

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

**LETÍCIA ANTONELO CAMPOS**

**LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA: POTENCIAL INTERVENÇÃO  
FARMACOLÓGICA NA INFLAMAÇÃO E PERDA ÓSSEA ALVEOLAR  
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

**PONTA GROSSA**

**2014**

**LETÍCIA ANTONELO CAMPOS**

**LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA: POTENCIAL INTERVENÇÃO  
FARMACOLÓGICA NA INFLAMAÇÃO E PERDA ÓSSEA ALVEOLAR  
INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Clínica Integrada - Terapêutica Clínica Aplicada à Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos

**PONTA GROSSA**

**2014**

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

C198 Campos, Letícia Antonelo  
Lipossomas de fosfatidilserina:  
potencial intervenção farmacológica na  
inflamação e perda óssea alveolar induzida  
por ligadura em ratos/ Letícia Antonelo  
Campos. Ponta Grossa, 2014.  
60f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia -  
Área de Concentração: Clínica Integrada),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio André  
dos Santos.

1.Agente anti-inflamatório.  
2.Lipossoma. 3.Fosfatidilserina.  
4.Inflamação. 5.Perda óssea alveolar.  
I.Fernandes, Daniel. II. Santos, Fábio  
André dos. III. Universidade Estadual de  
Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV.  
T.

CDD: 617.6

**LETÍCIA ANTONELO CAMPOS**

**LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA: POTENCIAL INTERVENÇÃO  
FARMACOLÓGICA NA INFLAMAÇÃO E PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA POR  
LIGADURA EM RATOS**

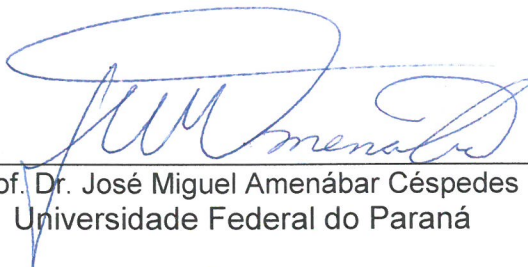
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada – Terapêutica aplicada à odontologia.

Ponta Grossa, 27 de fevereiro de 2014.



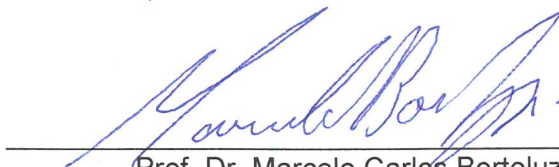
---

Prof. Dr. Fábio André dos Santos  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



---

Prof. Dr. José Miguel Amenábar Céspedes  
Universidade Federal do Paraná



---

Prof. Dr. Marcelo Carlos Bortoluzzi  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho ao meu pai Maurício,  
à minha mãe Margareth e às minhas irmãs  
Larissa e Daniele, por serem minha  
base e meu ponto de equilíbrio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus por sempre me proporcionar caminhos e me orientar em minhas escolhas, dono de todo conhecimento e sabedoria.

À minha família pelo apoio e amor.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), na pessoa do seu Reitor, Luciano Vargas.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Osnara Mongruel Gomes, Coordenadora da Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante o curso e para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Fernandes, pela orientação competente, por todos os ensinamentos e pela dedicação na minha formação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fábio André dos Santos, pela orientação, dedicação e auxílio na elaboração da minha dissertação. Grata por todas as oportunidades e por todos os ensinamentos.

À Prof. Dra. Márcia Thaís Pochapski, ao todo apoio e oportunidades de aprendizagem.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Aos servidores do Departamento de Odontologia.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Fárago pelo tempo e disposição para ensinar a manipulação do gel lipossomal.

Ao Prof. Dr. Gilson Franco por colaboração no trabalho.

Ao Prof. Michel Otuki e sua aluna Camila Guimarães pelo auxílio e colaboração no trabalho.

Ao Prof. José Carlos Rebuglio Velloso pela ajuda na verificação do perfil lipídico.

Ao Laboratório Escola – UEPG.

Aos colegas de mestrado.

Fundamentais no início da aprendizagem dos experimentos Reila Tainá Mendes e Luiz Renato Olchanheski Junior.

Às funcionárias do biotério Maria e Marilene.

Aos meus familiares e amigos.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada à todos.

## **DADOS CURRICULARES**

### **LETÍCIA ANTONELLO CAMPOS**

NASCIMENTO 16.08.1989

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

FILIAÇÃO

Maurício Campos

Margareth Antonelo Campos

2007-2011

Curso de Graduação em  
Odontologia - Universidade  
Estadual de Ponta Grossa -  
UEPG

2012-2014

Mestrado em Odontologia na área  
de concentração Clínica  
Integrada – Universidade  
Estadual de Ponta Grossa -  
UEPG



## RESUMO

O acúmulo de biofilme na região subgengival produz um processo inflamatório que pode conduzir à reabsorção óssea e perda de inserção, devido mediadores inflamatórios que induzem a produção e ativação de enzimas e degradação dos tecidos periodontais. Lipossomas de fosfatidilserina mimetizam o efeito de células apoptóticas podendo modular a resposta inflamatória do hospedeiro. Este estudo avaliou o efeito do tratamento com lipossomas de fosfatidilserina sobre a reposta inflamatória e perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. Utilizamos uma preparação de solução de lipossomas de fosfatidilserina avaliando a citotoxicidade em uma linhagem de células osteoblásticas. Avaliamos a ação anti-inflamatória por meio dos métodos de edema de orelha em camundongos (aplicação tópica) e edema de pata em ratos (aplicação sistêmica). Em seguida, avaliamos a ação de lipossomas de fosfatidilserina na resposta inflamatória gengival e perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. Os resultados mostraram que as concentrações de 50 e 250  $\mu\text{M}$  dos lipossomas de fosfatidilserina foram seguras, considerando a viabilidade e proliferação celular. O gel lipossomal de fosfatidilserina (aplicação tópica) não teve ação anti-inflamatória no modelo de edema de orelha em camundongo nem na perda óssea induzida por ligadura em ratos. A solução de lipossomas de fosfatidilserina (aplicação sistêmica) teve ação anti-inflamatória no modelo de edema de pata em ratos. Porém, não observamos efeito na perda óssea induzida por ligadura. Pode-se concluir que o gel e a solução de lipossomas de fosfatidilserina são de fácil preparo e de baixo custo. Lipossomas de fosfatidilserina em solução (aplicação sistêmica) possui efeito anti-inflamatório no modelo edema de pata em ratos. Por outro lado, não interferiu na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos.

**Palavras-chave:** agente anti-inflamatório, lipossoma, fosfatidilserina, inflamação, perda óssea alveolar

## ABSTRACT

The biofilm accumulation in the subgingival region produces an inflammatory process that can lead to alveolar bone resorption and periodontal attached loss through due inflammatory mediators that induce the production and activation of enzymes and periodontal degradation tissues. Phosphatidylserine liposomes can mimic apoptotic cells effects and may modulate the host inflammatory response. This present study evaluated the effect of phosphatidylserine liposomes on the inflammatory response and alveolar bone loss ligature-induced in rats. We used a phosphatidylserine liposome solution preparation in order to evaluate the cytotoxicity in lineage osteoblastic cells. The anti-inflammatory effect was evaluated by mouse ear edema (topical application) and rat paw edema (systemic application) methods. Then, we evaluated the phosphatidylserine liposome action on gingival inflammatory response and alveolar bone loss ligature-induced in rats. The results showed phosphatidylserine liposome 50 and 250  $\mu\text{M}$  concentrations were safer considering cell viability and proliferation. The phosphatidylserine liposome gel (topical application) had no anti-inflammatory action on mouse ear edema model and alveolar bone loss ligature-induced in rats. The phosphatidylserine liposome solution (systemic application) has anti-inflammatory action on rat paw edema. Although, we did not observe an effect on alveolar bone loss ligature-induced. We conclude phosphatidylserine liposome gel and solution are easy to prepare and they have low cost. Phosphatidylserine liposoma solution (systemic application) have antiinflammatory effect on rat paw edema model. On the other hand, it have no effect on alveolar bone loss ligature-induced in rat.

**Key-words:** anti-Inflammatory agent, liposome, phosphatidylserine, Inflammation, alveolar bone loss

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Papel da fagocitose na inflamação - - - - -                                                                                                                                                                    | 23 |
| Figura 2: Interações de fagócitos na inflamação - - - - -                                                                                                                                                                | 24 |
| Figura 3: Layout de Placa – Ensaio de Proliferação celular - - - - -                                                                                                                                                     | 32 |
| Figura 4: Protocolo experimental – Avaliação do potencial anti-inflamatório do lipossomal de PS pelo modelo edema de pata - - - - -                                                                                      | 34 |
| Figura 5. Periodontite induzida por ligaduras - - - - -                                                                                                                                                                  | 35 |
| Figura 6. Protocolo Experimental – Aplicação local de gel lipossomal de fosfatidilserina- - - - -                                                                                                                        | 36 |
| Figura 7. Protocolo experimental – Aplicação da solução de lipossomas de fosfatidilserina-- - - - - -                                                                                                                    | 37 |
| Figura 8. Mensuração da perda óssea alveolar (mm) - - - - -                                                                                                                                                              | 38 |
| Figura 9. Representando a viabilidade celular em diferentes concentrações de fosfatidilserina- - - - -                                                                                                                   | 40 |
| Figura 10. Representando a proliferação celular (crescimento) em diferentes concentrações de fosfatidilserina- - - - -                                                                                                   | 41 |
| Figura 11. Representando a proliferação celular (redução do crescimento) em diferentes concentrações de fosfatidilserina- - - - -                                                                                        | 42 |
| Figura 12. Valores da variação ( $\Delta$ ) do edema de orelha com a aplicação do gel lipossomal de fosfatidilserina após de 6 h e 24 h do estímulo com TPA- - - - -                                                     | 42 |
| Figura 13. Peso da orelha (mg) com a aplicação do gel lipossomal de fosfatidilserina após 24 h do estímulo com TPA - - - - -                                                                                             | 43 |
| Figura 14. Valores de absorbância obtidas com o teste da atividade enzimática mieloperoxidase no modelo de edema de orelha com a aplicação do gel lipossomal de fosfatidilserina após 24 h do estímulo com TPA - - - - - | 43 |
| Figura 15. Volume (mL) no modelo de edema de pata causado por carragenina após a aplicação da solução lipossomal de fosfatidilserina- - - - -                                                                            | 44 |
| Figura 16. Perda óssea alveolar (mm) induzida por ligadura após a aplicação de fosfatidilserina local (gel) e sistêmico (solução I.P.) - - - -                                                                           | 44 |

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 17. Valores de extravasamento do azul de Evans (ug/10mg) a aplicação de fosfatidilserina local (gel) e sistêmico (solução I.P.) - - - - | 45 |
| Figura 18. Parâmetros para determinar o perfil lipídico- - - - -                                                                               | 46 |

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Estudos que avaliaram o papel anti-inflamatório do lipossomas de fosfatidilserina- - - - - 28

