 6h. Todas as concentrações de ropivacaína e ropivacaína em HP- β -CD apresentaram viabilidade celular

significativamente menor em comparação ao controle ao fim de 24h. Os resultados da viabilidade celular mensurada pela redução do XTT foram confirmados por microscopia de fluorescência e estão apresentados nas figuras 19 e 20.

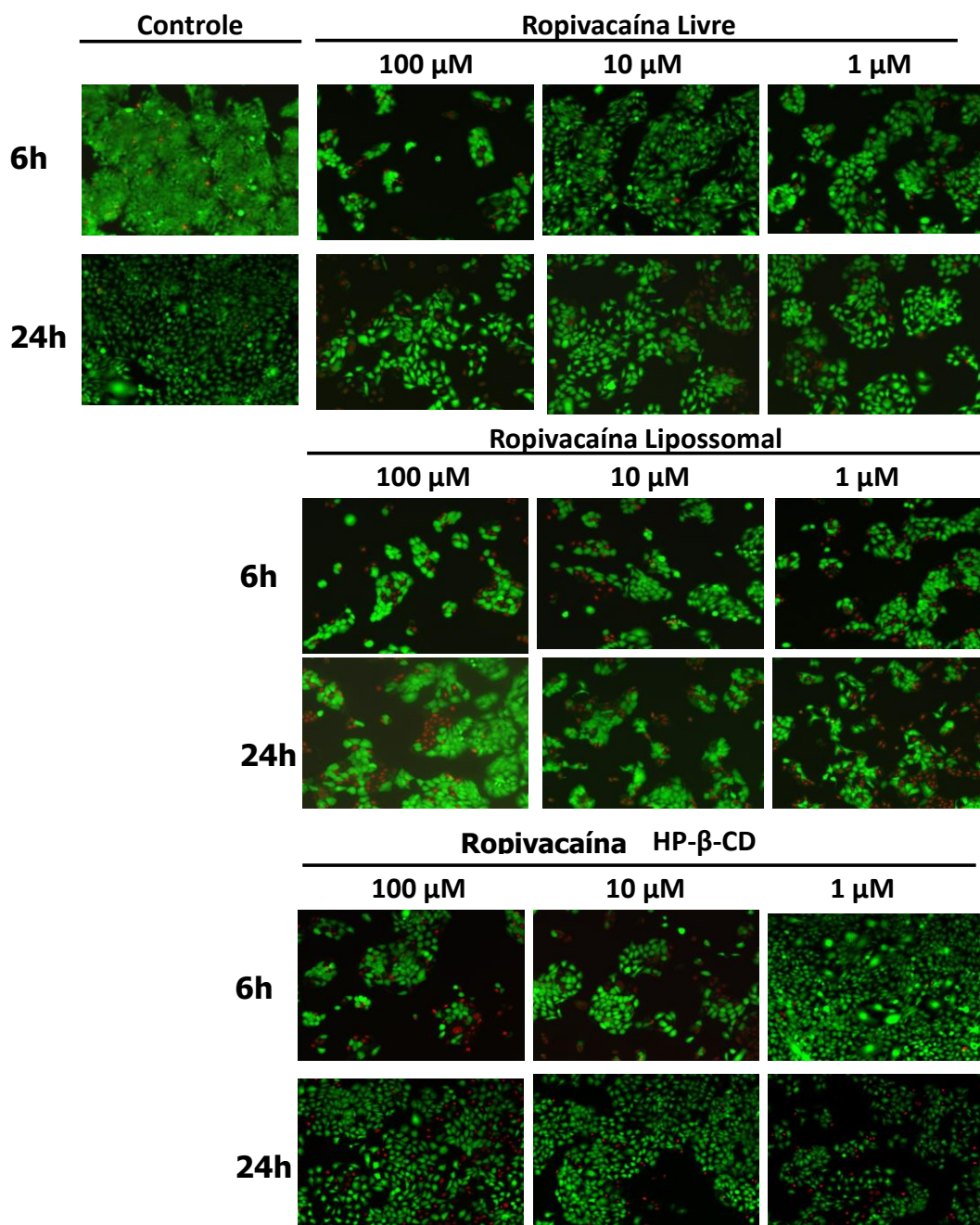


Figura 19 - Viabilidade celular das células HaCaT por microscopia de fluorescência (Live/Dead) após 6h e 24h de exposição a ropivacaína livre e associada a carreadores.

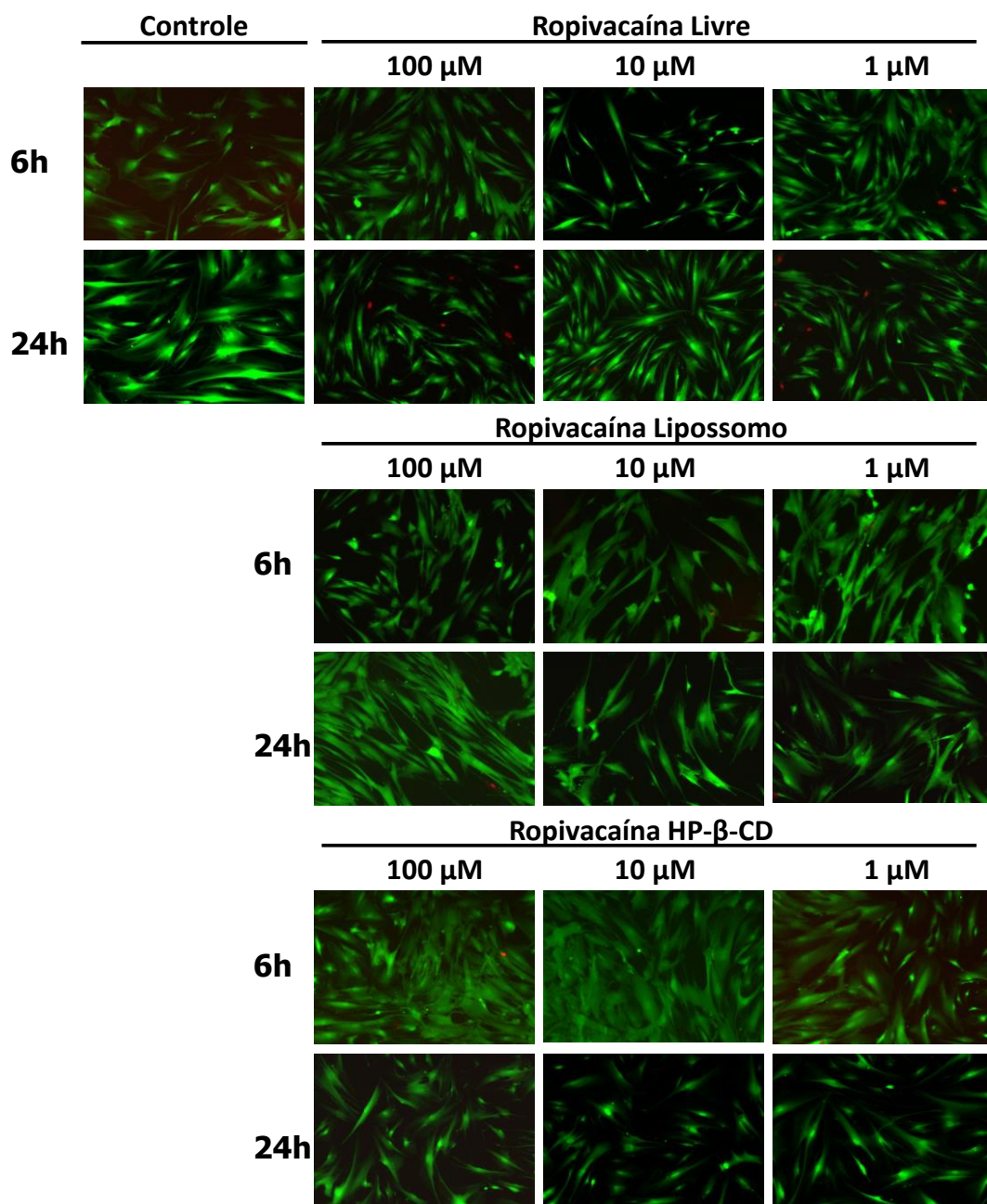


Figura 20 - Viabilidade celular das células FGH por microscopia de fluorescência (Live/Dead) após 6h e 24h de exposição a ropivacaína livre e associada a carreadores.

Verificou-se nas imagens de microscopia de fluorescência pouca alteração das formulações de ropivacaína sobre a viabilidade celular dos fibroblasto em relação controle e também foi capaz de identificar o efeitos destas formulações sobre a

viabilidade celular nas células HaCaT, onde pode observar uma maior incidência de células marcadas em vermelho além de espaços vazios deixados por células mortas, que se soltaram, após o contato com as diferentes formulações de ropivacaína.

5.3 Bupivacaína

5.3.1 Efeitos das formulações de ropivacaína livre ou associadas a carreadores sobre a liberação de citocinas pelos FGH e HaCaT.

A modulação na liberação de IL-1 α após exposição as formulações de bupivacaína apresentou um padrão semelhante nas células HaCaT e FGH nas primeiras 6h (figura 21), onde apenas o tratamento 100 μ M lipossomal aumentou significativamente a liberação de IL-1 α em relação ao controle e a bupivacaína nos FGH.

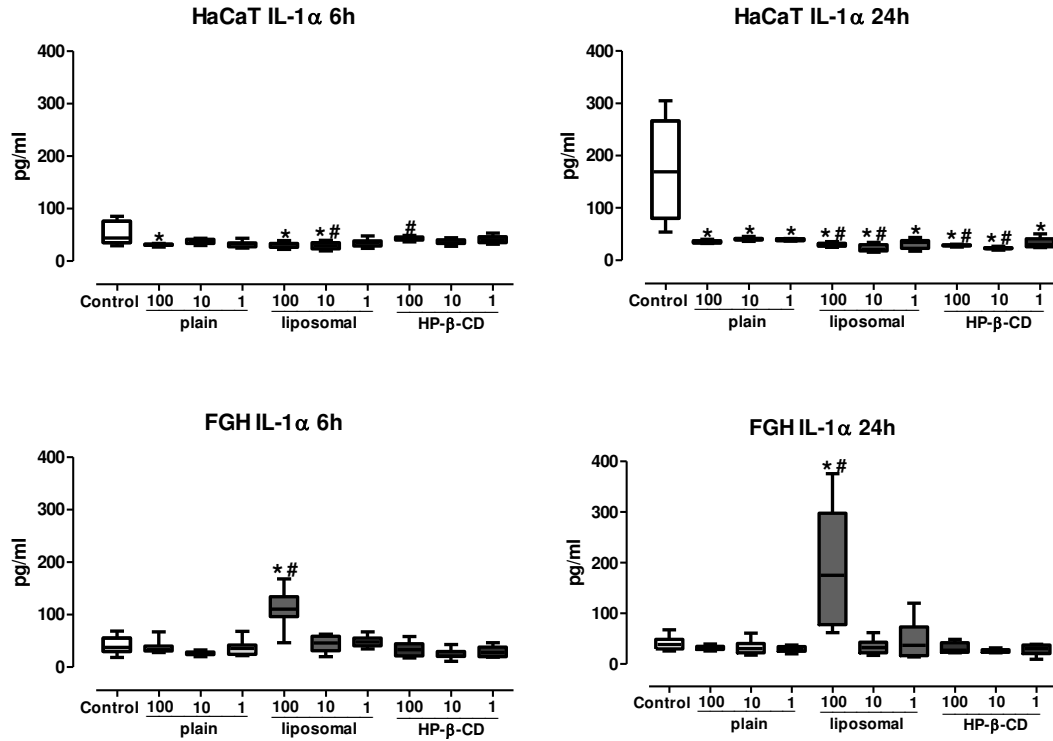


Figura 21 - Efeitos modulatórios da bupivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-1 α pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

Após 24h, verificou-se um aumento na secreção de IL-1 α no grupo controle das células HaCaT e os tratamentos com bupivacaína liberaram significativamente menos IL-1 α em relação ao controle. Nos FGH os resultados repetiram o observado nas primeiras 6h.