Tabela 2. Fórmulas do gel lipossomal- - - - - 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                  |                                                                |
|------------------|----------------------------------------------------------------|
| C                | Controle                                                       |
| cyPGs            | metabólitos espontâneos da prostaglandina                      |
| DNA              | ácido desoxirribonucléico                                      |
| IL-1             | interleucina -1                                                |
| IL-1 $\beta$     | interleucina – 1 beta                                          |
| IL-8             | interleucina – 8                                               |
| IL-6             | interleucina – 6                                               |
| IL-10            | interleucina – 10                                              |
| LPS              | Lipopolissacarídeo                                             |
| MTT              | 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide |
| OPG              | Osteoprotegerina                                               |
| PGE <sub>2</sub> | prostaglandina E <sub>2</sub>                                  |
| PPAR             | do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>    |
| PS               | Fosfatidilserina                                               |
| PSR              | receptor proteico para fosfatidilserina                        |
| RANK             | receptor ativador do fator nuclear kappa-B                     |
| RANKL            | ligante receptor ativador do fator nuclear kappa-B             |
| TGF- $\beta$     | fator de transformação do crescimento – beta                   |
| TGF- $\beta$ 1   | fator de transformação do crescimento beta 1                   |
| TNF              | fator de necrose tumoral                                       |
| TNF- $\alpha$    | fator de necrose tumoral – alfa                                |
| TRAP             | enzima fosfatase ácida tartarato resistente                    |
| i.p.             | intraperitoneal                                                |
| i.v.             | Intravenoso                                                    |
| SFB              | soro fetal bovino                                              |
| EDTA             | ácido etilenodiamino tetra-acético                             |
| DMEM             | do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>            |
| céls/poço        | células por poço                                               |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|        |                            |
|--------|----------------------------|
| %      | porcentagem                |
| µg     | Micrograma                 |
| mg     | Miligrama                  |
| g      | Grama                      |
| Kg     | Quilograma                 |
| h      | Hora                       |
| min    | Minuto                     |
| mL     | Mililitro                  |
| µL     | Microlitro                 |
| µM     | Micromolar                 |
| nmol   | Nanomol                    |
| nm     | Nanômetro                  |
| °C     | grau Celsius               |
| ±      | mais ou menos              |
| v/v    | volume/volume              |
| rpm    | rotação por minuto         |
| q.s.p. | quantidade suficiente para |

## SUMÁRIO

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO-</b>                                                                             | <b>18</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA-</b>                                                                  | <b>20</b> |
| 2.1. NECROSE E APOPTOSE -                                                                         | 20        |
| 2.2. APOPTOSE E INFLAMAÇÃO-                                                                       | 22        |
| 2.3. DOENÇA PERIODONTAL-                                                                          | 25        |
| 2.4. LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA-                                                              | 26        |
| <b>3. PROPOSIÇÃO-</b>                                                                             | <b>29</b> |
| 3.1. OBJETIVOS GERAIS-                                                                            | 29        |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS-                                                                       | 29        |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS-</b>                                                                     | <b>30</b> |
| 4.1. PREPARAÇÃO DO GEL LIPOSSOMAL-                                                                | 30        |
| 4.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL-                                                            | 30        |
| 4.3. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> -                                                                    | 31        |
| 4.3.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR-                                                             | 31        |
| 4.3.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR-                                                            | 31        |
| 4.4. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> -                                                                     | 32        |
| 4.4.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO GEL LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE ORELHA-    | 32        |
| 4.4.2. MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)-                                   | 33        |
| 4.4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE PATA-  | 34        |
| 4.4.4. EFEITO DO LIPOSSOMA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS- | 34        |
| 4.4.4.1. PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA- -                                                     | 34        |
| 4.4.4.2. AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DO GEL LIPOSSOMAL DE FOSFATIDILSERINA-                            | 35        |
| 4.4.4.3. AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO                                                        |           |



|                                                                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| DE LIPOSSOMAS DEFOSFATIDILSERINA- - - - -                                                                                                                 | 36        |
| 4.4.4.4. AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA:<br>MORFOMÉTRICO                                                                                                        | 37        |
| 4.4.4.5. AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA<br>PERMEABILIDADE VASCULAR- - - - -                                                                                      | 38        |
| 4.4.4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO- - - - -                                                                                                            | 39        |
| 4.5. ANÁLISE DOS DADOS- - - - -                                                                                                                           | 39        |
| <b>5. RESULTADOS- - - - -</b>                                                                                                                             | <b>40</b> |
| 5.1. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> - - - - -                                                                                                                    | 40        |
| 5.1.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR- - - - -                                                                                                             | 40        |
| 5.1.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR- - - - -                                                                                                            | 41        |
| 5.2. ENSAIOS <i>IN VIVO</i>                                                                                                                               | 42        |
| 5.2.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO<br>DO GEL LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE<br>ORELHA- - - - -                                              | 42        |
| 5.2.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO<br>DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE<br>PATA- - - - -                                            | 44        |
| 5.2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LIPOSSOMA DE<br>FOSFATIDILSERINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE<br>PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA- - - - -                 | 44        |
| 5.2.3.1. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PERDA<br>ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA APÓS A APLICAÇÃO DE<br>FOSFATIDILSERINA LOCAL (GEL) E SISTÊMICO<br>(SOLUÇÃO I.P.)- - - - - | 44        |
| 5.2.4. AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE<br>VASCULAR. APLICAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA LOCAL<br>(GEL) E SISTÊMICO (SOLUÇÃO I.P.)- - - - -               | 45        |
| 5.2.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO- - - - -                                                                                                              | 46        |
| <b>6. DISCUSSÃO - - - - -</b>                                                                                                                             | <b>47</b> |
| <b>7. CONCLUSÃO- - - - -</b>                                                                                                                              | <b>52</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS- - - - -</b>                                                                                                                            | <b>53</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica de origem bacteriana e relacionada principalmente a microrganismos anaeróbicos gram-negativos que colonizam a área subgengival (Cochran<sup>1</sup> 2008, Demmer e Papapanou<sup>2</sup> 2010, Zijng et al.<sup>3</sup> 2012). Esta doença é caracterizada por uma resposta imune-inflamatória, na qual a produção de mediadores, como citocinas e prostaglandinas induzem a produção e ativação de enzimas que destroem o tecido conjuntivo gengival e estimulam a proliferação de osteoclastos, induzindo a reabsorção óssea. O osteoclasto é um macrófago tecido-específico, e tem papel central na perda óssea que ocorre durante o processo inflamatório na periodontite (Cochran<sup>1</sup> 2008, Milward et al.<sup>4</sup> 2013, Redlich e Smolen<sup>5</sup> 2012, Dumitrescu et al.<sup>6</sup> 2004, Armitage<sup>7</sup> 2010).

Como tentativa para reduzir o processo inflamatório, há moléculas como as lipoxinas, as resolvinas e o receptor PPAR (inglês *peroxisomeproliferator-activated receptor*), que atenuam a migração celular e promovem a apoptose e a depuração dos leucócitos a partir do foco inflamatório (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010, Taylor et al.<sup>9</sup> 2008, Krysko et al.<sup>10</sup> 2008, Liu et al.<sup>11</sup> 2006, Ghobrial et al.<sup>12</sup> 2005, Henson et al.<sup>13</sup> 2001). A fagocitose de células apoptóticas por células mononucleares promove a liberação de mediadores anti-inflamatórios para o local (Liu et al.<sup>11</sup> 2006, Hoffmann et al.<sup>14</sup> 2005, Serhan e Savill<sup>15</sup> 2005, Boabaid et al.<sup>16</sup> 2001, Freire-de-Lima et al.<sup>17</sup> 2000). O reconhecimento e a remoção de células apoptóticas por fagócitos são mediados por alterações na membrana plasmática dessas células apoptóticas, onde ocorre a externalização da fosfatidilserina (PS), que é um lipídeo normalmente localizado na parte interna da membrana plasmática e translocado para a parte externa da membrana da célula, quando esta sofre apoptose (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010, Taylor et al.<sup>9</sup> 2008, Henson et al.<sup>13</sup> 2001, Serhan e Savill<sup>15</sup> 2005). Esta interação da fosfatidilserina com receptores nos fagócitos inicia um processo de sinalização capaz de promover ativamente a resolução da resposta inflamatória.

Lipossomas contendo fosfatidilserina podem mimetizar o processo da fagocitose das células apoptóticas (Shi et al.<sup>18</sup> 2007, Harel-Adar et al.<sup>19</sup> 2011, Ramos et al.<sup>20</sup> 2007, Mourdjeva et al.<sup>21</sup> 2005, Cocco e Ucker<sup>22</sup> 2001). Além disso, foi demonstrado que a fagocitose destes lipossomas por osteoclastos estimula a liberação de mediadores anti-inflamatórios, reduzindo a osteoclastogênese e,

portanto, a reabsorção óssea (Ma et al.<sup>23</sup> 2011, Wu et al.<sup>24</sup> 2010).

Resumidamente tem sido demonstrado que o reconhecimento e captação das células apoptóticas por fagócitos é iniciado pela exposição de fosfatidilserina na membrana da célula em apoptose (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010, Taylor et al.<sup>9</sup> 2008, Liu et al.<sup>11</sup> 2006, Ravichandran e Lorenz<sup>25</sup> 2007). A fosfatidilserina constitui cerca de 2-10 % dos lipídios na membrana plasmática na maioria das células eucarióticas. Em condições normais, praticamente toda fosfatidilserina de uma célula se encontra na parte interna da membrana plasmática (Hoffmann et al.<sup>14</sup> 2005, Shi et al.<sup>18</sup> 2007, Harel-Adar et al.<sup>19</sup> 2011, Ma et al.<sup>23</sup> 2011, Frasch et al.<sup>26</sup> 2000, Huynh et al.<sup>27</sup> 2002). Entretanto, durante a apoptose, ocorre um rearranjo da disposição dos lipídios de membrana e a fosfatidilserina é exposta na parte externa da membrana. O reconhecimento da fosfatidilserina por receptores específicos presentes na superfície dos macrófagos (Fadok et al.<sup>28</sup> 2000, Armstrong e Ravichandran<sup>29</sup> 2011), é um sinal crucial para a fagocitose das células apoptóticas e a consequente resposta anti-inflamatória que é desenvolvida por este processo (Taylor et al.<sup>9</sup> 2008, Krysko et al.<sup>10</sup> 2008, Henson et al.<sup>13</sup> 2001, Huynh et al.<sup>27</sup> 2002). Portanto, a fagocitose de uma célula apoptótica representa apenas o início de um processo ativo de resolução da resposta inflamatória (Liu et al.<sup>11</sup> 2006, Serhan e Savill<sup>15</sup> 2005).

Desta forma, a aplicação tanto tópica como sistêmica de lipossomas de fosfatidilserina, pode ser uma nova alternativa para a modulação da resposta imune-inflamatória, contribuindo assim, para a redução da perda de inserção, observada na doença periodontal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. NECROSE E APOPTOSE

A morte celular é um processo integrado que ocorre através de dois mecanismos principais, a necrose e a apoptose. A necrose é um processo patológico induzido por estímulos químicos ou físicos, agentes infecciosos e imunitários, sendo caracterizada por uma desintegração celular e liberação de componentes tóxicos (Krysko et al.<sup>10</sup> 2008, Henson et al.<sup>13</sup> 2001, Serhan e Savill<sup>15</sup> 2005, Ravichandran e Lorenz<sup>25</sup> 2007, Kaneki et al.<sup>30</sup> 2006). As células necróticas são incapazes de manter a integridade de sua membrana, ocorrendo o extravasamento do seu conteúdo e digestão enzimática, são mais propensas a iniciar a inflamação e a ativação da resposta imune adaptativa. Este efeito pró-inflamatório parece ser induzido por células que sofrem citólise (Taylor et al.<sup>9</sup> 2008, Henson et al.<sup>13</sup> 2001, Fadok et al.<sup>28</sup> 2000, Fadok et al.<sup>31</sup> 1998).

Nas células apoptóticas a membrana permanece intacta, sendo que seus fragmentos e a célula tornam-se alvos para fagócitos, não gerando assim uma reação inflamatória (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010, Henson et al.<sup>13</sup> 2001, Serhan e Savill<sup>15</sup> 2005).

A apoptose ou morte celular programada é um processo crucial na homeostase do tecido natural e resulta na remoção imediata da célula morta, pelas células vizinhas ou por fagócitos, tais como macrófagos e células dendríticas. As células apoptóticas sofrem alterações na sua membrana de superfície que são reconhecidos por receptores presentes nos fagócitos. A apoptose pode ocorrer por duas vias de sinalização, a via extrínseca, que é desencadeada por ativação de receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, e a via intrínseca que ao ser estimulada, promove a liberação do citocromo c da mitocôndria e a ativação de processos citoplasmáticos que resultam na morte celular (Ghobrial et al.<sup>12</sup> 2005, Fadok et al.<sup>31</sup> 1998, Urban et al.<sup>32</sup> 2001).

Apoptose é um processo ativo, dependente de energia que causa alterações morfológicas típicas, incluindo encolhimento celular, condensação nuclear, fragmentação do DNA e alterações da membrana (Taylor et al.<sup>9</sup> 2008). É iniciada tanto por estímulos fisiológicos como patológicos. Quando induzida por alguns

estímulos patológicos as células podem progredir para necrose (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010).

As causas da apoptose resumem-se na eliminação de células potencialmente prejudiciais ou quando as células são danificadas afetando o seu DNA ou as suas proteínas (Krysko et al.<sup>10</sup> 2008).

Após os macrófagos entrarem em contato com células apoptóticas eles passam a liberar o fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e ocorre uma modulação na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-6, leucotrieno C4, tromboxano B2, reduzindo-os, potencialmente sendo um fator anti-inflamatório (Huynh et al.<sup>27</sup> 2002, Fadok et al.<sup>33</sup> 2001, Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002).

## 2.2. APOPTOSE E INFLAMAÇÃO

Adicionalmente as diferenças morfológicas e bioquímicas, as mortes celulares por apoptose ou necrose mostram significantes diferenças nos seus efeitos imunológicos (Liu et al.<sup>11</sup> 2006, Fadok et al.<sup>31</sup> 1998). A fagocitose das células apoptóticas tem sido reconhecida como importante mecanismo para resolução da resposta inflamatória (Huynh et al.<sup>27</sup> 2002, Fadok et al.<sup>31</sup> 1998). Em contraste, a ingestão de células necróticas geralmente inicia ou perpetua uma resposta pró-inflamatória (Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002).

O evento de reconhecimento/remoção de células apoptóticas, se deve pela exposição de fosfatidilserina (PS) em suas superfícies. Os mecanismos bioquímicos envolvidos na exposição de PS durante a apoptose parece envolverem modificações na atividade de duas enzimas: (1) a ativação da enzima fosfolipídeos *cramblase*, que aumenta o movimento bidirecional de lipídeos através da dupla camada da membrana, um movimento conhecido como “*flip-flop*” e (2) inativação da enzima aminofosfolipídeo *translocase*, que retornaria a PS para a camada interna da membrana citoplasmática. Estas alterações enzimáticas irreversíveis parecem estar relacionadas com a atividade da enzima caspase-3 (Henson et al.<sup>13</sup> 2001).

O processo de fagocitose das células apoptóticas pode ser dividido nas seguintes etapas: sensor de presença de células em apoptose; o reconhecimento das células apoptóticas pelos fagócitos; reorganização do citoesqueleto e internalização do alvo; transformação e degradação da célula apoptótica ingerida, e respostas pós-imersão dos fagócitos (Ravichandran e Lorenz<sup>25</sup> 2007).

A inflamação é um processo complexo que contribui para eliminar os patógenos presentes na lesão bem como remover o tecido danificado, com o objetivo de homeostase. A ação conjunta de fagócitos - neutrófilos, monócitos e macrófagos – é fundamental para a eliminação de patógenos e detritos celulares, regulando a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010). No processo inflamatório a fagocitose de neutrófilos apoptóticos promove uma troca no fenótipo dos macrófagos, de um estado ativado para um estado reparador (Serhan e Savill<sup>15</sup> 2005).

Interações entre macrófagos e células apoptóticas resultam na secreção de mediadores anti-inflamatórios, tais como TGF-, IL-10, assim como a inibição da produção de mediadores de pró-inflamatórios (Cocco e Ucker<sup>22</sup> 2001, Huynh et al.<sup>27</sup> 2002, Fadok et al.<sup>31</sup> 1998). As células apoptóticas inibem também a maturação de células dendríticas e a apresentação de antígeno (Urban et al.<sup>32</sup> 2001, Stuart et al.<sup>35</sup> 2002).

No curso da resposta inflamatória, citocinas como interleucinas, quimiocinas são produzidas e sintetizadas, as quais afetam a diferenciação e função dos osteoclastos e osteoblastos (Figura 1). As citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, IL-1, IL-6 e RANKL induzem proteases e mediadores inflamatórios, outras células do processo inflamatório que podem degradar o tecido (Rowan et al.<sup>36</sup> 2001, Legendre et al.<sup>37</sup> 2005). A osteoclastogênese é potencializada na presença dessas citocinas pró-inflamatórias, através da hiperatividade de osteoclastos e da hipoatividade de osteoblastos, levando a redução da massa óssea (Redlich e Smolen<sup>5</sup> 2012).

Os fagócitos reconhecem a célula apoptótica através da interação com a PS, exposta na superfície da membrana plasmática da célula apoptótica, com um receptor proteico (PSR) nas membranas dos fagócitos (Figura 1). A ativação do PSR por si promove a macropinocitose em macrófagos, o que explica a importância desta sinalização para a fagocitose de células apoptóticas (Henson et al.<sup>13</sup> 2001, Fadok et al.<sup>33</sup> 2001).

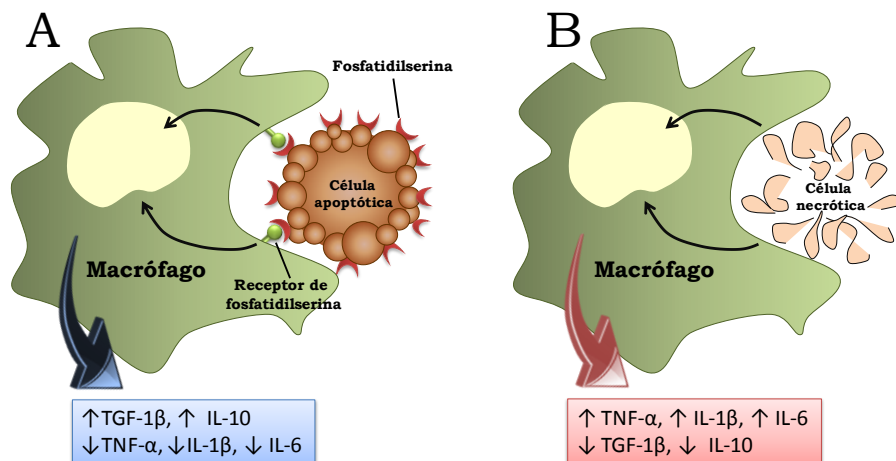


Figura 1. Papel da fagocitose na inflamação. **A:** O macrófago reconhece a célula apoptótica pela interação de receptores de superfície com a fosfatidilserina externalizada na membrana da célula apoptótica. A fagocitose subsequente promove a liberação de mediadores anti-inflamatórios e a supressão da produção de mediadores inflamatórios. **B:** Os detritos de células necróticas não apresentam fosfatidilserina na superfície e a fagocitose ocorre por mecanismos alternativos que estimulam a resposta inflamatória. Nota: Adaptado (Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002).

Embora o estudo da resposta inflamatória seja focado em mediadores pró-inflamatórios, nas últimas décadas várias moléculas têm sido descritas no contexto da resolução da inflamação, como as lipoxinas, as resolvinas e o receptor PPAR, um membro da família de receptores nucleares e fatores de transcrição ligando-ativando o gene da expressão relacionada com diversos mediadores anti-inflamatórios (Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002). Estes mediadores anti-inflamatórios atenuam a migração celular e promovem a apoptose e a depuração dos leucócitos a partir do foco inflamatório (Figura 2). E a fagocitose de células apoptóticas por células mononucleares também irá promover a liberação de mediadores anti-inflamatórios para o local (Henson et al.<sup>13</sup> 2001).

Concentrações de lipoxinas têm efeitos inibitórios no recrutamento de neutrófilos e eosinófilos, estimulam a adesão de monócito ao endotélio vascular e a quimiotaxia (Figura 2). Lipoxinas promovem também a remoção fagocítica de células em apoptose por macrófagos, o que pode contribuir para a resolução de inflamação. Metabólitos espontâneos da prostaglandina (cyPGs) gerados por biossíntese intracelular, promovem a supressão da função de macrófagos pró-inflamatórios (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010).

Apoptose e fagocitose de células apoptóticas são mecanismos importantes para a resolução da inflamação. A apoptose de leucócitos coincide com a produção e liberação de cyPGs e outros mediadores anti-inflamatórios, tais como fator de

transformação do crescimento beta1 (TGF- $\beta$ 1), suprimindo a atividade pró-inflamatória de macrófagos (Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002).

A TGF- $\beta$ 1 causa a inibição do crescimento e diferenciação de muitos tipos de células, a regulação da resposta imunitária e inflamatória, a modulação da cicatrização de feridas, a adesão e migração celular. A maioria das células pode expressar o TGF- $\beta$  e seus receptores (Figura 2). O receptor de PS tem um importante papel na produção de TGF- $\beta$ , que pode ser reproduzido por instalação de lipossomas contendo PS, assim como de células que expressam PS-apoptóticos (Ravichandran e Lorenz<sup>25</sup> 2007).

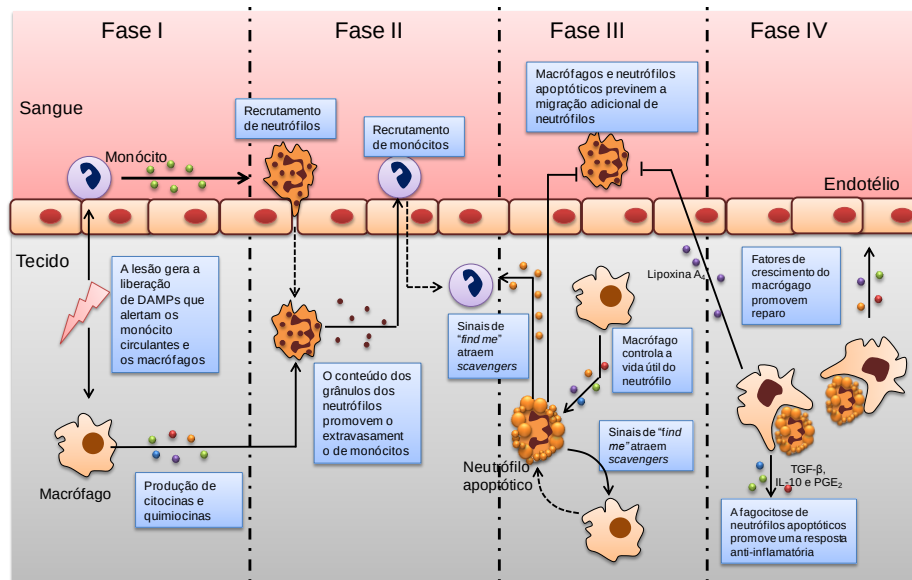


Figura 2. Interações de fagócitos na inflamação. **Fase I:** Recrutamento de monócitos e macrófagos. Ativação do sistema imune. **Fase II:** Neutrófilos invadem o local e promovem a liberação de grânulos resultando o extravasamento de monócitos inflamatórios. **Fase III:** O tempo de vida de neutrófilos é curto e está sujeito a modificação por sinais pró ou anti-apoptóticos. Macrófagos e neutrófilos apoptóticos evitam a infiltração de mais neutrófilos e promovem o influxo de monócitos. **Fase IV:** A depuração da apoptose de neutrófilos promove um programa anti-inflamatório nos macrófagos, levando à homeostase do tecido. Nota: Adaptado (Soehnlein e Lindbom<sup>8</sup> 2010).