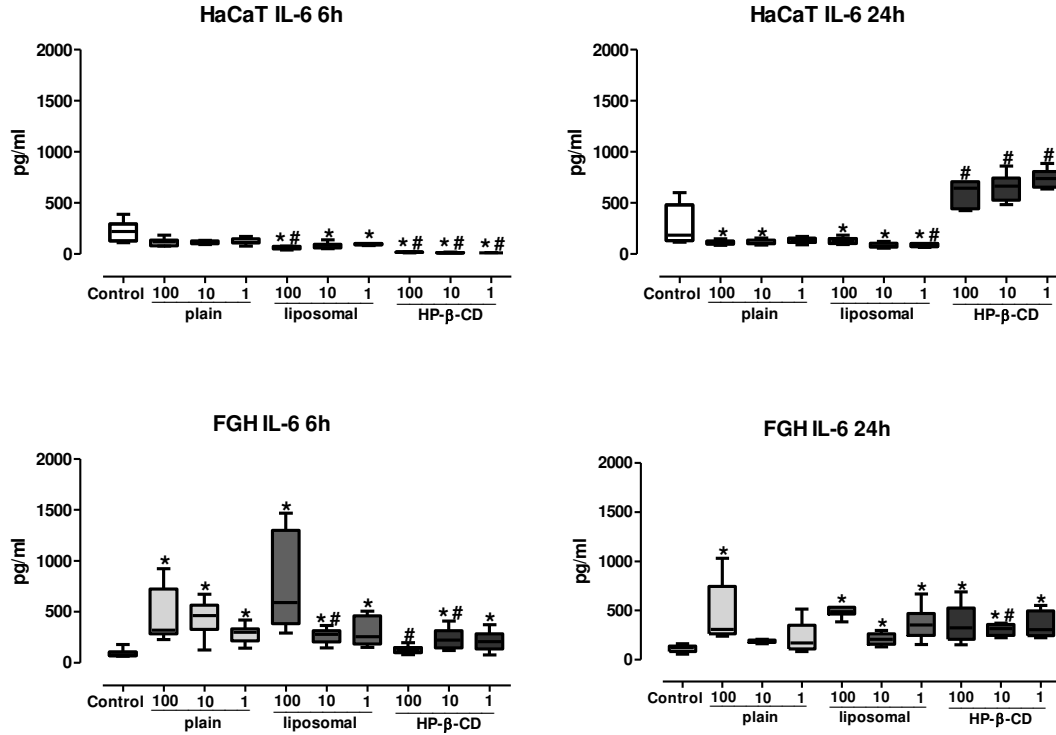


Figura 22 - Efeitos modulatórios da bupivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-6 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

A secreção de IL-6 foi modulada de maneira diferenciada pelas células HaCaT e FGH após exposição as formulações de bupivacaína (figura 22). Nas células HaCaT as formulações lipossomais reduziram a liberação de IL-6 ao longo do tempo, porém sobre os FGH ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. As formulações de bupivacaína livre, 10 μ M e 1 μ M em HP-β-CD também aumentaram a secreção de IL-6 nas primeiras 6h nos FGH.

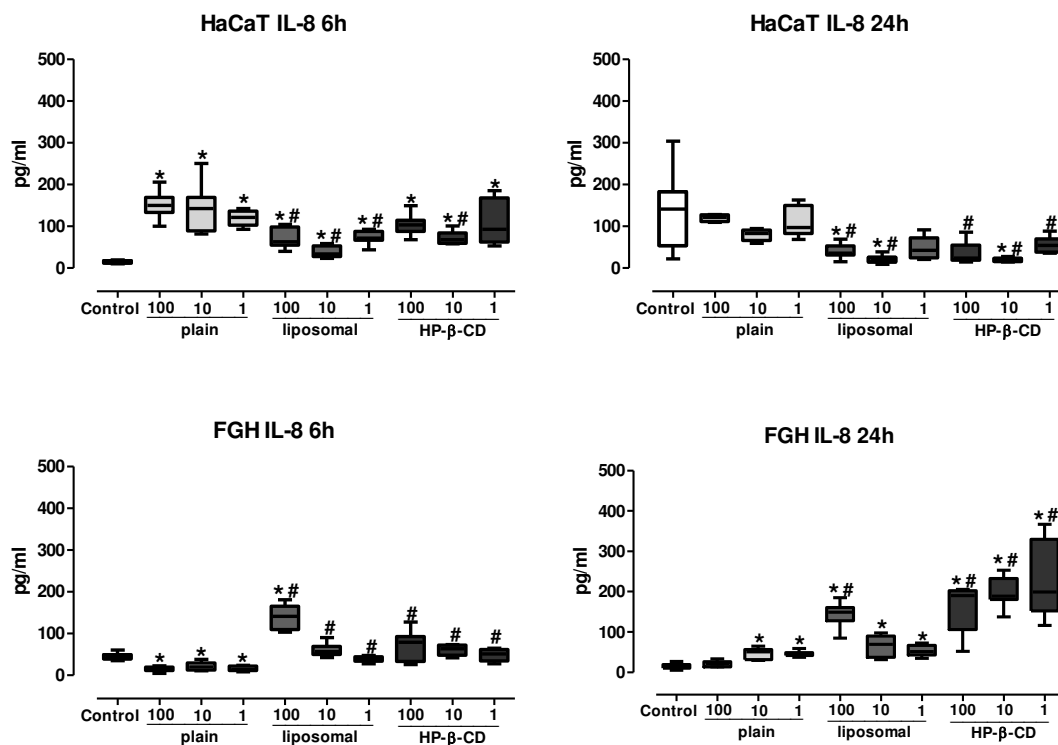


Figura 23 - Efeitos modulatórios da bupivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de IL-8 pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

A formulação 100 μM HP-β-CD aumentou a liberação de IL-6 em relação ao controle apenas após 24h de exposição. Já a bupivacaína nas concentrações de 10 μM e 1 μM apresentaram uma resposta aguda, pois após 24h já não expressavam diferença na liberação de IL-6 em relação ao controle.

A resposta através da liberação de IL-8 pelas células HaCaT, após contato com a bupivacaína, apresentou um caráter agudo. Os tratamentos com bupivacaína aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a liberação de IL-8 em

relação ao controle após 6h. As formulações de bupivacaína livre foram os que mais induziram a liberação de IL-8 sendo significativamente maior quando comparados as formulações em lipossomos e HP- β -CD. Após 24h os tratamentos retornaram aos níveis basais, similares ao expresso pelo controle (figura 23).

O efeito das formulações de bupivacaína foi diferenciado nos FGH em relação ao observado nas células HaCaT, pois se verificou uma resposta tardia. Nas primeiras 6h apenas a formulação 100 μ M lipossomal aumentou significativamente ($p < 0,05$) a secreção de IL-8 em relação ao controle, resultado que se manteve ao longo do tempo. Todavia, após 24h, as formulações em HP- β -CD, 10 μ M e 1 μ M bupivacaína e bupivacaína lipossomal também induziram a um aumento significativo na liberação de IL-8 em relação ao controle (figura 23). As formulações em HP- β -CD e 100 μ M lipossomal ainda aumentaram significativamente a liberação de IL-8 em relação a bupivacaína.

A liberação de TNF- α pelas células HaCaT e FGH estão apresentados na figura 24. A liberação deste mediador apresentou um resultado constante ao longo do tempo em ambos os tipos celulares, que por sua vez apresentaram pequenas variações na secreção deste mediador.

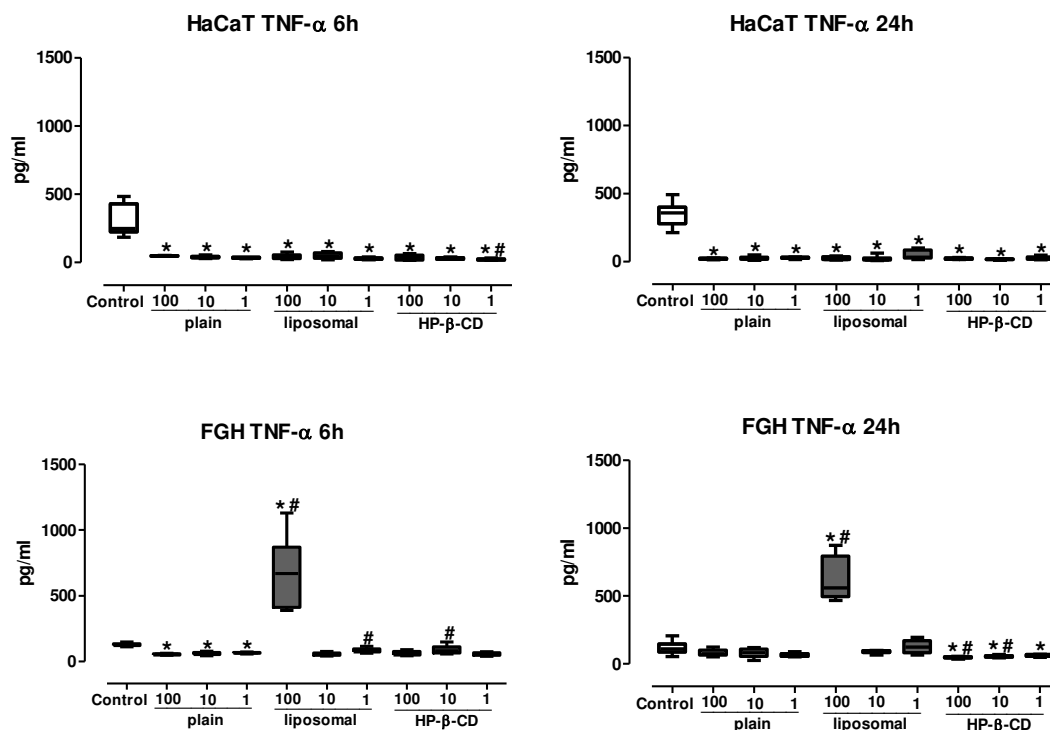


Figura 24 - Efeitos modulatórios da ropivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de TNF- α pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP- β -CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

Nas células HaCaT os tratamentos com bupivacaína reduziram significativamente ($p < 0,05$) a liberação de TNF- α em relação ao controle. A formulação 100 μ M lipossomal induziu a um aumento significativo na liberação de TNF- α pelos FGH ao longo do tempo, já os tratamentos em HP- β -CD reduziram significativamente a liberação de TNF- α em relação ao controle e a bupivacaína após 24h.

5.3.2 Efeitos das formulações de bupivacaína livre ou associadas a carreadores sobre a liberação de PGE₂ pelos FGH e HaCaT.

A liberação de PGE₂ foi modulada de maneira diferenciada pelas células HaCaT e FGH após exposição as formulações de bupivacaína (figura 25). Nas células HaCaT não houve diferença entre os tratamentos e o grupo controle nas primeiras 6h. Ao longo de 24h houve um ligeiro aumento na secreção de PGE₂ pelo controle, que não ocorreu nas formulações tratadas com bupivacaína, desta maneira todas as formulações reduziram significativamente a liberação de PGE₂ em relação ao controle após 24h de contato com as células HaCaT. Nos FGH verificou-se um aumento significativo na liberação de PGE₂ ao longo do tempo, onde apenas as formulações 10 µM e 1 µM em HP-β-CD não diferiram do controle após 24h.

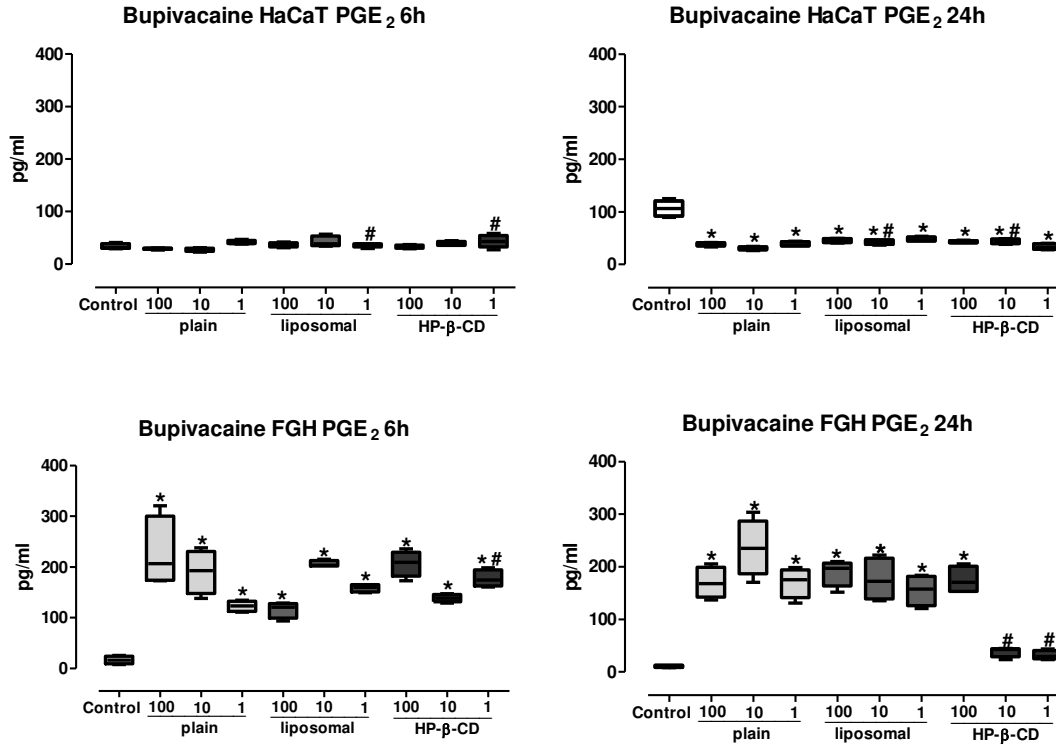


Figura 25 - Efeitos modulatórios da bupivacaína livre e associada a carreadores sobre a secreção de PGE₂ pelas células HaCaT and FGH após 6h e 24h. Os valores apresentados correspondem a mediana, primeiro e terceiro quartis, as suíças indicam o máximo e o mínimo valor para cada grupo. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados pelo *, enquanto # representa diferença estatística entre os tratamentos com lipossomos e HP-β-CD quando comparados a formulação livre na mesma concentração (teste de Kruskal-Wallis).

5.3.3 Efeitos das formulações de bupivacaína livre ou associadas a carreadores sobre viabilidade celular.

Os efeitos da bupivacaína sobre a viabilidade celular nas células HaCaT e FGH estão apresentados na figura 26. A bupivacaína 100 μM reduziu a viabilidade celular das células HaCaT ao longo tempo. A concentração 10 μM bupivacaína

também induziu a uma redução significativa na viabilidade celular em relação ao controle após 24h. Não houve alteração na viabilidade celular pela bupivacaína nos FGH.

As formulações de bupivacaína lipossomal conduziram a uma redução na viabilidade celular nas primeiras 6h, em ambos os tipos celulares. Após 24h apenas as concentrações 10 μM e 1 μM continuaram a exibir uma viabilidade significativamente menor em relação ao controle nos FGH. As formulações em HP- β -CD reduziram significativamente a viabilidade celular ao longo do tempo em ambos os tipos celulares, com exceção da concentração 100 μM HP- β -CD nos FGH que não diferiu do controle nas primeiras 6h. Os resultados da viabilidade celular mensurados pela redução do XTT foram confirmados por microscopia de fluorescência e estão apresentados nos figuras 27 e 28.

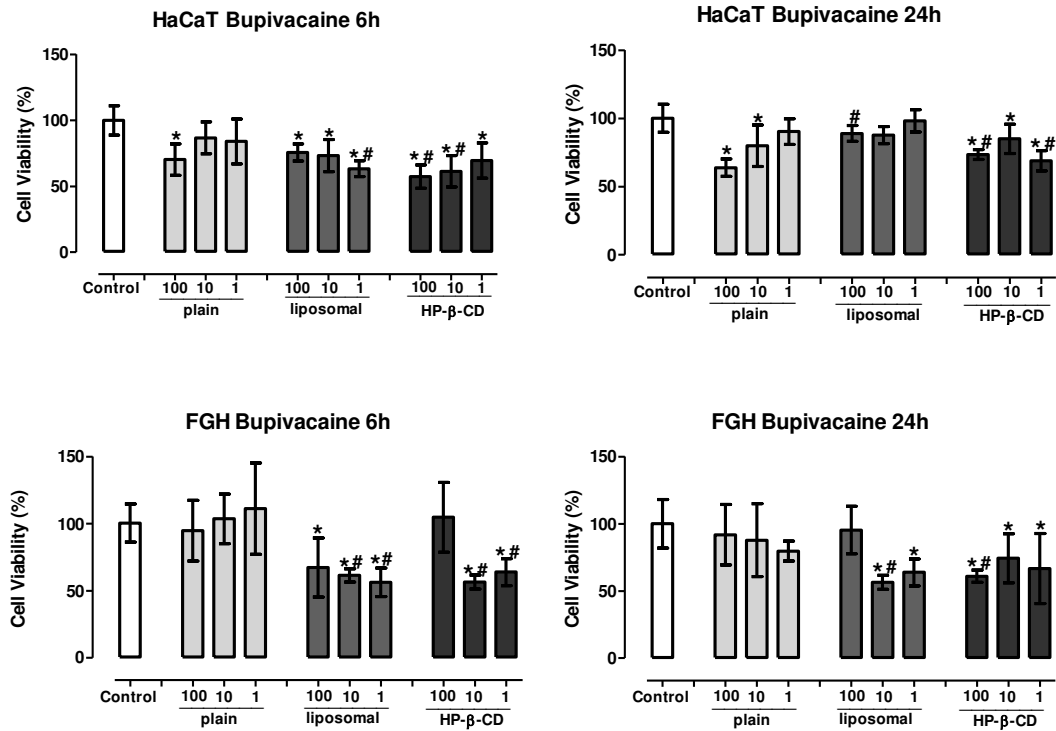


Figura 26 - Efeitos da bupivacaína livre e associada a carreadores sobre as células HaCaT e FGH após 6h e 24h. A viabilidade celular foi determinada por ensaio colorimétrico do XTT. Os dados representam a média (\pm DP) e estão expressos como porcentagem em relação ao controle. Diferenças estatísticas ($p < 0.05$) entre os tratamentos e o grupo controle estão marcados com *. # representa diferença estatística entre lipossomal e HP- β -CD quando comparados a formulação livre entre as mesmas concentrações (ANOVA, Tukey).

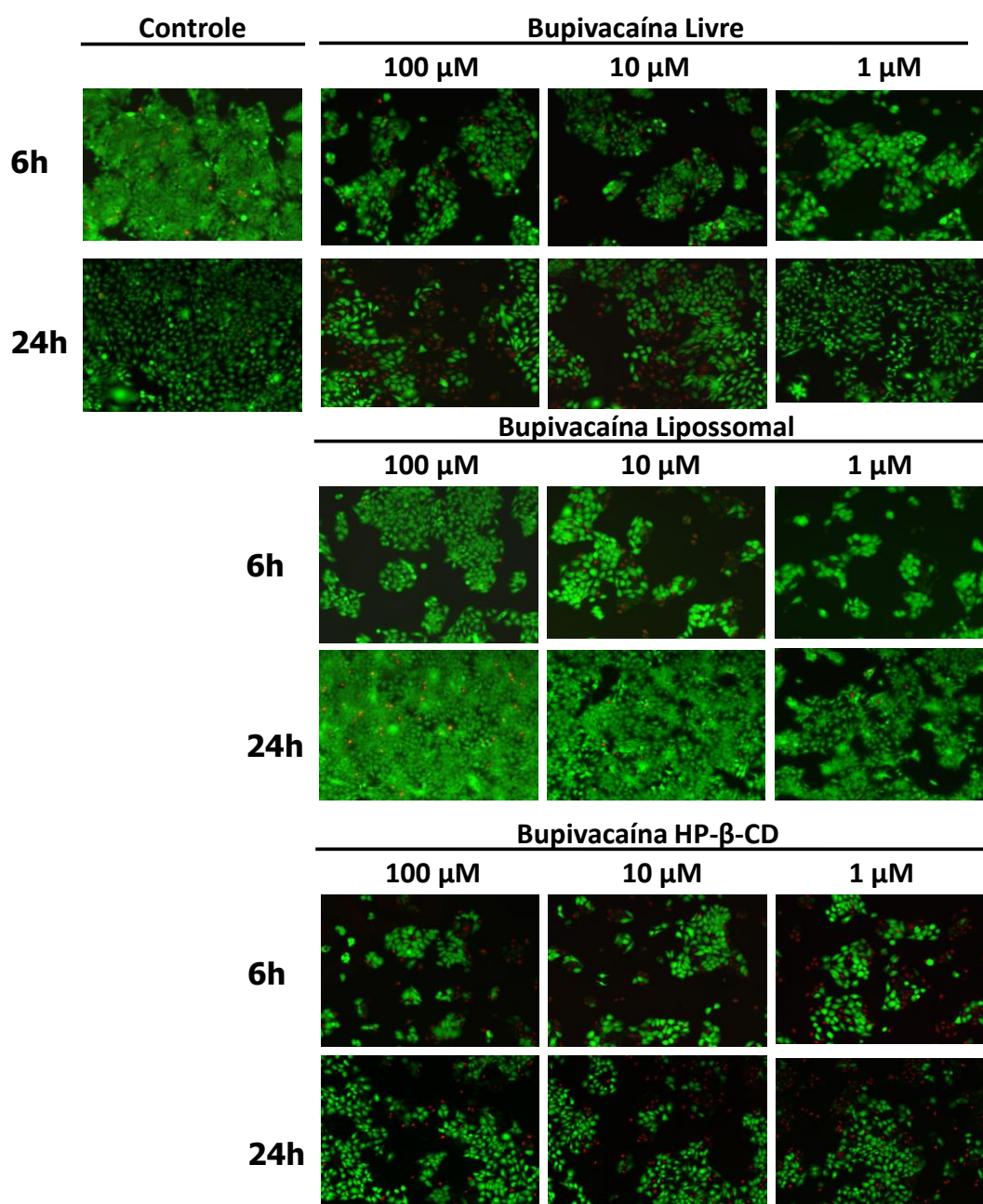


Figura 27 - Viabilidade celular das células HaCaT por microscopia de fluorescência (Live/Dead) após 6h e 24h de exposição a bupivacaína livre e associada a carreadores.

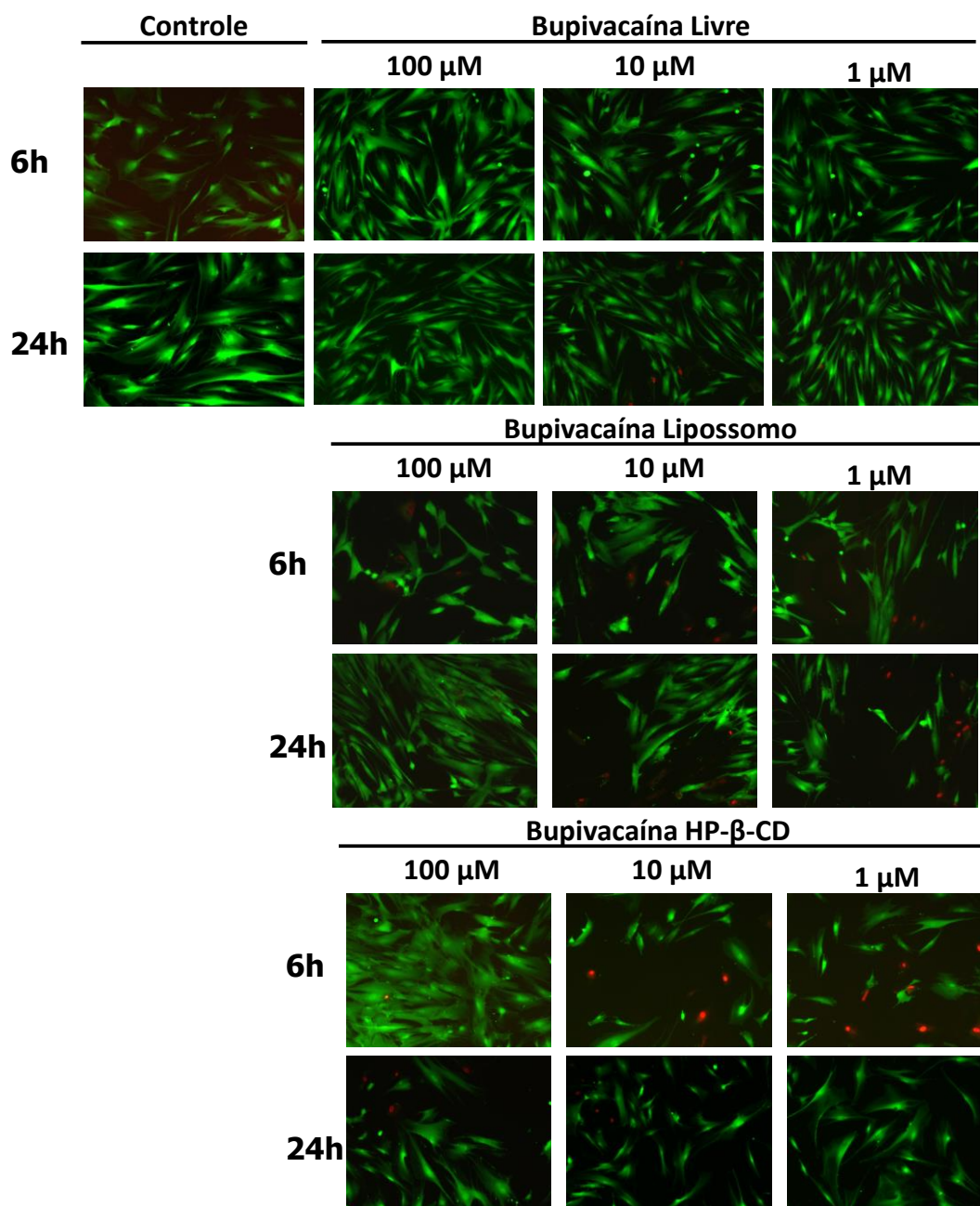


Figura 28 - Viabilidade celular das células FGH por microscopia de fluorescência (Live/Dead) após 6h e 24h de exposição a ropivacaína livre e associada a carreadores.