### 2.3. DOENÇA PERIODONTAL

A periodontite é um processo inflamatório crônico complexo e multifatorial. Clinicamente, se caracteriza por inflamação dos tecidos de proteção e suporte dos dentes (Cochran<sup>1</sup> 2008, Demmer e Papapanou<sup>2</sup> 2010, Armitage<sup>7</sup> 2010). A fase inicial reflete alterações inflamatórias restritas ao periodonto de proteção, caracterizadas como vermelhidão e inchaço da margem gengival, bem como aumento do fluxo do fluido gengival (Redlich e Smolen<sup>5</sup> 2012, Kinane et al.<sup>38</sup> 2011). Microscopicamente as alterações teciduais observadas incluem proliferação da camada basal do epitélio juncional, migração celular apical e lateral, vasculite dos vasos sanguíneos adjacentes ao epitélio juncional, destruição progressiva de fibras colágenas e infiltrado inflamatório agudo (Milward et al.<sup>4</sup> 2013, Demmer et al.<sup>39</sup> 2008, Kawai et al.<sup>40</sup> 2006). A persistência do estímulo torna a resposta crônica, com proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte, formando uma bolsa periodontal, além da contínua degradação do colágeno, ativação de fibroblasto e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares, intenso infiltrado mononuclear predominantemente linfoplasmocitário e perda de suporte dentário caracterizado pela reabsorção óssea alveolar (Cochran<sup>1</sup> 2008, Kawai et al.<sup>40</sup> 2006, Gaspersic et al.<sup>41</sup> 2003).

A periodontite crônica é uma doença de alta prevalência, atingindo aproximadamente 30% da população adulta (40–50 anos). Já a periodontite agressiva pode apresentar uma prevalência de 1-15% (Demmer e Papapanou<sup>2</sup> 2010, Armitage<sup>7</sup> 2010). A periodontite tem como principal fator etiológico local o biofilme dental, e caracterizado pela perda de inserção dos tecidos de suporte dental (Cochran<sup>1</sup> 2008, Zijng et al.<sup>3</sup> 2012). A perda óssea local é mediada principalmente por linfócitos T, que são ativados pelas bactérias locais e passam a produzir mediadores (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e RANKL) que conduzem a um aumento na atividade dos osteoclastos já existentes além de estimularem a diferenciação de novos osteoclastos. Merece destaque o RANKL, uma citocina central na diferenciação de osteoclastos (Redlich e Smolen<sup>5</sup> 2012). O RANKL é uma proteína ancorada na membrana de osteoblastos, entretanto a perda óssea inflamatória ocorre principalmente através da produção excessiva de uma forma solúvel de RANKL por linfócitos (Nagasawa et al.<sup>42</sup> 2007). Além dos efeitos sobre os osteoclastos, citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, inibem a diferenciação de osteoblastos, que atuam na

deposição óssea (Kaneki et al.<sup>30</sup> 2006, Gilbert et al.<sup>43</sup> 2005, Abbas et al.<sup>44</sup> 2003). Mais ainda, estas mesmas citocinas podem reduzir a produção de osteoprotegerina (OPG) por osteoblastos (Nakashima et al.<sup>45</sup> 2000). A OPG é uma proteína solúvel, que se liga com alta afinidade ao RANKL, impedindo que este se ligue ao seu receptor RANK na superfície dos osteoclastos (Boyle et al.<sup>46</sup> 2003). Isto faz com que a OPG iniba a ativação de osteoclastos e a reabsorção óssea induzida por RANKL (Nagasawa et al.<sup>42</sup> 2007). Portanto a inflamação que ocorre durante a periodontite conduz a um aumento da atividade de osteoclastos e redução da atividade dos osteoblastos. Este desequilíbrio gera perda óssea alveolar (Redlich e Smolen<sup>5</sup> 2012).

Além dos fagócitos especializados, os osteoclastos, células mielóides multinucleadas especializadas em degradar a matriz óssea mineralizada, também podem fagocitar células apoptóticas (Boabaid et al.<sup>16</sup> 2001, Cerri et al.<sup>47</sup> 2003). Recentemente foi demonstrado, em um sistema de cultura de medula óssea de rato, que precursores de osteoclastos, após fagocitarem lipossomas de fosfatidilserina secretam TGF- $\beta$ 1 que por sua vez inibem a osteoclastogênese (Wu et al.<sup>24</sup> 2010). Consistente com estas observações, lipossomas contendo fosfatidilserina reduziram substancialmente a perda óssea inflamatória trabecular em ratos artríticos (Ma et al.<sup>23</sup> 2011).

## 2.4. LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA

Alguns estudos têm tentado transpor este conhecimento para a prática clínica. A estratégia de usar células apoptóticas autólogas para o tratamento da insuficiência cardíaca crônica foi testada clinicamente e mostrou resultados favoráveis (Torre-Amione et al.<sup>49</sup> 2008). Entretanto, este procedimento, além de oferecer o transtorno de retirada de células do paciente, pode desencadear reações autoimunes, principalmente em pacientes com predisposição (Sliwa e Ansari<sup>50</sup> 2008).

Outros mostraram que lipossomas de fosfatidilserina podem mimetizar os efeitos de células apoptóticas, sendo fagocitados por macrófagos, células da micróglia ou células dendríticas, induzindo desta forma a secreção de mediadores anti-inflamatórios como TGF- $\beta$ 1 (Shi et al.<sup>18</sup> 2007, Zhang et al.<sup>51</sup> 2006, Otsuka et al.<sup>52</sup> 2004) e promovendo a resolução da inflamação (Ramos et al.<sup>20</sup> 2007, Freeman et al.<sup>53</sup> 2010). Recentemente foi demonstrado que a modulação de macrófagos

cardíacos por lipossomas de fosfatidilserina foi capaz de reduzir a lesão e o remodelamento ventricular após o infarto (Harel-Adar et al.<sup>19</sup> 2011). Portanto, a utilização controlada de lipossomas de fosfatidilserina elimina as preocupações associadas com o tratamento de células, e parece preservar os efeitos benéficos sobre o controle da resposta inflamatória. Na tabela 1 são apresentados alguns estudos que avaliaram o papel anti-inflamatório de lipossomas de fosfatidilserina.

Tabela 1. Estudos que avaliaram o papel anti-inflamatório de lipossomas de fosfatidilserina

| <b>Autor</b>                                 | <b>Método</b>                                                                                     | <b>Principal resultado</b>                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(Huynh et al.<sup>27</sup> 2002)</b>      | Papel da PS na resolução da inflamação em animais e cultura celular                               | Efeitos da produção de TGF- $\beta$ em resposta a apoptose são contribuintes na resolução da inflamação.                                                             |
| <b>(Hoffmann et al.<sup>14</sup> 2005)</b>   | Interação do receptor de PS na resposta imune em cultura celular e animais                        | PS reduz a inflamação através da indução de secreção de TGF, evitando a ativação de uma resposta imune.                                                              |
| <b>(Ramos et al.<sup>20</sup> 2007)</b>      | Efeito anti-inflamatório do lipossoma de PS no modelo edema de pata por carragenina em animais    | Lipossomas de PS a 20-200 mg/kg (i.p.) reduziu o edema de pata 8h após a aplicação de carragenina de um modo dose-dependente.                                        |
| <b>(Wu et al.<sup>24</sup> 2010)</b>         | Papel de lipossomas de PS em animais com modelo de artrite e cultura celular                      | Lipossomas de PS inibem a osteoclastogênese e a perda óssea trabecular                                                                                               |
| <b>(Ma et al.<sup>23</sup> 2011)</b>         | Papel de lipossomas de PS em animais com modelo de artrite e cultura celular                      | O tratamento sistêmico com PS inibiu a perda óssea induzida por artrite, provocando a alteração em macrófagos.                                                       |
| <b>(Harel-Adar et al.<sup>19</sup> 2011)</b> | A modulação de macrófagos cardíacos por lipossomas de PS no reparo do infarto in vivo e in vitro. | O tratamento promoveu a angiogênese, a preservação de pequenas cicatrizes, e impediu a dilatação. PS representa uma abordagem para o reparo do infarto do miocárdio. |

PS: Fosfatidilserina

Diante destas informações surge a possibilidade de uma modulação da perda óssea inflamatória de forma diferenciada. A mimetização da fagocitose de células apoptóticas por lipossomas de fosfatidilserina pode representar uma opção inovadora e economicamente viável para o tratamento de condições como a periodontite. Além disso, trata-se de uma alternativa segura, uma vez que fosfolipídeos já são usados atualmente na preparação de lipossomas carreadores de fármacos. A encapsulação lipossomal de anestésico local, por exemplo, tem sido estudada para aplicações odontológicas. Os lipossomas aumentam a penetração do fármaco e oferecem uma liberação prolongada propiciando um melhor plano anestésico (Franz-Montan et al.<sup>48</sup> 2007).

Portanto, o desenvolvimento de lipossomas de fosfatidilserina pode promover a resolução da resposta inflamatória. Assim, os lipossomas antes encarados apenas como um carreador inócuo de fármacos, podem agora contribuir farmacologicamente para o tratamento de algumas patologias, como a periodontite.

### **3. PROPOSIÇÃO**

#### **3.1. OBJETIVOS GERAIS**

Diante das evidências mostrando que lipossomas de fosfatidilserina podem mimetizar células apoptóticas, e quando fagocitadas, promover a resolução da resposta inflamatória. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do lipossoma de fosfatidilserina sobre a reposta inflamatória e perda óssea induzida por ligadura em ratos.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver gel lipossomal de fosfatidilserina.
- Avaliar o efeito do lipossoma de fosfatidilserina sobre a viabilidade e proliferação de osteoblastos.
- Caracterizar o efeito anti-inflamatório das formulações de lipossomas em edema de orelha e de pata.
- Avaliar o efeito do lipossoma sobre a inflamação e perda óssea induzida por ligadura em ratos.
- Avaliar o perfil lipídico dos animais tratados com lipossoma de fosfatidilserina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. PREPARAÇÃO DO GEL LIPOSSOMAL

Para aplicação local de lipossomas, realizou-se a formulação de um gel lipossomal a qual está sumarizada na Tabela 2. De forma sintética, a fase oleosa foi previamente preparada a partir da dissolução do fosfolípideo em palmitato de isopropila, com a adição do conservante ácido sórbico. A fase aquosa foi elaborada empregando o Poloxamer 407 [poli(oxietileno)-co-poli(oxipropileno)-co-poli(oxietileno)], sorbato de potássio e água purificada refrigerada, a 4-8°C. O gel lipossomal foi obtido pelo método de extrusão, que consiste na mistura das fases por alto cisalhamento, através da passagem por orifício reduzido, por meio da conexão entre seringas, até a formação de uma mistura homogênea, para aplicação local.

Tabela 2. Fórmulas do gel lipossomal

| Composição              | Gel Veículo  | Gel Fosfatidilserina (50 %) |
|-------------------------|--------------|-----------------------------|
| <b>Fase oleosa</b>      |              |                             |
| Fosfatidilserina        | —            | 6,60 g                      |
| Palmitato de isopropila | 7,75 mL      | 7,75 mL                     |
| Ácido sórbico           | 0,12 g       | 0,12 g                      |
| <b>Fase aquosa</b>      |              |                             |
| Poloxamer 407           | 9,35 g       | 9,35 g                      |
| Sorbato de potássio     | 0,1 g        | 0,1 g                       |
| Água purificada         | q.s.p. 60 mL | q.s.p. 60 mL                |

### 4.2. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL

Os lipossomas foram preparados a partir de uma mistura de fosfolípeos enriquecida com fosfatidilserina (50%). Como descrito por (Huynh et al.<sup>27</sup> 2002) os fosfolípeos foram dissolvidos em clorofórmio/metanol (9:1), em seguida os solventes orgânicos foram evaporados à vácuo. Após, foram ressuspensas em solução salina na concentração de 6 mg/mL (concentração de lípeos totais por mL). Colocou-se em ultrassom por 30 minutos para homogeneização e obteve a solução final de lipossomas com um aspecto leitoso.

### 4.3. ENSAIOS *IN VITRO*

#### 4.3.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Osteoblastos provenientes de Hamster da linhagem ROS mantidos em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e a 37 °C, os quais foram desaderidos da garrafa por meio da adição de tripsina com EDTA a 0,05 %. Após 5 min em estufa, foi adicionado o volume de 3 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), e em seguida centrifugado a 1.200 rpm por 10 min com o objetivo de precipitar as células. Em seguida, realizou a contagem celular em uma câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Hamb'urg, Alemanha), onde, então, as células viáveis foram contadas com a utilização de um microscópio óptico (Carl Zeiss, modelo Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP) com aumento de 25x. As células foram plaqueadas na densidade de  $7 \times 10^3$  céls/poço, após 24 h do seu plaqueamento foi realizado o tratamento com a solução de lipossoma de fosfatidilserina nas concentrações de 50, 100, 150, 250, 300, 400 e 500 µM, em meio a 1 % SFB.

A viabilidade celular foi analisada quantitativamente por meio da análise colorimétrica MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, para medir a atividade da redutase mitocondrial em células vivas. Nesta técnica, após 24h do tratamento, o MTT a 0,5 mg/mL é incorporado à cultura com o meio a 1 % de SFB por 3 a 4 h. Baseando na clivagem do sal amarelo tetrazólio (membrana permeável) para cristais de formazan azuis/púrpura por células metabolicamente ativas.

Em seguida, a solução de MTT foi retirada e acrescentado álcool absoluto e a análise da atividade mitocondrial foi feita em espectrofotômetro (Biotek EL 800, Biotek, Winooski, VT, EUA) a 570 nm.

#### 4.3.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

No ensaio de proliferação celular, as células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^3$  céls/poço e as mesmas concentrações de solução de lipossomas de PS foram utilizadas, no entanto, foram preparadas em meio de cultura com 0,1 % e 30 % de SFB. No final do experimento a análise colorimétrica através do método de MTT foi feito nos tempos de 24, 48, 72, 96 h, no espectrofotômetro a 570nm. Para o tempo de 72 e 96 h foi realizado a troca do tratamento no tempo de 48h após o início do tratamento (Figura 3).

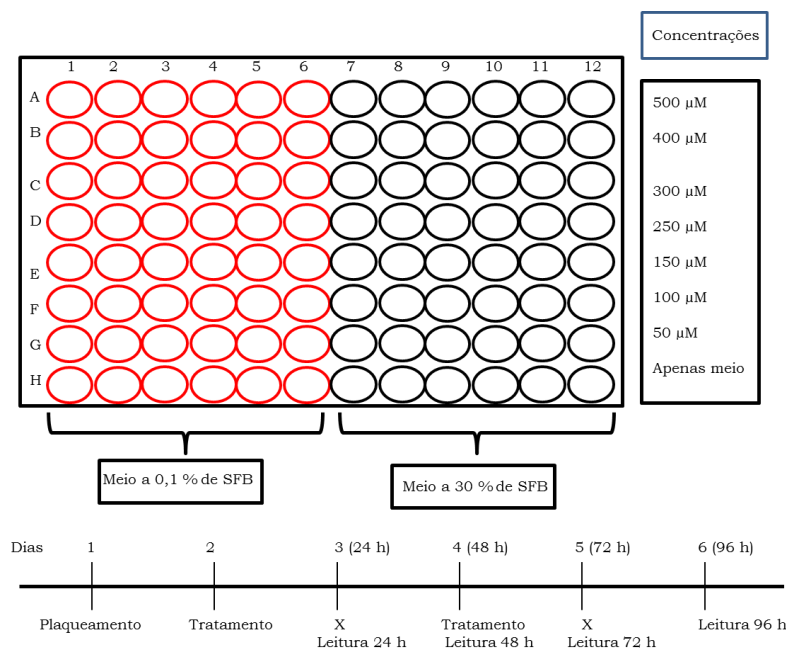


Figura 3. Layout de Placa – Ensaio de Proliferação celular.

#### 4.4. ENSAIOS *IN VIVO*

Os animais utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), e mantidos em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2$  °C) com ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlado automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (número do protocolo de aprovação 02590/2012) e os animais foram manipulados conforme recomendações da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didático (DBCA), publicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

##### 4.4.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO GEL LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE ORELHA

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos ( $\mu\text{m}$ ). A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da mesma, com o auxílio de um micrômetro digital (GREAT MT – 045B), antes e após determinado tempo da indução do processo inflamatório (De Young et al.<sup>54</sup> 1989).

O agente flogístico utilizado foi o TPA, éster de forbol presente no óleo de



cróton (*Crotontiglium*L.) 2,5 µg/orelha dissolvidos em 20 µL de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos. Para minimizar variações, as medições foram conduzidas sempre por um único experimentador previamente treinado e calibrado.

Em vinte camundongos machos, da linhagem Swiss (machos) pesando de 25–35g, foram divididos em cinco grupos: Naive (controle negativo, sem tratamento), Gel veículo, Gel Fosfatidilcolina, Gel Fosfatidilserina e controle Dexametasona® (creme 10 g). O tratamento foi aplicado topicamente de um lado da orelha direita, em seguida aplicado o TPA no outro lado da mesma orelha, e tratado novamente o lado da orelha com tratamento.

A espessura da orelha foi avaliada 6 e 24 horas após a aplicação do TPA e os tratamentos aplicados após nos tempos 0 e 6 h da aplicação do TPA. Amostras das orelhas dos camundongos (círculos de 6 mm de tecido) foram coletadas 24 horas após a aplicação do TPA e submetidas a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (De Young et al.<sup>54</sup> 1989).

#### 4.4.2 MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A atividade da enzima MPO, utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares, é o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos. As amostras (círculos de 6 mm do tecido das orelhas de camundongos) foram adicionadas a 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 80mM (pH 5,4) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTBA) e homogeneizado por cerca de 45 s a 0°C. O homogenato foi decantado em microtubos e adicionado a 0,75mL do tampão anteriormente descrito. A amostra (1,5 mL) foi colocada em microtubo e centrifugada a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos. Triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram colocadas em placas de 96 poços, onde posteriormente foi adicionado 200 µL de uma mistura contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4), 85 µL de PBS 0,22M (pH 5,4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017% em cada poço. A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) 18,4 mM dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8 %. A placa foi posteriormente incubada a 37°C por 3 minutos e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH 3,0) em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas com comprimento de onda de 620 nm (Adaptado de Young et al.<sup>54</sup> 1989, Bradley et al.<sup>55</sup> 1982).

#### 4.4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE PATA

Foram utilizados ratos Wistar (machos) de 2 a 3 meses de idade, (200-300 g), separados em dois grupos de 6 animais. Um grupo (G1), recebeu uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de salina estéril (3 mL). O outro grupo (G2) recebeu uma injeção da solução lipossomal de fosfatidilserina (100 mg/kg, i.p.). Após um período de 12 horas da aplicação da injeção com veículo ou lipossomas, os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) na pata posterior direita (volume de 50 µL). A pata contralateral recebeu 50 µL do veículo (50 µL de salina estéril) e foi usada como controle. O edema de pata foi avaliado com auxílio de uma cubeta (10 mL) colocada sobre uma balança de precisão como previamente descrito (Foletto et al.<sup>56</sup> 2013). Para tal medida, a pata do animal foi submergida dentro da cubeta até altura da articulação tibiotársica e a variação de volume da pata foi calculada pelo aumento de peso da coluna líquida, considerando que 1 mL de água corresponde a 1 g (densidade da solução da cubeta). O edema foi avaliado nos intervalos de tempo: 0 h – inicial (logo após a aplicação das soluções na pata do rato), 1 h, 2 h, 3 h e 4 h. Os resultados foram obtidos através da diferença entre o peso da pata direita e o da pata esquerda.

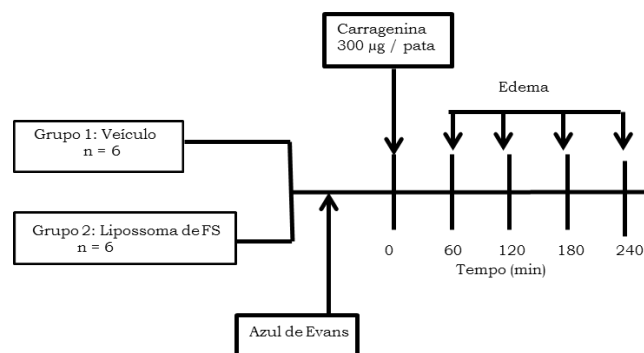


Figura 4. Protocolo experimental – Avaliação do potencial anti-inflamatório do lipossomal de PS pelo modelo edema de pata.

#### 4.4.4. EFEITO DO LIPOSSOMA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS

##### 4.4.4.1. PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA

Para o procedimento de colocação das ligaduras, os ratos foram anestesiados

com uma combinação de quetamina e xilazina (75 e 15 mg/kg, i.p., respectivamente). Os animais foram posicionados em um aparato de Doku, a fim de que permanecessem com a boca aberta para a colocação das ligaduras (fio de algodão, Tex 34 Glacê 50 – Lipasa – Brasil). Os dentes dos animais foram levemente luxados com o auxílio de uma sonda exploradora, para criar um espaço para a colocação das ligaduras (Bentzen et al.<sup>57</sup> 2005, Bjornsson et al.<sup>58</sup> 2003). As ligaduras foram colocadas, nos primeiros molares inferiores direito e esquerdo, tomando cuidado para que o fio penetrasse no sulco gengival, portanto em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial do molar (Figura 5). A indução da doença periodontal (bilateral) se fez necessária para evitar alterações no padrão de mastigação do animal, que poderiam influenciar na reabsorção (Dumitrescu et al.<sup>6</sup> 2004). Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto não feita a fixação da ligadura. Os aspectos éticos foram seguidos conforme já previamente descrito.

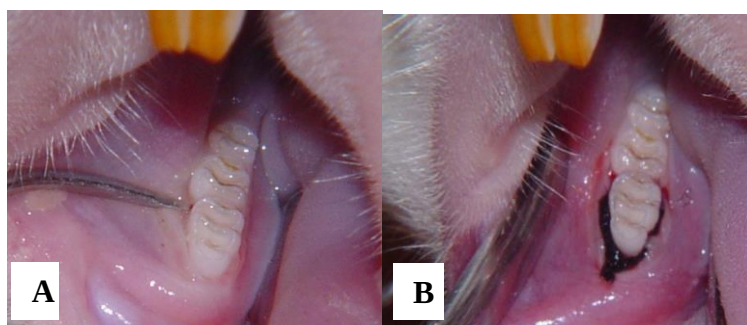


Figura 5. Periodontite induzida por ligaduras. **A:** Na região interproximal do primeiro com o segundo molar, com a sonda exploradora o dente é luxado para a passagem do fio de algodão. **B:** Dente com a ligadura.

#### 4.4.4.2. AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DO GEL LIPOSSOMAL DE FOSFATIDILSERINA

Trinta e dois animais foram separados em dois grupos de 16 animais. Um grupo foi submetido ao procedimento de colocação da ligadura enquanto o outro grupo foi submetido ao falso procedimento (Sham) conforme descrito. Vinte e quatro horas após o procedimento cada um destes grupos foi novamente dividido para receber uma aplicação local diária de gel lipossomal de PS ou veículo por 14 dias, ao redor das ligaduras, no volume de 100  $\mu$ l.