As formulações de bupivacaína foram mais agressivas para os FGH verificando-se um aumento no número de células mortas e nos espaços vazios na placa após utilização dos de bupivacaína associada aos carreadores. Essa técnica

também foi capaz de detectar a perda da viabilidade celular observada nos tratamentos com bupivacaína nas células HaCaT, especialmente nas concentrações 100 μ M bupivacaína livre, lipossomal e em HP- β -CD nas primeiras 6h e 100 μ M e 10 μ M bupivacaína e bupivacaína em HP- β -CD após 24h.

5.4 Efeitos dos anestésicos locais na apoptose celular

O efeito das formulações de anestésicos locais sobre a apoptose celular foi realizado apenas nas formulações de bupivacaína e ropivacaína na concentração 100 μ M livre e associada a carreadores, nas células HaCaT após 6h de exposição. O tempo, tipo celular e a concentração utilizada foram definidos com base nos resultados da viabilidade celular. A lidocaína não foi abordada uma vez que pouco afetou a viabilidade celular. A figura 29 demonstra a dispersão das células necróticas, apoptóticas e viáveis nos diferentes tratamentos avaliados por citometria de fluxo.

O número total de células viáveis e em apoptose, com seus respectivos percentuais para cada grupo, estão apresentados na tabela 1. Foi utilizado a staurosporina como controle positivo da indução da apoptose, a qual apresentou uma taxa de apoptose de 22,63%. Os tratamentos mostraram uma maior semelhança com o grupo controle que teve uma taxa de 2,92% de apoptose.

Os tratamentos com bupivacaína, bupivacaína em HP- β -CD e ropivacaína lipossomal tiveram uma taxa de apoptose de 2,38%, 1,91% e 1,92% respectivamente. Estes valores foram significativamente inferiores (teste qui-quadrado de aderência, $p < 0.05$) aos verificados no grupo controle. Os tratamentos com bupivacaína lipossomal, ropivacaína e ropivacaína em HP- β -CD aumentaram significativamente (teste qui-quadrado de aderência, $p < 0.05$) a taxa de apoptose

em relação ao controle, apresentando valores de 3,68%, 4,24% e 3,64%, respectivamente.

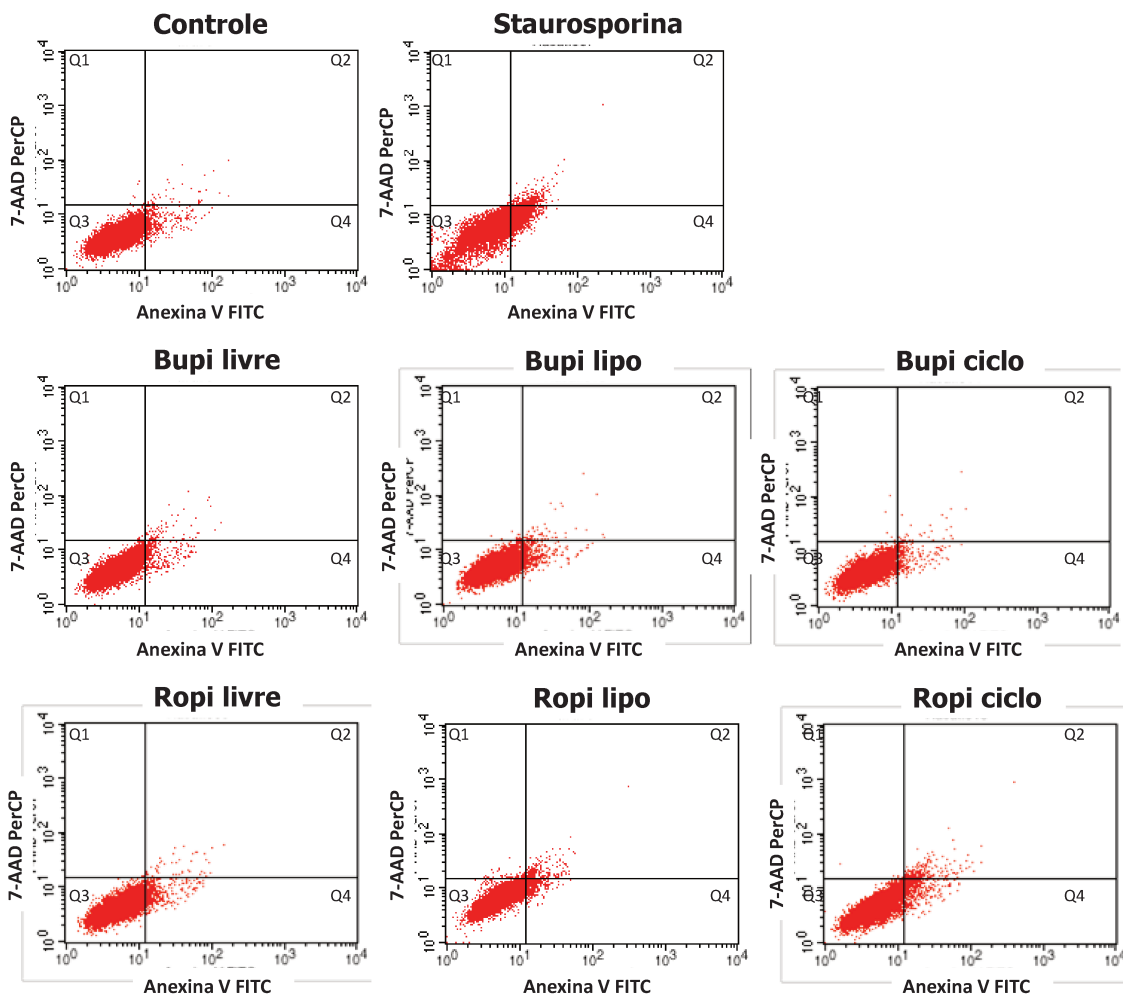


Figura 29 – Gráficos de dispersão de células necróticas, apoptóticas e viáveis mensuradas por citometria de fluxo após 6h de exposição das células HaCaT ao controle, staurosporina e formulações livre ou associadas a carreadores de bupivacaína e ropivacaína 100 μ M. No eixo y foi marcado as células fluorescentes para 7-AAD e no eixo x as células marcadas com anexina V. Quadrante 3 (Q3) mostra as células viáveis, quadrantes 1 e 2 (Q1 e Q2) estão as células em necrose e no quadrante 4 (Q4) as células em apoptose.

Tabela 1. Efeito das formulações 100 µM de bupivacaína e ropivacaína na indução da apoptose e necrose nas células HaCaT após 6h.

| Tratamentos | Apoptose total | % de apoptose | Necrose Total | % de necrose |
|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| Controle | 583 | 2.92 | 102 | 0.51 |
| Staurosporina | 4526 | 22.63 | 803 | 4.01 |
| Bupi livre | 477 | 2.38 | 124 | 0.62 |
| Bupi lipo | 736 | 3.68 | 147 | 0.73 |
| Bupi ciclo | 381 | 1.91 | 75 | 0.37 |
| Ropi livre | 849 | 4.24 | 104 | 0.52 |
| Ropi lipo | 381 | 1.92 | 531 | 2.65 |
| Ropi ciclo | 727 | 3.64 | 315 | 1.57 |

* O número total de eventos avaliados para cada tratamento foi de 20.000, experimento realizado em duplicata.

6. DISCUSSÃO

Novas formulações anestésicas vêm sendo desenvolvidas associando os anestésicos locais a sistemas de liberação modificado, visando o aprimoramento de efeitos terapêuticos e farmacológicos (de Araújo *et al.*, 2008; Tófoli *et al.*, 2010). Porém, faltam estudos sobre os efeitos dessas formulações sobre vias inflamatórias, toxicidade e outras vias de sinalização celular.

As formulações lipossomais testadas de lidocaína, bupicaína e ropivacaína foram previamente caracterizadas e apresentaram uma taxa de encapsulação $19,1 \pm 3,6\%$ (Cereda *et al.*, 2006); $24,8 \pm 4,2\%$ e $23,8 \pm 3,5\%$ respectivamente (de Araújo 2005). As formulações em HP- β -CD de lidocaína (Moraes *et al.*, 2007), bupivacaína e ropivacaína (de Araújo 2005) também foram caracterizadas anteriormente, onde as análises demonstraram uma complexação entre anestésicos locais e HP- β -CD próximas de da razão molar de 1:1.

O modelo de estudo empregado nesta pesquisa, o qual utilizou células em cultura para observar o efeito de preparações de fármacos, tem sido muito relatado na literatura para este fim. Relatos com diferentes células, tais como fibroblastos, adipócitos, condrócitos, neurônios, células epiteliais (Schonfeld-Dado *et al.*, 2009; Keck *et al.*, 2010; Lang *et al.*, 2010; Birkenmaier *et al.*, 2011) entre outras células, vêm sendo publicados na literatura indexada internacional.

O modelo de células em cultura apresenta várias limitações para transpor diretamente os resultados para situações *in vivo* (Werdehausen *et al.*, 2009). Apesar das desvantagens e limitações deste método, como por exemplo, a relativa instabilidade das células em cultura e a perda de características fenotípicas, o modelo se firmou como um dos principais métodos iniciais para observar potenciais ações de fármacos em nível celular (Mena *et al.*, 2010).

O uso constante de anestésicos locais nas práticas odontológicas expõem as células epiteliais orais e fibroblastos gengivais ao contato com estes fármacos. Por isso, neste estudo, optou-se por um modelo experimental de cultura de células utilizando linhagens imortalizadas. Além disso, as linhagens HaCaT e FGH constituem modelos experimentais bem definidos para explorar a resposta celular sobre diferentes contextos, que justificam seu amplo emprego em estudos *in vitro* para investigação de vias de sinalização intracelulares e respostas a diferentes tipos de estresse (Boukamp *et al.*, 1988; Ravid *et al.*, 2002).

As concentrações de anestésicos locais utilizadas no presente estudo, as quais variaram entre 100 μM e 1 μM representam valores próximos à concentração plasmática observada na prática clínica (Downing *et al.*, 1997). Kimi *et al.* (2012) avaliaram a cinética da ropivacaína e lidocaína após anestesia infiltrativa na maxila de ratos. A mucosa do palato exibiu o pico máximo da concentração anestésica, onde a aplicação de 200 μL de ropivacaína 0,5% apresentou uma concentração de 204 μM após 0,5 minutos, e decaiu cerca de 60,5%, 78,9% e 57,1% do valor máximo após 2, 5 e 10 minutos respectivamente. A injeção de 50 μL de lidocaína 2% apresentou um pico de concentração de 726 μM , onde após 10 minutos houve uma redução de 44% e após 60 minutos havia apenas 1,7% em relação ao valor inicial.

Na inflamação, os efeitos dos anestésicos locais são complexos e refletem interações de mecanismos em diversos níveis (Gordon *et al.*, 2008). Têm sido reportados efeitos imunorregulatórios da lidocaína sobre citocinas em diversos tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*. Este anestésico local tem demonstrado efeitos na modulação da cascata inflamatória, suprimindo a expressão de citocinas derivadas das células T tais como IL-2, TNF- α e INF- γ (Wang *et al.*, 2011).

A lidocaína mostrou efeito anti-inflamatório sobre a cultura de células epiteliais intestinais, inibindo a secreção da citocina IL-1 β e IL-8, além de

aumentar a secreção do receptor antagonista de IL-1 (Takao *et al.*, 1996; Lahav *et al.*, 2002), reduziu a expressão de IL-1 α por células mononucleares da circulação periférica quando estimuladas por LPS (Sinclair *et al.*, 1993) e suprimiu a produção de IL-8 e IL-6 em coelhos injetados com endotoxinas (Taniguchi *et al.*, 2000).

Estes estudos utilizaram um modelo inflamatório com o objetivo de verificar as propriedades anti-inflamatórias da lidocaína. Já o presente estudo se propôs a observar os efeitos da associação da lidocaína a carreadores sobre a liberação de citocinas. Desta maneira, a resposta anti-inflamatória mediada pela lidocaína livre não foi tão evidente quando comparado com os relatos da literatura. Todavia, foi possível observar uma redução significativa na secreção de IL- α e IL-8 nas células HaCaT após 24h de exposição. Esses resultados são similares aos obtidos por Girard *et al.* (2013), os quais não conseguiram detectar a presença de TNF- α *in vitro* em adipócitos originados de células tronco após exposição a lidocaína em concentrações de 1,7 mM à 6,8 mM.