- ❖ Grupo falso-operado veículo (Sham Veículo) n = 8
- ❖ Grupo falso-operado lipossoma de fosfatidilserina (Sham Serina) n = 8

(5,5 mg de PS/ligadura, total de 11 mg de PS/animal)

- ❖ Grupo periodontite veículo (Ligadura Veículo) n = 8
- ❖ Grupo periodontite lipossoma de fosfatidilserina (Ligadura Serina) n = 8  
(5,5 mg de PS/ligadura, total de 11 mg de PS/animal)

No décimo quarto dia após o procedimento (dia 14) os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica. Em seguida retirou-se a mandíbula e amostras de tecido gengival para avaliação da perda óssea pela análise morfométrica e para análise da permeabilidade vascular.

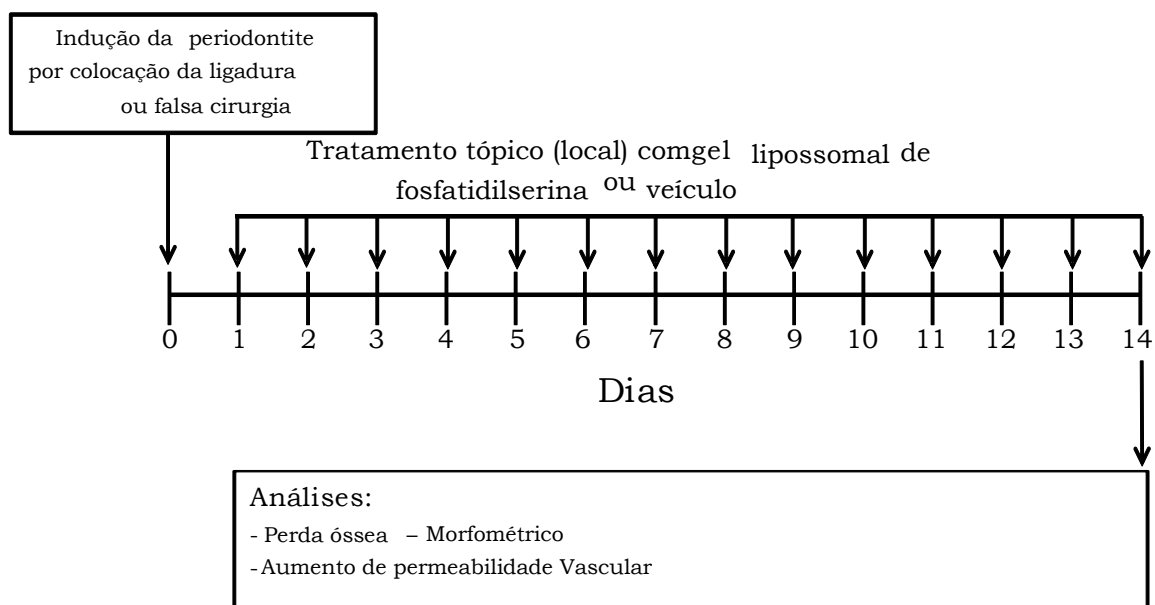


Figura 6. Protocolo Experimental – Aplicação local de gel lipossomal de PS.

#### 4.4.4.3. AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LIPOSSOMAS DE FOSFATIDILSERINA

Vinte e quatro animais machos de 200-300 g, de linhagem Wistar foram separados em dois grupos de 12 animais. Um grupo foi submetido ao procedimento de colocação da ligadura enquanto o outro grupo foi submetido ao falso procedimento (Sham). Vinte e quatro horas após o procedimento cada um destes grupos foi novamente dividido para receber uma aplicação local diária da solução de lipossomas de PS ou veículo - solução salina (i.p.), iniciando no terceiro dia após o

procedimento das ligaduras e aplicado até o décimo quarto dia, conforme indicado abaixo:

- ❖ Grupo falso-operado veículo (Sham Veículo) n = 5
- ❖ Grupo falso-operado lipossoma de fosfatidilserina (Sham Serina) n = 5  
100 mg de PS/Kg do animal, concentração da solução de 6 mg/mL
- ❖ Grupo periodontite veículo (Ligadura Veículo) n = 7
- ❖ Grupo periodontite lipossoma de fosfatidilserina (Ligadura Serina) n = 7  
100 mg de PS/Kg do animal, concentração da solução de 6 mg/mL

No décimo quarto dia após o procedimento (dia 14) os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica. Em seguida retirou-se a mandíbula e amostras de tecido gengival para avaliação da perda óssea pela análise morfométrica e para análise da permeabilidade vascular (Figura 7).

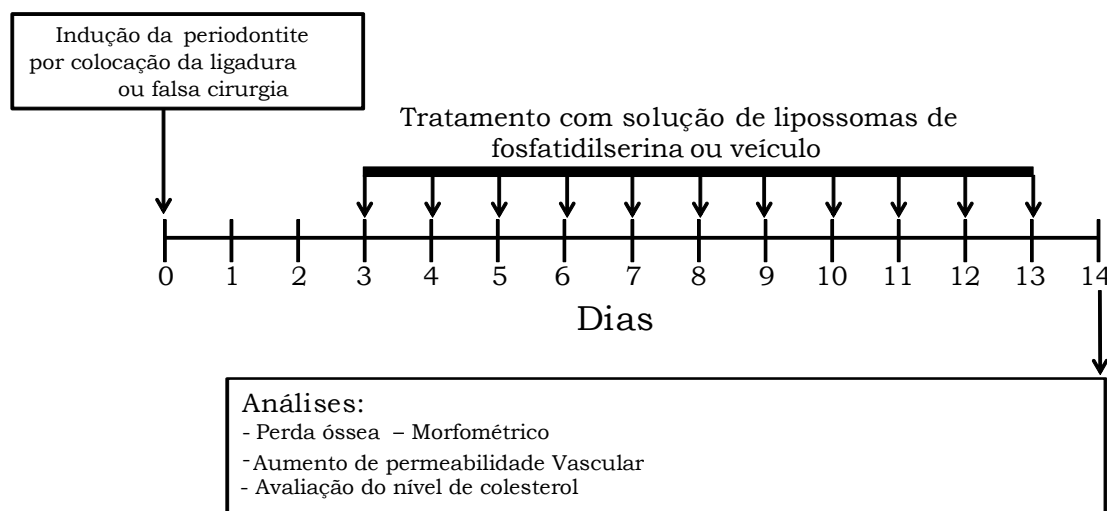


Figura 7. Protocolo experimental – Aplicação da solução de lipossomas de PS.

#### 4.4.4.4. AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA: MORFOMÉTRICO

Analisou-se a perda óssea alveolar induzida pela ligadura nas mandíbulas, sendo mensurada por análise morfométrica (Fernandes et al.<sup>59</sup> 2007, Kuhr et al.<sup>60</sup> 2004).

Após a retirada do tecido gengival da região da hemi-mandíbula, a parte óssea subjacente foi submetida ao procedimento de fervura em água por 30 minutos, com posterior imersão das amostras em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 volumes ou 3% por 12 horas. Depois das amostras estarem secas, estas foram coradas por 1 minuto com azul de metileno (1 g/100 mL), para delinear a linha da

junção esmalte-cimento (Bentzen et al.<sup>57</sup> 2005, Bjornsson et al.<sup>58</sup> 2003). As amostras foram fotografadas com uma câmera (Carl Zeiss, modelo Axiocam ERC 5s, Sensor CMOS 5.0 megapixels, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP) acoplada a um esteromicroscópio (Carl Zeiss, modelo Stemi 2000-C, Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP) e salvas em um computador. As medidas, da região lingual (mandíbula) da área localizada entre a junção esmalte-cimento e a borda da crista óssea alveolar remanescente (Figura 8), foram analisadas pelo programa Image Pro Plus® Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

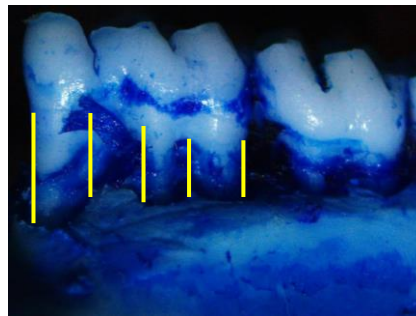


Figura 8. Mensuração da perda óssea alveolar (mm). Marcações lineares em cinco pontos da região lingual do primeiro molar inferior a fim de se mensurar a perda óssea alveolar.

#### 4.4.4.5. AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR

Para avaliação da permeabilidade vascular foi utilizado o tecido gengival retirado da mandíbula dos animais utilizado na análise da perda óssea alveolar. A permeabilidade foi analisada por meio do extravasamento do corante biológico azul de Evans. Este corante se combina com a base de nitrogênio da albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial, assim, com a formação de uma reação inflamatória, com aumento do exsudato plasmático para o tecido lesado, naturalmente com extravasamento de albumina e, portanto, com aumento ou elevação das concentrações de azul de Evans nesse tecido (Pochapski et al.<sup>61</sup> 2012, Sousa et al.<sup>62</sup> 2005, Gyorfi et al.<sup>63</sup> 1994).

O azul de Evans (a 2% na proporção de 20mg/Kg (0,1mL /100g de peso)) foi aplicado na veia lateral da cauda. Após duas horas da aplicação do azul de Evans, foi realizada uma perfusão com 60 mL de salina através do ventrículo esquerdo. Em seguida, um fragmento do tecido gengival da região próxima à ligadura foi retirado. As peças ficaram 48 horas em repouso em uma solução formamida/água (1/1, v/v) por 48 h, a 37 °C, para extração do corante, cuja concentração foi determinada por espectrofotômetro (620 nm) após a construção de uma curva padrão. As leituras dos

valores de absorbância foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante. As concentrações foram obtidas em µg/mL do tecido biopsiado.

#### 4.4.4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO

Com o objetivo de avaliar alguma possível alteração no perfil lipídicos dos animais após a administração da solução de lipossomas de PS, ao final do experimento uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca para mensuração dos níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicérides. O sangue foi centrifugado (1500 rpm por 10 minutos), o plasma coletado e posteriormente a análise do perfil lipídico foi determinada pelo Selectra Junior (Vital Scientific, Van Rensselaerweg, Holanda) no Laboratório Escola – UEPG.

#### 4.5. ANÁLISE DOS DADOS

Para análise dos dados foram utilizados modelos paramétricos, considerando as variáveis: viabilidade e proliferação celular, edema de orelha, mieloperoxidase na orelha, edema de pata, perda óssea alveolar, permeabilidade vascular e perfil lipídico. Previamente à comparação dos dados a normalidade foi testada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. A equivalência das variâncias foi avaliada com teste de Bartlett. Em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias dependendo do número de fatores fixos associados à variável. Nos casos em que foram encontradas diferenças significativas, as comparações múltiplas foram realizadas com o pós-teste de Tukey e Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% ( $\alpha=0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados com programa de computador (GraphPadPrismversion 5.00 for Windows, GraphPad Software, La JollaCalifornia USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. ENSAIOS *IN VITRO*

#### 5.1.1. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

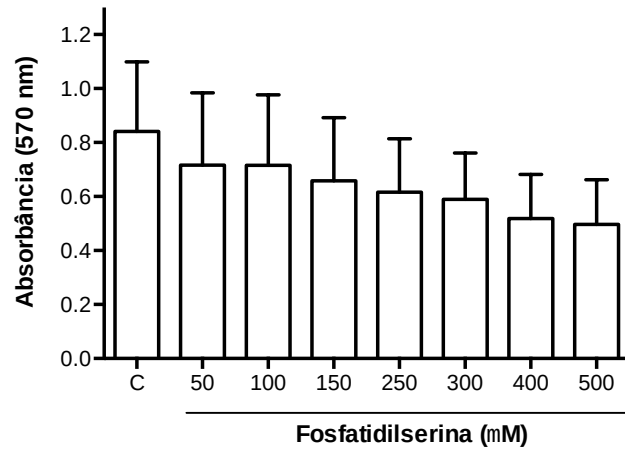


Figura 9. Média e erro padrão dos valores de absorbância obtidas com o teste MTT, representando a viabilidade celular em diferentes concentrações de fosfatidilserina. Grupo controle (C), células foram mantidas com o meio e SFB a 1 %. Diferença não significativa ( $p=0,9569$ ). ANOVA de uma via.



### 5.1.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

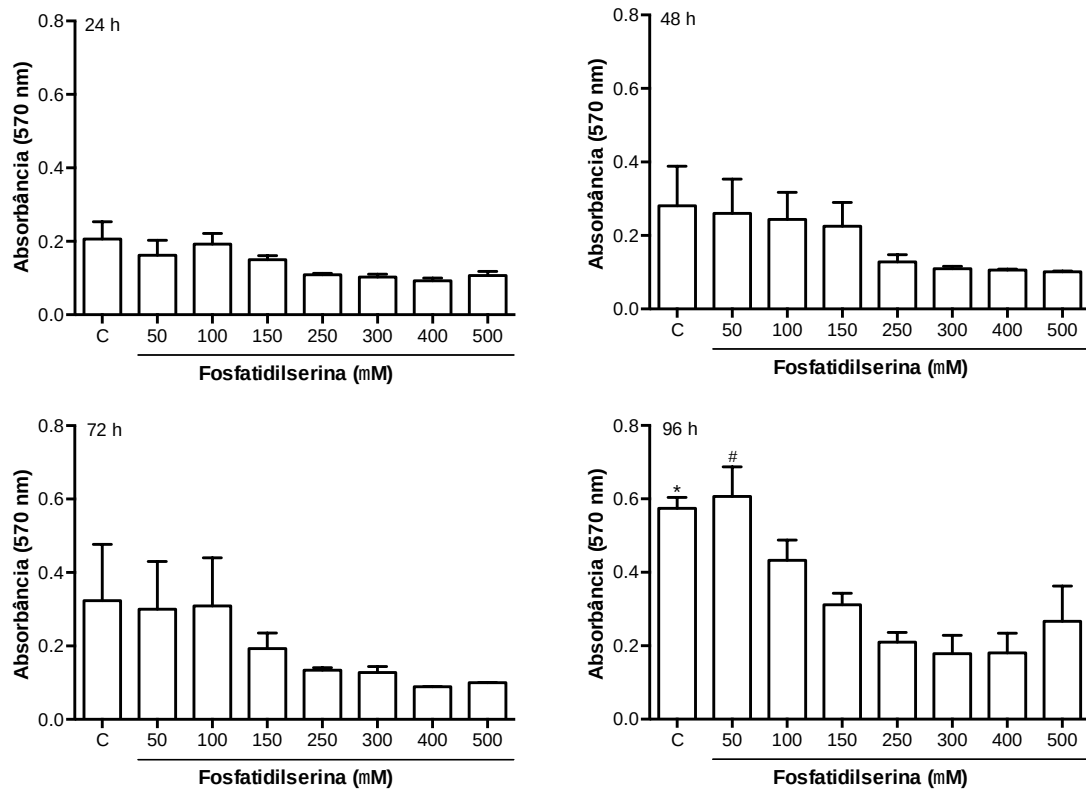


Figura 10. Média e erro padrão dos valores de absorbância obtidas com o teste MTT, representando a proliferação celular (crescimento) em diferentes concentrações de fosfatidilserina. Grupo controle (C), células foram mantidas com o meio e SFB a 0,1 %. Nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h não houve diferença significativa na proliferação celular ( $p > 0,05$ ). No tempo de 96 horas, houve diferença significativa (\*)  $p < 0,05$  com de fosfatidilserina à 150, 250, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$  e (#)  $p < 0,05$  com fosfatidilserina à 150, 250, 300, 400 e 500  $\mu\text{M}$ . ANOVA de uma via com pós teste de Tukey.

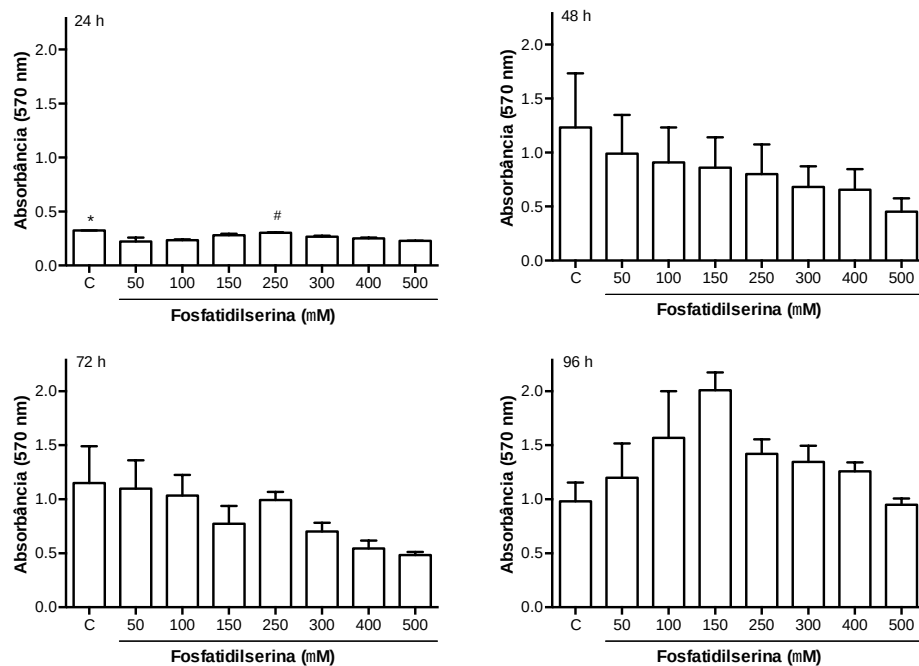


Figura 11. Média e erro padrão dos valores de absorbância obtidas com o teste MTT, representando a proliferação celular (redução do crescimento) em diferentes concentrações de fosfatidilserina. Grupo controle (C) células foi mantidas com o meio e SFB a 30 %. No tempo de 24 h houve diferença significativa (\*)  $p < 0,05$  com de fosfatidilserina à 50, 250, 100, 400 e 500  $\mu\text{M}$  e (#)  $p < 0,05$  com fosfatidilserina à 50, 100 e 500  $\mu\text{M}$ . Nos tempos de 48 h, 72 h e 96 h não houve diferença significativa na redução do crescimento celular ( $p > 0,05$ ). ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

## 5.2. ENSAIOS *IN VIVO*

### 5.2.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DO GEL LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE ORELHA

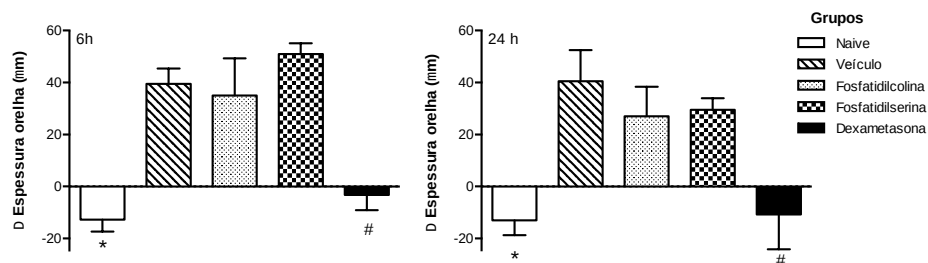


Figura 12. Média e erro padrão dos valores da variação ( $\Delta$ ) do edema de orelha com a aplicação do gel lipossomal de fosfatidilserina após de 6 h e 24 h do estímulo com TPA. Diferença significativa (\*)  $p < 0,05$  com veículo, fosfatidilcolina e fosfatidilserina nos tempos de 6 h e 24 h. ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

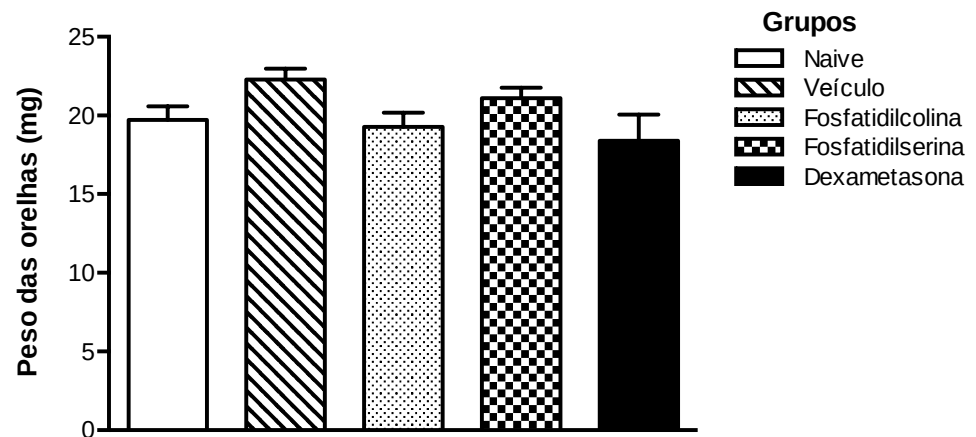


Figura 13. Média e erro padrão do peso da orelha (mg) com a aplicação do gel lipossomal de fosfatidilserina após 24 h do estímulo com TPA. Não houve diferença significativa ( $p=0,1096$ ) entre os grupos. ANOVA de uma via.

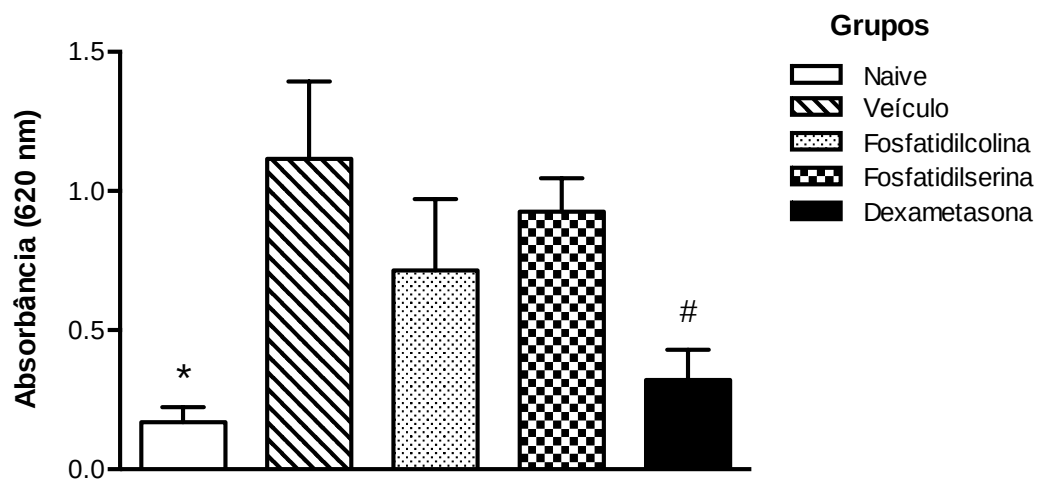


Figura 14. Média e erro padrão dos valores de absorbância obtidos com o teste da atividade enzimática mieloperoxidase no modelo de edema de orelha com a aplicação do gel lipossomal de fosfatidilserina após 24 h do estímulo com TPA. Diferença significativa (\*)  $p<0,05$  com o veículo e fosfatidilserina. Diferença significativa (#)  $p<0,05$  com o veículo. ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey.