A lidocaína 100 μ M liposomal conduziu a um forte aumento na liberação dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-8 e IL-6 pelos FGH ao longo do tempo. As formulações em HP- β -CD também aumentaram a liberação desses mediadores após 24h.

Com relação à bupivacaína, estudos recentes tem demonstrado a capacidade deste anestésico local em reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Huang *et al.*, 2008). De Iullis *et al.* (2001) demonstraram que a bupivacaína conduz a uma redução de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em macrófagos e de IL-2 e IL-4 em fibroblastos de ratos. Estudos *in vitro* utilizando condrócitos e fibroblastos obtidos do disco intervertebral e estimulados com IL-1 β foram expostos a bupivacaína na concentração de 0,75 mM por 2 horas e avaliados quanto à liberação de TNF- α , IL-6 e IL-8. Após 18h, a bupivacaína demonstrou

capacidade de reduzir a secreção de TNF- α , porém nenhum efeito foi observado sobre IL-6 e IL-8 (Quero *et al.*, 2011).

Estes relatos da literatura demonstram que os efeitos da bupivacaína sobre a liberação das citocinas pró-inflamatórias estão diretamente relacionados com o tipo celular envolvido, corroborando com os dados observados no presente estudo, uma vez que a bupivacaína reduziu a liberação de IL-1 α e IL-6 após 24h e de TNF- α ao longo do tempo nas células HaCaT, porém não afetou a secreção de IL-1 α e TNF- α após 24h e estimulou uma maior liberação de IL-6 nas primeiras 6h nos FGH.

A bupivacaína desencadeou uma resposta inflamatória mais acentuada em comparação a lidocaína, devido ao aumento na liberação de IL-6 nos FGH e IL-8 sobre as HaCaT nas primeiras 6h. A associação com carreadores intensificou a liberação dos mediadores pró-inflamatórios, onde novamente a formulação 100 μ M lipossomal estimulou um aumento significativo na secreção de IL-1 α , IL-6, IL-8 e TNF- α ao longo do tempo nos FGH, já as formulações em HP- β -CD conduziram a uma maior liberação de IL-6 e IL-8 nos FGH, principalmente após 24h.

Poucos estudos relatam os efeitos da ropivacaína sobre a liberação de mediadores inflamatórios *in vitro*. Estudos anteriores demonstraram o potencial inibitório da ropivacaína sobre os mediadores LTB₄ e IL-1 em granulócitos (Martinsson *et al.*, 1997), além de atenuarem a ativação de TNF- α e seus efeitos sobre a migração leucocitária (Zhang & Thorlacius, 2000). De maneira geral, os resultados da ropivacaína demonstraram uma ação capaz de inibir a secreção de IL-1 α após 24h e de TNF- α ao longo do tempo nas células HaCaT, porém não modificou a liberação destes mediadores nos FGH.

A associação de ropivacaína com lipossomos proporcionou um aumento na liberação de IL-1 α , IL-6 e TNF- α nos FGH e IL-8 nas HaCaT, porém desta vez os tratamentos com HP- β -CD não apresentaram diferenças relevantes em relação a

ropivacaína. Esses resultados podem estar relacionados à diferenças na porcentagem de encapsulação do anestésico no carreador.

As citocinas IL-1 α , IL-6, IL-8 e TNF- α estão diretamente relacionadas ao processo inflamatório estimulando a produção de proteínas de fase aguda, a adesão de células através da liberação de moléculas de adesão intracelular (ICAM) e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM), ativação e quimiotaxia de neutrófilos (Borish & Steinke, 2003). Desta forma, o aumento na liberação de mediadores inflamatórios induzidos pelas formulações lipossomais na concentração 100 μ M e em HP- β -CD podem levar a consequências clínicas como uma resposta inflamatória mais severa.

O aumento da liberação de determinadas citocinas após exposição às formulações em concentrações de 100 μ M lipossomais, observado neste estudo, está de acordo com estudos anteriores que demonstram um aumento da resposta inflamatória. Chen *et al.* (2012) utilizou um complexo lipossomal de polietileno glicol-polietilamina, onde evidenciou o efeito deste complexo sobre o aumento da liberação de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 em macrófagos mononucleares de ratos e células mononucleares periféricas humanas. Vesículas lipossomais também têm sido empregadas em sistemas de indução de imunidade humoral e mediada por células para um amplo espectro de doenças infecciosas e câncer (Gregoriadis *et al.*, 1996; Henriksen-Lacey *et al.*, 2011), além de permitir um eficiente reconhecimento pelas células apresentadoras de antígeno e podem induzir a inflamação através da resposta imune inata (Watson *et al.*, 2012).

A bupivacaína lipossomal promoveu uma notável inflamação granulomatosa, a qual foi considerada como uma reação normal contra os lipossomos, quando testada em coelhos (Richard *et al.*, 2011). A presença de células inflamatórias nos músculos foi detectada em camundongos após 3 dias do bloqueio do nervo ciático utilizando ropivacaína lipossomal (de Araújo *et al.*, 2008). Outros estudos também

relataram respostas inflamatórias após utilização de anestésicos locais associados a sistemas de liberação modificados (Kohane *et al.*, 2003; Pandera *et al.*, 2008; Epstein-Barash *et al.*, 2009).

O aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias por ciclodextrinas também tem sido relatado na literatura. Boulmedarat *et al.* (2005) testaram os efeitos da β -ciclodextrina metilada aleatoriamente (RAMEB) em um modelo *in vitro* utilizando células epiteliais orais humanas (TR146) para verificar a toxicidade e a liberação de mediadores inflamatórios. Após 1h de incubação, o RAMEB 10% provocou um aumento significativo na liberação de IL-1 α em relação às células tratadas com PBS. O efeito inflamatório aumentou com o tempo de exposição, sendo que após 24h não apresentou diferença em relação às células tratadas com 1% de SDS, um agente estimulante de secreção de IL-1 α . Estes resultados podem ajudar a elucidar o aumento na liberação de citocinas observado no presente estudo após 24h de contato com as formulações em HP- β -CD.

Todavia, as formulações de lidocaína lipossomal 100 μ M, 100 μ M e 10 μ M em HP- β -CD aumentaram a liberação de IL-10 nos FGH, assim como as formulações de ropivacaína lipossomal nos FGH e ropivacaína em HP- β -CD nas HaCaT após 24h.

Estes resultados contrapõem os efeitos destas formulações sobre as citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a IL-10 possui um papel protetivo na inflamação. Estudos *in vitro* utilizando miofibroblastos submetidos a um *stretch*, verificou-se uma redução na liberação de IL-1 β , TNF- α e IL-6, além de uma diminuição na taxa de apoptose após o tratamento com IL-10 (Hawwa *et al.*, 2011).

A PGE₂ apresenta um papel chave na inflamação. A produção deste mediador é desencadeada pela liberação do ácido araquidônico (AA) das membranas dos fosfolípidos pela fosfolipase A₂, sendo em seguida o AA

transformado em PGH₂ (prostaglandina H₂) que é convertido em várias prostaglandinas, incluindo PGE₂ (Lee *et al.*, 2009).

Os resultados de secreção de PGE₂ variaram pouco entre as formulações livres, lipossomais e em HP-β-CD, demonstrando um efeito intrínseco da molécula dos anestésicos locais na modulação deste mediador, onde na maioria das vezes a complexação em carreadores não foi capaz de modificar essas propriedades.

O α-tocoferol, presente nas formulações lipossomais, tem apresentado capacidade de inibir a produção de PGE₂ em macrófagos (Beharka *et al.*, 2002), porém em células epiteliais pulmonares não foi efetivo (Jiang *et al.*, 2000), sugerindo que o potencial do α-tocoferol depende do tipo celular (Lee *et al.*, 2006). No presente estudo as formulações lipossomais apresentaram pouca variação em relação às formulações livres, não sendo efetivas na modulação deste mediador.

A lidocaína foi o anestésico local que induziu a maior liberação de PGE₂ pelas células HaCaT. Estes dados corroboram com os observados por Umbrain *et al.* (2009) que demonstraram a ocorrência do aumento na liberação de PGE₂ após aplicação intratecal de lidocaína. Estes resultados podem ser explicados pelos efeitos do aumento do cálcio intracelular induzido pela lidocaína (Umbrain *et al.*, 2008).

Os efeitos da bupivacaína sobre a liberação de PGE₂ foram contraditórios entre os tipos celulares, enquanto nas células HaCaT houve uma redução na liberação de PGE₂ ao longo do tempo, nos FGH a bupivacaína induziu um aumento na liberação deste mediador inflamatório.

Os resultados obtidos com as HaCaT condizem com os observados por Huang *et al.* (2008), onde em testes *in vitro* verificaram o efeito da bupivacaína sobre a redução da produção de PGE₂ e a expressão de COX-2 após indução por

LPS em macrófagos de camundongos ativados. Este anestésico também foi capaz de promover a inibição do receptor de PGE₂ (Honemann *et al.*, 2001).

Todavia, testes *in vivo* têm demonstrado resultados diferentes dos obtidos em estudos *in vitro*. O bloqueio do nervo ciático com bupivacaína em animais com inflamação na pata não contribuiu para a prevenção do aumento dos níveis de PGE₂ (Samad *et al.*, 2001). Também foi verificado um aumento da secreção de PGE₂ no líquido cefalorraquidiano de ratos em resposta a aplicação de bupivacaína intratecal (Kroin *et al.*, 2006). Estes resultados estão de acordo com os observados nos FGH. A diferença de resposta entre os dois tipos celulares neste caso pode estar relacionado a um mecanismo de ação diferente daquele observado com a lidocaína, sendo que pode ter ocorrido respostas diferentes, dos tipos celulares, nas mudanças na expressão de COX-2 e conseqüentemente na produção e liberação de PGE₂ após exposição as formulações de bupivacaína (Huang *et al.*, 2008).

A ropivacaína demonstrou resultados semelhantes a lidocaína em relação a liberação de PGE₂ para os FGH. Nas células HaCaT verificou-se efeito agudo induzido pela ropivacaína, porém após 24h os tratamentos com ropivacaína livre e em HP-β-CD não exibiram nenhum aumento na secreção do mediador e apenas as formulações lipossomais mantiveram elevados os níveis de secreção de PGE₂.

Formulações em HP-β-CD mostraram-se capazes de reduzir a liberação de PGE₂ em relação ao anestésico livre após 24h nas células HaCaT para ropivacaína e nos FGH para a bupivacaína. Este resultado pode estar atrelhado a taxa de complexação e liberação progressiva dos anestésicos exercida pelo carreador.

Vários estudos previamente já avaliaram a citotoxicidade de diferentes anestésicos locais, onde tem sido comumente relatado a variação da toxicidade em relação ao anestésico local e ao tipo celular, corroborando com os dados observados neste estudo.

Estudos prévios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a bupivacaína é mais tóxica para células de cartilagem em relação à ropivacaína e lidocaína, porém nas células tronco mesenquimais a lidocaína apresentou uma maior citotoxicidade (Karpie & Chu *et al.*, 2007; Lo *et al.*, 2009). Essas variações podem estar relacionadas as diferentes propriedades físico-químicas das moléculas de anestésicos locais que podem interagir de maneira diferente com os diversos tipos celulares (Rahnama *et al.*, 2013).

A citotoxicidade da lidocaína é bem conhecida e tem sido verificada em diversos tipos celulares *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2013). Em neuroblastoma (SH-SY5Y) a exposição por 3h à lidocaína, em concentrações variando de 3 à 30 mM, causou um aumento da toxicidade dose dependente, com morte celular quase total na concentração de 30 mM (Friederich *et al.*, 2002). Este anestésico também induziu a morte celular dos neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, após 4 min de exposição na concentração de 14 mM (Gold *et al.*, 1998). Outros tipos celulares como condrócitos articulares e pré-adipócitos também tiveram sua viabilidade celular afetada pela lidocaína (Keck *et al.*, 2010; Jacobs *et al.*, 2011).

Neste estudo, a lidocaína nas concentrações testadas, pouco afetaram a viabilidade celular, uma vez que optou-se por concentrações menores e um maior tempo de exposição. Os resultados dos FGH corroboram com os observados por Oliveira *et al.* (2013), os quais expuseram fibroblastos orais da mucosa humana a diferentes concentrações de lidocaína em diferentes tempos, concluindo que a concentração do anestésico local demonstra ser mais importante que o tempo de incubação. Já nas células HaCaT o efeito da concentração de lidocaína variou em função do tempo.

A associação com carreadores foi capaz de impedir a perda da viabilidade celular observada na lidocaína livre 100 μ M após 24h nas células HaCaT. Sistemas de liberação controlada para anestésicos locais agem como reservatórios sendo

lentamente liberados, prevenindo o pico plasmático, o prolongamento da duração do bloqueio nervoso e reduzindo o risco de toxicidade sistêmica (de Paula *et al.*, 2010). Tais propriedades podem explicar os resultados de viabilidade celular, uma vez que os carreadores evitam uma exposição direta das células ao anestésico.

Os efeitos da bupivacaína sobre a viabilidade têm sido investigados nas células de Schwann, tenócitos, células neuronais e células endoteliais da córnea (Park *et al.*, 2011). No presente estudo, a bupivacaína foi mais agressiva na perda de viabilidade celular em comparação com a lidocaína, uma vez que a bupivacaína livre 10 μ M reduziu significativamente a viabilidade celular nas células HaCaT após 24 horas de exposição.

Esse dados corroboram com os observados por Maurice *et al.* (2010), onde a bupivacaína também exerceu um efeito mais citotóxico que a lidocaína sobre as células musculares de ratos. A ação da bupivacaína *in vitro* sobre as células neuronais humanas também foi mais tóxica quando comparada a outros anestésicos locais (Perez-Castro *et al.*, 2009).

Anestésicos locais mais hidrofóbicos como a bupivacaína e ropivacaína tendem a ser mais citotóxicos, uma vez que sofrem partição na porção lipídica da membrana, sendo esta uma condição para alcançarem os canais de sódio. Desta forma, é possível que a maior toxicidade destas moléculas anestésicas ocorra devido as interações com as membranas (Cereda *et al.*, 2012).

As formulações de bupivacaína lipossomais prejudicaram a viabilidade celular de forma mais acentuada nas primeiras 6h. Já as formulações em HP- β -CD potencializaram os efeitos citotóxicos da bupivacaína em ambos os tipos celulares ao longo do tempo. Os resultados observados nas formulações em HP- β -CD corroboram com o estudo de Cereda *et al.* (2006) que verificou uma redução no IC₅₀ da bupivacaína quando complexada em HP- β -CD em estudos *in vitro* de viabilidade celular sobre células de Schwann.

A citotoxicidade das ciclodextrinas tem sido atribuída a interação entre essas moléculas e a membrana celular, pois ao solubilizarem em contato com membranas celulares podem remover componentes da membrana como colesterol, fosfolípidios e proteínas, causando uma desestruturação e aumentando a permeabilização da membrana celular. (Irie *et al.*, 1997; Boulmedarat *et al.*, 2005; Matilainen *et al.*, 2007).

A HP- β -CD tem se mostrado um veículo bem tolerado em animais e humanos (Gould & Scott, 2005), mas estudos *in vitro* utilizando HP- β -CD demonstraram uma redução de 50% da viabilidade em células epiteliais basais alveolares (A549) com concentrações próximas a 56 mM de HP- β -CD. Já células epiteliais dos pulmões (Calu-3) exibiram uma sensibilidade maior a HP- β -CD tendo a viabilidade celular reduzida pela metade com 25 mM de HP- β -CD (Salem *et al.*, 2009). No presente estudo, utilizaram-se concentrações bastante reduzidas de HP- β -CD, que variaram de 1 à 100 μ M, em relação às concentrações capazes de causar citotoxicidade. Todavia, pode ter havido um efeito sinérgico entre a ação da HP- β -CD sobre as membranas celulares com o estresse causado pelo anestésico local.

As células expostas as formulações 100 μ M lipossomal apresentaram uma viabilidade celular elevada nos FGH após exposição à lidocaína, ropivacaína (24h) e nas células HaCaT na lidocaína e na bupivacaína após 24h. Este resultado pode ser reflexo de um efeito citoprotetor deste carreador ou, até mesmo, estimulante da proliferação celular.

A composição dos lipossomos que inclui colesterol, fosfatidilcolina de ovo e α -tocoferol. O α -tocoferol é um membro da família das vitaminas E que apresenta uma potente atividade antioxidante, além de ser capaz de estabilizar as membranas celulares (Lee *et al.*, 2006), podendo contribuir para uma maior resiliência das células ao estresse induzido pela exposição aos anestésicos locais.

Os anestésicos locais podem interagir com as membranas mitocondriais causando disfunções através do colapso do potencial da membrana mitocondrial, dissociação do consumo de oxigênio e interferência na fosforilação da adenosina difosfato (Friederich *et al.*, 2002). O α -tocoferol pode proteger a mitocôndria da perda de potencial e manter a atividade dos complexos mitocôndrias (Feng *et al.*, 2010), atenuando os efeitos adversos dos anestésicos locais sobre esta organela.

Muitos estudos tem demonstrado a indução da apoptose causada pelos anestésicos locais em neurônios, linfócitos e células osteoblasticas (Kim *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1999; Arita *et al.*, 2000), onde várias evidências tem apotando a indução da apoptose como um mecanismo de relevante papel na citotoxicidade induzida pelos anestésicos locais (Lu *et al.*, 2011).

Lee *et al* (2003) verificou que a lidocaína, bupivacaína e tetracaína induziram e potencializaram a apoptose em células humanas do túbulo proximal renal (HK-2) de maneira dose dependente. A lidocaína apresentou uma menor taxa de apoptose em comparação a bupivacaína e tetracaína. Em muitas situações a potência da indução da apoptose está relacionada a potência e toxicidade do anestésico local descrito *in vivo* (Liu *et al.*, 1982). Porém, em células humanas da musculatura lisa do trato respiratório, tratadas com os anestésicos anteriores, não demonstraram mudanças nas taxas de apoptose, sugerindo que a indução da apoptose pelos anestésicos locais também é um evento célula-específico (Lee *et al.*, 2003).

No presente estudo, nas concentrações testadas, os anestésicos locais não induziram alterações bruscas na taxa de apoptose, como ocorreu com o tratamento de staurosporina, mantendo valores próximos ao do grupo controle. No entanto, o tratamento com ropivacaína resultou em um aumento na taxa de apoptose em relação controle. Embora a ropivacaína lipossomal tenha reduzido a taxa de apoptose em relação à ropivacaína e ao controle, esta formulação induziu

a um aumento na taxa de necrose de aproximadamente cinco vezes, demonstrando um perfil de citotoxicidade diferente das formulações anteriores.

O tratamento com bupivacaína lipossomal apresentou uma maior taxa de apoptose e necrose em relação aos demais tratamentos de bupivacaína, demonstrando uma desvantagem da utilização deste carreador sobre o perfil de toxicidade da molécula desse anestésico local nas células HaCaT.

De maneira geral, nas células HaCaT houve pouca influência da concentração e do tempo nos resultados, sendo que estes parecem estar mais relacionados as propriedades intrínsecas dos anestésicos e dos carreadores. Nos FGH, as formulações lipossomais mostraram-se mais suscetíveis a mudanças de concentração, já as formulações em HP- β -CD em diversas situações foram tempo dependentes.

As formulações de bupivacaína e lidocaína apresentaram um padrão semelhante em relação a secreção das citocinas pró-inflamatórias tanto para FGH como para as células HaCaT. No entanto, não houve um padrão na modulação dos mediadores pro-inflamatórios entre os tipos celulares, após exposição às diferentes formulações de anestésicos locais. Houve uma tendência de redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias nas células HaCaT, porém os FGH apresentaram, com maior frequência, aumentos na liberação destes mediadores, sugerindo que a resposta inflamatória induzida pelas formulações de anestésicos locais estão diretamente relacionadas ao tipo celular.

Já a liberação de PGE₂ foi semelhante entre os tipos celulares, onde observou-se principalmente um aumento da liberação de PGE₂, sugerindo um efeito intrínseco das moléculas de anestésicos locais sobre este mediador.

Na viabilidade celular, a lidocaína induziu menor perda de viabilidade celular em relação a bupivacaína e ropivacaína. A ropivacaína apresentou um padrão

semelhante ao da bupivacaína nas células HaCaT, porém foi similar a lidocaína nos FGH. Não houve uma relação entre a viabilidade celular e liberação dos mediadores inflamatórios, demonstrando que a interferência dos anestésicos locais sobre a viabilidade celular não influenciou na liberação das citocinas e PGE₂.

7. CONCLUSÃO

Os efeitos modulatórios sobre mediadores inflamatórios, viabilidade celular e apoptose variaram em relação principalmente ao tipo celular empregado, molécula anestésica e ao carreador utilizado. O tempo de exposição e concentração foram fatores significativos apenas para alguns dos resultados observados.

A associação de anestésicos locais a carreadores demonstrou um potencial em deflagrar uma maior inflamação nos tecidos, uma vez que nas células HaCaT e FGH verificou-se uma maior suscetibilidade em liberar mediadores pró-inflamatórios após exposição a anestésicos locais encapsulados em lipossomos e complexados em HP- β -CD.

A secreção de PGE₂, de maneira geral, não foi modulada pela complexação aos carreadores, onde os resultados representam principalmente efeitos intrínsecos das moléculas de anestésicos locais sobre este mediador.

Os efeitos da associação a carreadores sobre a viabilidade celular variaram de acordo com o potencial citotóxico dos anestésicos locais, evitando a perda de viabilidade celular após exposição a lidocaína, porém aumentou a perda da viabilidade celular quando associados a anestésicos locais mais citotóxicos como bupivacaína e ropivacaína.

As formulações testadas apresentaram pouca variação em relação à taxa de indução da apoptose. Nos tratamentos utilizando bupivacaína, a formulação lipossomal foi a que apresentou uma maior taxa de apoptose. Nos tratamentos com ropivacaína, a menor taxa de apoptose observada na formulação lipossomal contrastou com um aumento no percentual de necrose.

REFERÊNCIAS*

- Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 1991; 32: 223-54.
- Arita K, Utsumi T, Kato A, Kanno T, Kobuchi H, Inoue B *et al.* Mechanism of dibucaine-induced apoptosis in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Biochem Pharmacol.* 2000; 60: 905–915.
- Beharka AA, Wu D, Serafini M, Meydani SN. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 503–511.
- Berto LA, Volpato MC, Ranali J, de Paula E, Groppo FC. Anesthetic efficacy of liposomal articaine formulation in rats. In 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2010. Barcelona, Spain.
- Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF: a primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 625-55.
- Boogaerts J, Declercq A, Lafont N, Benameur H, Akodad EM, Dupont JC *et al.* Toxicity of bupivacaine encapsulated into liposomes and injected intravenously: comparison with plain solutions. *Anesth Analg.* 1993; 76(3): 553-5.
- Boogaerts JG, Lafont ND, Declerca AG, Hongwen CL, Gravet ET; Bianchi JÁ *et al.* Epidural administration of liposome-associated bupivacaine for the management of postsurgical pain: a first study. *J Clin Anesth.* 1994; 6: 315-320.
- Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(2 Suppl): S460-75.
- Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L *et al.* The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg.* 2003; 96: 755–6.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *Journal of Cell Biology.* 1988; 106: 761-771.
- Boulmedarat L, Bochot A, Lesieur S, Fattal E. Evaluation of buccal methyl-beta-cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *J Pharm Sci.* 2005; 94(6): 1300-9.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura de periódicos conforme o Medline.

Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 1995; 10: 267(5203): 1485-8.

Bucalo BD, Mirikitani EJ, Moy RL. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30- minute application time. *Dermatol Surg*. 1998; 24(5): 537-41.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1999; 15: 269–90.

Bucalo BD, Mirikitani EJ, Moy RL. Comparison of skin anesthetic effect of liposomal lidocaine, nonliposomal lidocaine, and EMLA using 30-minute application time. *Dermatol Surg*. 1998; 24(5):537-41.

Butterworth, JF 4th, Strichartz, GR. Molecular mechanisms of local anesthesia: a review. *Anesthesiology*. 1990; 72 (4): 711-734.

Carvalho B, Clark DJ, Yeomans DC, Angst MS. Continuous subcutaneous instillation of bupivacaine compared to saline reduces interleukin 10 and increases substance P in surgical wounds after cesarean delivery. *Anesth Analg*. 2010; 111(6): 1452-9.

Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006; 50: 265–82.

Cereda CM, de Araújo DR, Brunetto GB, de Paula E. Liposomal prilocaine: preparation, characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2004; 7: 235-240.

Cereda CM, Brunetto GB, de Araújo DR, de Paula E. Liposomal formulations of prilocaine, lidocaine and mepivacaine prolong analgesic duration. *Can J Anaesth*. 2006; 53(11):1092-7.

Cereda CM, Tofoli GR, Maturana LG, Pierucci A, Nunes LA, Franz-Montan M, de Oliveira AL, Arana S, de Araujo DR, de Paula E. Local neurotoxicity and myotoxicity evaluation of cyclodextrin complexes of bupivacaine and ropivacaine. *Anesth Analg*. 2012; 115(5): 1234-41.

Choudhary M, Ahlawat RS. Interleukin-6 and C-Reactive Protein in pathogenesis of diabetic nephropathy: new evidence linking inflammation, glycemic control, and microalbuminuria. *Iran J Kidney Dis*. 2008; 2(2): 72-79.

Chen CH, Lin YL, Liu YK, He PJ, Lin CM, Chiu YH *et al*. Liposome-based polymer complex as a novel adjuvant: enhancement of specific antibody production and isotype switch. *Int J Nanomedicine*. 2012; 7: 607-21.

- Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997; 326:1–16.
- Courtney K, Strichartz G. Structural elements which determine local anesthetic activity. In: Strichartz GR ed. *Local Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 81. Springer-Verlag: Berlin; 1987. p. 53-94.
- D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010; 17(7): 1104-14.
- Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3(12): 1023-35.
- Demichele C, Rocha OGF, Schettini DA, Frézard F. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quím Nova.* 2005; 28: 511-518.
- de Araújo DR, Pinto LM, Braga AF, de Paula E. Drug delivery systems for local anaesthetics: therapeutic applications (Portuguese). *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53: 663–71.
- de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Pinto LM, Santana H, de Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. *Can J Anesth.* 2004; 51: 566-572.
- de Araújo DR. Desenvolvimento e avaliação farmacológica de formulações de liberação controlada com anestésicos locais amino-aminas cíclicos: bupivacaína, mepivacaína e ropivacaína [tese]. Campinas: UNICAMP/IB; 2005.
- de Araújo DR, Fraceto LF, Braga AFA, de Paula E. Sistemas de Liberação Controlada com Bupivacaína Racêmica (S50-R50) e Mistura Enantiomérica de Bupivacaína (S75-R25): Efeitos da Complexação com Ciclodextrinas no Bloqueio do Nervo Ciático em Camundongos. *Rev Bras Anesthesiol.* 2005; 55 (3): 316 – 328.
- de Araújo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LF, de Paula E. Mistura com Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) de Bupivacaína Complexada com Ciclodextrinas e Anestesia por Via Subaracnóidea em Ratos. *Rev Bras Anesthesiol.* 2006; 56(5): 495-506.
- de Araújo DR, Tsuneda SS, Cereda CM, Carvalho FGF, Preté PSC, Fernandes AS *et al.* Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Eur J Pharm Sci.* 2008; 33: 60-71.
- de Araújo DR, Cereda CM, Brunetto GB, Vomero VB, Pierucci A, Neto HS *et al.* Pharmacological and local toxicity studies of a liposomal formulation for the novel local anaesthetic ropivacaine. *J Pharm Ppharmacology.* 2008; 60: 1-10.

De Iuliis A, Zanatta L, Vincenti E, Galzigna L. Differences of ropivacaine and bupivacaine relevant to antiinflammatory activity, platelet aggregation and antioxidant activity in vitro. *Farmaco*. 2001; 56: 153–7.

de Klaver MJ, Buckingham MG, Rich GF. Lidocaine attenuates cytokine-induced cell injury in endothelial and Local anesthetics and inflammation vascular smooth muscle cells. *Anesth Analg*. 2003; 97: 465–70.

de Paula E, Shreier, S. Molecular and physico chemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 877-894.

de Paula E, Cereda CM, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, de Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2010; 4(1): 23-34.

Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. I. Physicochemical characterization. *Int J Pharm*. 1996; 131: 165-174.

Dollo G, Thompson DO, Le Corre P, Chevanne, F, Le Verge R. Inclusion complexation of amide-typed local anesthetics with β -cyclodextrin and its derivatives. III. Biopharmaceutics of bupivacaine-SBE7- β -CD complex following percutaneous sciatic nerve administration in rabbits. *Int J Pharm* 1998; 164: 11-19.

Dollo G, Le Corre P, Freville JC, Chevanne F, Le Verge R. Biopharmaceutics of local anesthetic-cyclodextrin complexes following loco-regional administration. *Ann Pharm Fr*. 2000; 58: 425-432.

Downing JW, Johnson HV, Gonzalez HF, Arney TL, Herman NL, Johnson RF. The pharmacokinetics of epidural lidocaine and bupivacaine during cesarean section. *Anesth Analg*. 1997; 84(3): 527–32.

Dragoo JL, Korotkova T, Wood B, The effect of local anesthetics administered via pain pump on chondrocyte viability. *Am J Sports Med*. 2008; 36: 1484-1488.

Duchêne D, Wouessidjewe D. The current state of β -cyclodextrin in pharmaceuticals. *Acta Pharm Technol*. 1990; 36: 1-6.

Epstein-Barash H, Shichor I, Kwonb AH, Hallc S, Lawlord MW, Langer B *et al*. Prolonged duration local anesthesia with minimal toxicity. *PNAS* 2009; 106:7125-7130.

Estebe JP, Ecoffey C, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Bupivacaine pharmacokinetics and motor blockade following epidural administration of the bupivacaine-sulfobutylether-7-beta-cyclodextrin complex in sheep. *Eur J Anaesthesiol*. 2002; 19: 308–310.

Feng G, Liu S, Wang GL, Liu GJ. Lidocaine attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibiting NF-kappaB activation. *Pharmacology*. 2008; 81(1): 32-40.

Feng Z, Liu Z, Li X, Jia H, Sun L, Tian C. α -Tocopherol is an effective Phase II enzyme inducer: protective effects on acrolein-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human retinal pigment epithelial cells. *J Nutr Biochem*. 2010; 21(12): 1222-31.

Fraceto LF, de Araújo DR, de Paula, E. Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. *Quim Nova*. 2008; 31(7): 1775-1783.

Franz-Montan M, Silva AL, Cogo K, Bergamaschi CC, Volpato MC, Ranali J, de Paula E, Groppo FC. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesth Analg*. 2007; 104(6): 1528-31.

Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva AL, Ranali J, Volpato MC. Liposome-encapsulated ropivacaine for intraoral topical anesthesia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110(6): 800-4.

Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectin. *Cell*. 1996; 84: 563-574.

Freville JC, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaine following epidural administration of bupivacaine-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Pharm. Res*. 1996; 13: 1576-1580.

Friederich P, Schmitz TP. Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol*. 2002; 19(8): 564-70.

Finn A, Naik S, Klein N, Levinsky RJ, Strobel S, Elliott M. Interleukin-8 release and neutrophil degranulation after pediatric cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1993; 105(2): 234-241.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001; 294: 1871-5.

García A, De Sanctis JB. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *APMIS*. 2013. Aug 6. [Epub ahead of print].

Gesztes A, Mezei M. Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. *Anesth Analg* 1988; 67: 1079-1081.

Girard AC, Atlan M, Bencharif K, Gunasekaran MK, Delarue P, Hulard O *et al.* New insights into lidocaine and adrenaline effects on human adipose stem cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2013; 37(1): 144-52.

Gold MS, Reichling DB, Hampl KF, Drasner K, Levine JD. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 285:413–21.

Gomoll AH, Kang RW, Williams JM, Bach BR, Cole BJ. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy.* 2006; 22(8): 813-819.

Gordon SM, Chuang BP, Wang XM, Hamza MA, Rowan JS, Brahim JS *et al.* The differential effects of bupivacaine and lidocaine on prostaglandin E2 release, cyclooxygenase gene expression and pain in a clinical pain model. *Anesth Analg.* 2008;106(1):321-7.

Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 1451–9.

Goyal P, Goyal K, Vijaya Kumar SG, Singh A, Katare OP, Mishra DN. Liposomal drug delivery systems clinical applications. *Acta Pharm.* 2005; 55(1): 1-25.

Grant GJ, Bansinath M. Liposomal delivery systems for local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med.* 2001; 26: 61-63.

Grant AS. The holy grail: long-acting local anesthetics and liposomes. *Best Pract Res Clin Anesthesiol.* 2002; 16: 345-352.

Grant GJ, Barenholz Y, Bolotin E, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B, Davidson EM. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology.* 2004; 100(1): 133-137.

Gregoriadis G, Gursel I, Gursel M, McCormack B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J Controlled Release.* 1996; 41(1–2): 49–56.

Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW 4th. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92(3): 609-18.

Grislain L, Couvreur P, Lenaerts V, Roland MD. Depreg-Decampeneere and P. Speiser. Pharmacokinetics and distribution of a biodegradable drug-carrier. *Int J Pharmacol.* 1983; 15: 335–338.

Haasters F, Polzer H, Prall WC, Saller MM, Kohler J, Grote S, Mutschler W, Docheva D, Schieker M. Bupivacaine, ropivacaine, and morphine: comparison of toxicity on

human hamstring-derived stem/progenitor cells. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011; 19(12): 2138-44.

Hansen BP, Beck CL, Beck EP, Townsley RW. Postarthroscopic glenohumeral chondrolysis. *Am J Sports Med.* 2007; 35(10): 1628-34.

Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002; 23(3): 144-50.

Hawwa RL, Hokenson MA, Wang Y, Huang Z, Sharma S, Sanchez-Esteban J. IL-10 inhibits inflammatory cytokines released by fetal mouse lung fibroblasts exposed to mechanical stretch. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(7):640-9.

Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature.* 1993; 365(6442): 182-5.

Henriksen-Lacey M, Korsholm KS, Andersen P, Perrie Y, Christensen D. Liposomal vaccine delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011; 8(4): 505–19.

Herlaar E, Brown Z. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today.* 1999; 5(10): 439-47.

Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000; 93(3): 858-75.

Hönemann CW, Heyse TJ, Möllhoff T, Hahnenkamp K, Berning S, Hinder F *et al.* The inhibitory effect of bupivacaine on prostaglandin E(2) (EP(1)) receptor functioning: mechanism of action. *Anesth Analg.* 2001; 93: 628–34.

Huang YH, Tsai PS, Huang CJ. Bupivacaine inhibits COX-2 expression, PGE₂, and cytokine production in endotoxin-activated macrophages. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2008; 52(4): 530-5.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86 (2): 147–162.

Jacobs TF, Vansintjan PS, Roels N, Herregods SS, Verbruggen G, Herregods LL *et al.* The effect of Lidocaine on the viability of cultivated mature human cartilage cells: an in vitro study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011; 19(7): 1206-13.

Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames, BN. Gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alphatocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 11494–11499.

Johnson ME, Saenz JA, DaSilva AD, Uhl CB, Gores GJ. Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. *Anesthesiology*. 2002; 97: 1466–76

Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. *J Immunol*. 2012; 188(1): 21-8.

Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res*. 2005; 26: 231– 239.

Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. *Am J Sports Med*. 2007; 35(10):1621-7.

Keck M, Zeyda M, Gollinger K, Burjak S, Kamolz LP, Frey M *et al*. Local anesthetics have a major impact on viability of preadipocytes and their differentiation into adipocytes. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 126(5): 1500-5.

Kim M, Lee YS, Mathews HL, Wurster RD. Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine. *Exp Cell Res*. 1997; 231: 235–241.

Kimi H, Yamashiro M, Hashimoto S. The local pharmacokinetics of ³H-ropivacaine and ¹⁴C-lidocaine after maxillary infiltration anesthesia in rats. *Anesth Prog*. 2012; 59(2): 75-81.

Kohane DS, Yieh J, Lu NT, Langer R, Strichartz GR, Berde CB: A reexamination of tetrodotoxin for prolonged duration local anesthesia. *Anesthesiology*. 1998; 89: 119–31.

Kraychete DC, Calasans, MTA, Valente, CML. Pro-inflammatory cytokines and pain. *Rev Bras Reumatol*. 2006; 46: 199-206.

Kroin JS, Buvanendran A, Watts DE, Saha C, Tuman KJ. Upregulation of cerebrospinal fluid and peripheral prostaglandin E₂ in a rat postoperative pain model. *Anesth Analg*. 2006; 103: 334-43.

Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins e Cotran. *Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 7rd ed. Elsevier Editora Ltda, RJ- Brasil, 2005.

Kuo, CP, Jao, SW, Chen, KM, Wong, CS, Yeh, CC, Sheen, MJ, Wu, CT. Comparison of the effects of thoracic epidural analgesia and i.v. infusion with lidocaine on cytokine response, postoperative pain and bowel function in patients undergoing colonic surgery. *British Journal of Anaesthesia*. 2006; 97 (5): 640–6.

Kuzma PJ, Kline MD, Calkins MD, Staats PS. Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. *Reg Anesth*. 1997; 22: 543–51.

Lahav M, Levite M, Bassani L, Lang A, Fidler H, Tal R *et al.* Lidocaine inhibits secretion of IL-8 and IL-1 β and stimulates secretion of IL-1 receptor antagonist by epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 2002; 127: 226–233.

Lan W, Petznick A, Heryati S, Rifada M, Tong L. Nuclear Factor- κ B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases. *Ocul Surf.* 2012; 10(3): 137-48.

Lang A, Ben Horin S, Picard O, Fudim E, Amariglio N, Chowers Y. Lidocaine inhibits epithelial chemokine secretion via inhibition of nuclear factor kappa β activation. *Immunobiology.* 2010; 215(4): 304-13.

Lee HT, Xu H, Siegel CD, Krichevsky IE. Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. *Am J Nephrol.* 2003;23(3): 129-39.

Lee E, Choi MK, Lee YJ, Ku JL, Kim KH, Choi JS *et al.* Alpha-tocopheryl succinate, in contrast to alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate, inhibits prostaglandin E₂ production in human lung epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2006; 27(11): 2308-15.

Legler DF, Bruckner M, Uetz-von Allmen E, Krause P. Prostaglandin E₂ at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(2): 198-201.

Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, *et al.* Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 1995; 80(3): 401±411.

Licinio J. Central nervous system cytokines and their relevance for neurotoxicity. *J Neural Transm.* 1997; 49(Suppl.): 169-175.

Lian T, Ho RJ. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharm Sci.* 2001; 90(6): 667-80.

Liu P, Feldman HS, Covino BM, Giasi R, Covino BG. Acute cardiovascular toxicity of intravenous amide local anesthetics in anesthetized ventilated dogs. *Anesth Analg.* 1982; 61: 317–322.

Lo IK, Sciore P, Chung M, Liang S, Boorman RB, Thornton GM *et al.* Local anesthetics induce chondrocyte death in bovine articular cartilage disks in a dose- and duration-dependent manner. *Arthroscopy.* 2009; 25(7):707-15.

Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm.* 2001; 225: 15-30.

Loftsson T, Duchêne D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2007; 329: 1-11.

Lu J, Xu SY, Zhang QG, Xu R, Lei HY. Bupivacaine induces apoptosis via mitochondria and p38 MAPK dependent pathways. *Eur J Pharmacol.* 2011; 657(1-3): 51-8.

Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunol.* 2001; 2: 102-107.

Martin DS, Lonergan PE, Boland B, Fogarty MP, Brady M, Horrobin DF *et al.* Apoptotic changes in the aged brain are triggered by interleukin-1beta-induced activation of p38 and reversed by treatment with eicosapentaenoic acid. *J Biol Chem.* 2002; 277: 34239–34246.

Matilainen L, Toropainen T, Vihola H, Hirvonen J, Järvinen T, Jarho P *et al.* In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells. *J Control Release.* 2008; 126(1): 10-6.

Martinsson T, Oda T, Fernvik E, Roempke K, Dalsgaard CJ, Svensjö E. Ropivacaine inhibits leukocyte rolling, adhesion and CD11b/CD18 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 283(1): 59-65.

Maurice JM, Gan Y, Ma FX, Chang YC, Hibner M, Huang Y. Bupivacaine causes cytotoxicity in mouse C2C12 myoblast cells: involvement of ERK and Akt signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin.* 2010; 31(4): 493-500.

Mashimo T, Uchida I, Pak M, Shibata A, Nishimura S, Inagaki Y *et al.* Prolongation of canine epidural anesthesia by liposome encapsulation of lidocaine. *Anesth Analg.* 1992; 74(6):827-34.

McLure HA, Rubin AP. Review of local anesthetics agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005; 71: 59-74.

Mena MÁ, Perucho J, Rubio I, de Yébenes JG. Studies in animal models of the effects of anesthetics on behavior, biochemistry, and neuronal cell death. *J Alzheimers Dis.* 2010; 22(3): 43-8.

Moraes C, Abrami P, Araujo D, Braga A, Issa M, Ferraz H, Paula E *et al.* Characterization of lidocaine:hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2007; 57(4): 313-316.

Nakamura K, Kido H, Morimoto Y, Morimoto H, Kobayashi S, Morikawa M, Haneji T. Prilocaine induces apoptosis in osteoblastic cells. *Can J Anaesth* 1999; 46: 476–482.

Nau C, Wang GK. Interactions of local anesthetics with voltage-gated Na⁺ channels. *J Membr Biol*. 2004; 201(1): 1-8.

Nishida E, Gotoh Y. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem Sci*. 1993; 18: 128–31.

Oliveira AC, Rodríguez IA, Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez CA, García JM *et al*. An early and late cytotoxicity evaluation of lidocaine on human oral mucosa fibroblasts. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Oct 16. [Epub ahead of print].

Oppenheim J, Zachariae C, Mukaida M, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory super gene "intercrine" cytokine family. *Ann. Rev. Immuno*. 1991; 9: 617-648.

Pan J, Chang Q, Wang X, Son Y, Zhang Z, Chen G, *et al*. Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23: 568–577.

Park CJ, Park SA, Yoon TG, Lee SJ, Yum KW, Kim HJ. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res*. 2005; 84: 852–857.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E₂ synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. *Clin. Immunol*. 2006; 119: 229–240.

Pastore S, Shivji GM, Kondo S, Kono T, McKenzie RC, Segal L *et al*. Effects of contact sensitizers neomycin sulfate, benzocaine and 2,4-dinitrobenzene 1-sulfonate, sodium salt on viability, membrane integrity and IL-1 alpha mRNA expression of cultured normal human keratinocytes. *Food Chem. Toxicol*. 1995; 33(1): 57-68.

Peck SL, Johnston RB, Horwitz LD. Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusion of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985; 235: 418–22.

Penninger JM, Kroemer G. Mitochondria, AIF and caspases: Rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol*. 2003; 5: 97–9.

Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhan J *et al*. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg*. 2009; 108(3): 997-1007.

Pinto, LM. Spectroscopic evidence for a preferential location of lidocaine inside phospholipid bilayers. *Biophys Chem*. 2002; 6(99): 229-43.

Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am*. 2008; 90: 986–991.

Ranade VV. Drug delivery systems. Site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J Clin Pharmacol*. 1989; 29: 685-94.

Ravid A, Rubinstein E, Gamady A, Rotem C, Liberman UA, Koren R. Vitamin D inhibits the activation of stress-activated protein kinases by physiological and environmental stresses in keratinocytes. *Journal of Endocrinology*. 2002; 173: 525-532.

Richard BM, Ott LR, Haan D, Brubaker AN, Cole PI, Nelson KG *et al*. The safety and tolerability evaluation of DepoFoam bupivacaine (bupivacaine extended-release liposome injection) administered by incision wound infiltration in rabbits and dogs. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011; 20(10): 1327-41.

Rahnama R, Wang M, Dang AC, Kim HT, Kuo AC. Cytotoxicity of local anesthetics on human mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Am*. 2013 16; 95(2): 132-7.

Salem LB, Bosquillon C, Dailey LA, Delattre L, Martin GP, Evrard B *et al*. Sparing methylation of beta-cyclodextrin mitigates cytotoxicity and permeability induction in respiratory epithelial cell layers in vitro. *J Control Release*. 2009; 136(2): 110-6.

Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, Billet S, Allchorne A, Poole S *et al*. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*. 2001; 410: 471-5.

Sambrook PJ, Goss AN. Severe adverse reactions to dental local anaesthetics: prolonged mandibular and lingual nerve anaesthesia. *Aust Dent J*. 2011; 56(2): 154-9.

Schonfeld-Dado E, Segal M. Activity-dependent survival of neurons in culture: a model of slow neurodegeneration. *J Neural Transm*. 2009; 116(11): 1363-9.

Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1997; 78(2): 201-19.

Sinclair R, Eriksson AS, Gretzer C, Cassuto J, Thomsen P. Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB4 release and IL-1 secretion in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1993; 37(2): 159-65.

Srivastava SK, Ramana KV. Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. *Exp Eye Res*. 2009; 88(1): 2-3.

Strasser A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 189-200.

Strichartz G, Ritchie J. The action of local anesthetics on ion channels of excitable tissues. In: Strichartz G ed. *Local Anesthetics: Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 81. Springer-Verlag, Berlin, 1987, p.21-53.

Sun X, Garlid KD. On the mechanism by which bupivacaine conducts protons across the membranes of mitochondria and liposomes. *J Biol Chem.* 1992; 267: 19147–54.

Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* 2002; 54, 101-127.

Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996; 40: 318–25.

Tan Z, Dohi S, Chen J, Banno Y, Nozawa Y. Involvement of the mitogenactivated protein kinase family in tetracaine-induced PC12 cell death. *Anesthesiology.* 2002; 96: 1191–1201.

Taniguchi T, Shibata K, Yamamoto K, Mizukoshi Y, Kobayashi T. Effects of lidocaine administration on hemodynamics and cytokine responses to endotoxemia in rabbits. *Crit Care Med.* 2000; 28(3): 755-9.

Terada H, Shima O, Yoshida K, Shinohara Y. Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H⁺ in cooperation with hydrophobic anions. *J Biol Chem.* 1990; 265: 7837–7842.

Tischner D, Woess C, Ottina E, Villunger A. Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity. *Cell Death Dis.* 2010; 3: 1-48.

Tofoli GR, Cereda CM, de Araujo DR, Brito RB Jr, Pedrazzoli J Jr, Meurer E, Barros FA *et al.* Pharmacokinetic and local toxicity studies of liposome-encapsulated and plain mepivacaine solutions in rats. *Drug Deliv* 2010; 17(2): 68–76.

Tökés ZA, Kulcsar St. Peteri A, Todd JA. Availability of liposome content to the nervous system. *Liposomes and the blood-brain barrier.* *Brain Res.* 1980; 188(1): 282-6.

Umbrain V, Shi L, Lauwers MH, Smolders I, Michotte Y, Camu F. Intrathecal lidocaine elevates prostaglandin E₂ levels in cerebrospinal fluid: a microdialysis study in freely moving rats. *Br J Anaesth.* 2008; 101(5): 716-22.

Umbrain VJ, Lauwers MH, Shi L, Smolders I, Michotte Y, Poelaert J. Comparison of the effects of intrathecal administration of levobupivacaine and lidocaine on the prostaglandin E₂ and glutamate increases in cerebrospinal fluid: a microdialysis study in freely moving rats. *Br J Anaesth.* 2009; 102(4): 540-5.

Venturini CG, Nicolini J, Machado C, Machado VG. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quim. Nova.* 2008; 31 (2): 360-368.

Voelkel-Johnson C. Death receptors in cancer therapy: Sensitizing Tumor Cells by Targeting Death Receptor Signaling Inhibitor. *Cancer Drug Discovery and Development*. 2005; 305-321.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995; 270: 1326–1331.

Xu F, Zhang J, Recio-Pinto E, Blanck TJ. Halothane and isoflurane augment depolarization-induced cytosolic CA^{2+} transients and attenuate carbachol-stimulated CA^{2+} transients. *Anesthesiology*. 2000; 92: 1746–56.

Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*, 4th ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1998.

Yamaguchi T, Mizushima Y. Lipid microspheres for drug delivery from the pharmaceutical viewpoint. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1994; 11(4): 215-29.

Yarov-Yarovoy V, McPhee JC, Idsvoog D, Pate C, Scheuer T, Catterall WA. Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the sodium channel α subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J Biol Chem*. 2002, 277(38): 35393-401.

Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P *et al*. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta 2. *J. Neurosci*. 2003; 23: 7577–7585.

Yu Y, K Chadee. Prostaglandin E2 stimulates IL-8 gene expression in human colonic epithelial cells by a posttranscriptional mechanism. *J. Immunol*. 1998; 161: 3746–3752.

Wang HL, Zhang WH, Lei WF, Zhou CQ, Ye T. The inhibitory effect of lidocaine on the release of high mobility group box 1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Anesth Analg*. 2011; 112(4): 839-44.

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of proinflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*. 1995; 63: 289–302.

Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*. 2012; 30(13): 2256-72.

Weinreb M, Machwate M, Shir N, Abramovitz M, Rodan GA, Harada S. Expression of the prostaglandin E(2) [PGE(2)] receptor subtype EP(4) and its regulation by PGE(2) in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue. *Bone*. 2001; 28(3): 275–281.

Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P *et al.* Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology*. 2007; 107(1): 136-43.

Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, Hermanns H, Essmann F, Hollmann MW *et al.* Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth*. 2009; 103(5): 711-8.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980; 68: 251–306.

Zhang XW, Thorlacius H. Inhibitory actions of ropivacaine on tumor necrosis factor- α -induced leukocyte adhesion and tissue accumulation *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol*. 2000; 24: 1-3.

Zhou Y, Wang Q, Mark Evers B, Chung DH. Oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis is mediated by p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 350: 860–865.

Zink W, Graf B. Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med*. 2004; 29 (4): 330-340.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. 2000; 192: 1001–1014.