### 5.2.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA SOLUÇÃO LIPOSSOMAL PELO MODELO EDEMA DE PATA

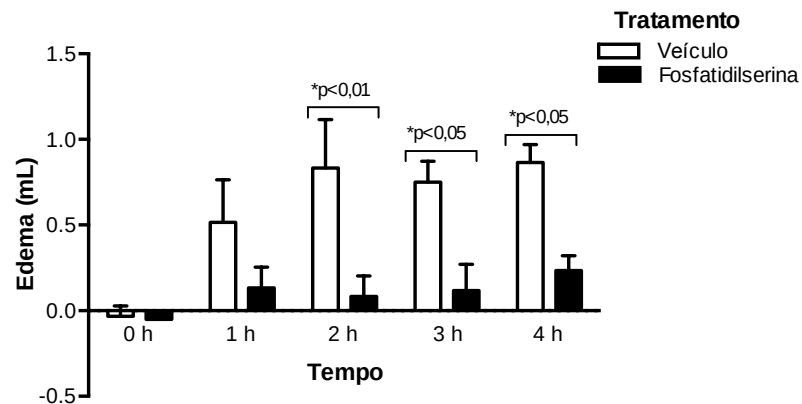


Figura 15. Média e erro padrão do volume (mL) no modelo de edema de pata causado por carragenina após a aplicação da solução lipossomal de fosfatidilserina. Diferença estatística considerando o fator tratamento ( $p=0,0106$ ), fator tempo ( $p=0,0001$ ) e interação ( $p=0,0276$ ). (\*) diferença significativa entre os grupos de acordo com o tempo. ANOVA de duas vias com pós de Bonferroni.

### 5.2.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LIPOSSOMA DE FOSFATIDILSERINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR LIGADURA

#### 5.2.3.1. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA APÓS A APLICAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA LOCAL (GEL) E SISTÊMICO (SOLUÇÃO I.P.)

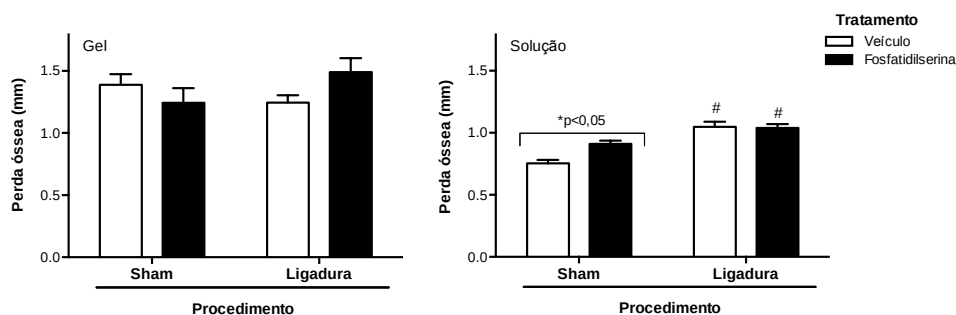


Figura 16. Média e erro padrão da perda óssea alveolar (mm) induzida por ligadura após a aplicação de fosfatidilserina local (gel) e sistêmico (solução I.P.). Gel: diferença não significativa considerando o fator tratamento ( $p=0,6283$ ), procedimento ( $p=0,6254$ ) e interação ( $p=0,0672$ ). Solução: diferença significativa considerando o fator tratamento ( $p=0,0477$ ), procedimento ( $p<0,0001$ ) e interação ( $p=0,0275$ ). (\*) diferença significativa entre veículo e fostafidilserina. (# $p<0,05$ ) diferença significativa comparando cada tratamento (Veículo e Fosfatidilserina) de acordo com os procedimentos (Sham e Ligadura). ANOVA de duas vias com pós de Bonferroni.

#### 5.2.4. AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR. APLICAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA LOCAL (GEL) E SISTÊMICO (SOLUÇÃO I.P.)

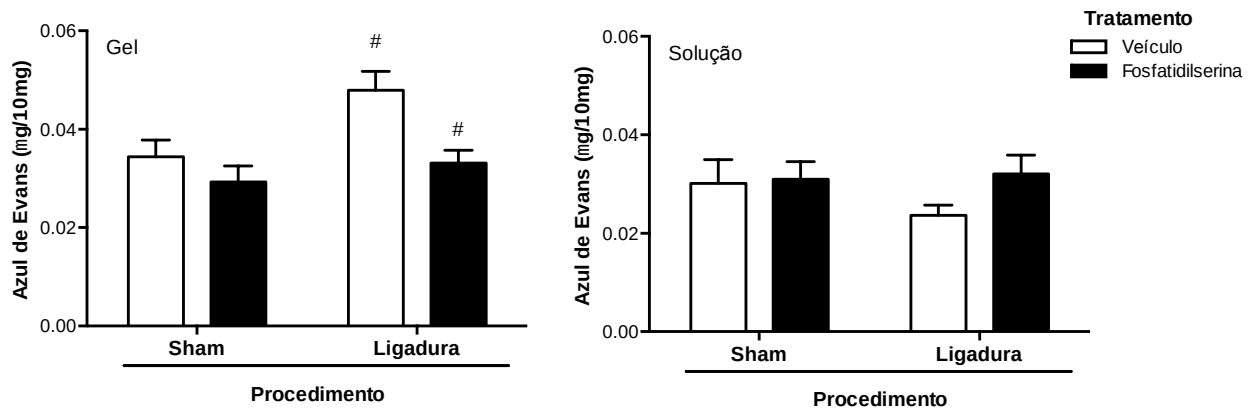


Figura 17. Média e erro padrão dos valores de extravasamento do azul de Evans (ug/10mg) a aplicação de fosfatidilserina local (gel) e sistêmico (solução I.P.). Gel: diferença significativa considerando o fator tratamento ( $p=0,0041$ ), procedimento ( $p=0,0116$ ) e não significativo para interação ( $p=0,1456$ ). (<sup>#</sup>) $p<0,05$  diferença significativa comparando cada tratamento (Veículo e Fosfatidilserina) de acordo com os procedimentos (Sham e Ligadura) Solução: diferença não significativa considerando o fator tratamento ( $p=0,2128$ ), procedimento ( $p=0,4642$ ) e interação ( $p=0,3100$ ). ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.

### 5.2.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO

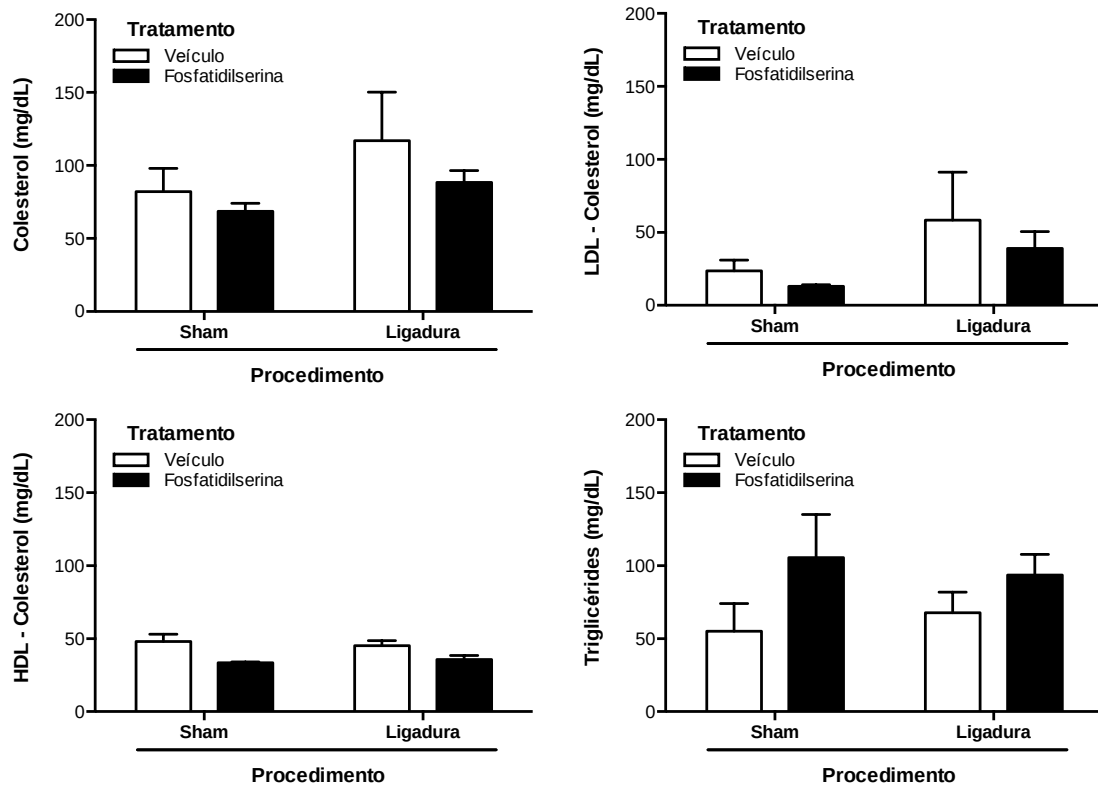


Figura 18. Média e erro padrão dos parâmetros utilizados para determinar o perfil lipídico considerando os níveis plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL e triglicérides. Diferença não significativa ( $p > 0,05$ ). ANOVA de duas vias.

## 6. DISCUSSÃO

Como uma nova forma de intervenção farmacológica para o tratamento da perda óssea alveolar observada na periodontite, este trabalho avaliou o efeito de lipossomas de fosfatidilserina na inflamação e perda óssea induzida por ligadura em molares de ratos como um possível mimetizador de células apoptóticas, tendo um papel na sinalização de citocinas anti-inflamatórias. A obtenção do gel e solução lipossomal de fosfatidilserina (PS) foi simples, apresentando baixo custo.

No presente estudo foi analisado a citotoxicidade da solução de lipossomas de PS na linhagem celular de osteoblasto, o qual foi segura nas concentrações entre 50  $\mu$ M e 250  $\mu$ M. A concentração de 50  $\mu$ M de PS pode mostrar a inibição da diferenciação e proliferação de osteoblastos, no entanto, com um aumento da concentração para 100  $\mu$ M, pode ser observado um aumento da proliferação celular (Wu et al.<sup>24</sup> 2010). Estes dados foram semelhantes aos nossos achados, em que nas concentrações entre 100  $\mu$ M e 250  $\mu$ M houve maior aumento da proliferação e viabilidade celular. Outros estudos, com diferentes linhagens celulares também mostraram que lipossomas de PS são eficazes nas concentrações de 100  $\mu$ M, com um mínimo efeito sobre células dendríticas, podendo estimular a fagocitose (Hoffmann et al.<sup>14</sup> 2005, Shi et al.<sup>18</sup> 2007). Uma possível explicação para este efeito dos lipossomas de PS é sua capacidade de inibir a ativação da p38MAPK (proteínaquinase) que está envolvida na diferenciação celular e apoptose (Otsuka et al.<sup>52</sup> 2004).

Portanto, lipossomas de PS em concentrações variando entre 100  $\mu$ M e 250  $\mu$ M poderiam ser utilizados como um agente na terapia moduladora da resposta inflamatória. Tendo como principal mecanismo a semelhança estrutural a célula apoptótica, onde há interação de PS com macrófagos gerando a fagocitose. Um importante evento anti-inflamatório dos lipossomas de PS é a capacidade de reduzir a produção de IL-1b e TNF- $\alpha$  (pró-inflamatório) e expressão TGF- $\beta$ 1 (anti-inflamatório) (Huynh et al.<sup>27</sup> 2002, Fadok et al.<sup>31</sup> 1998).

Em animais o gel lipossomal de PS, na forma tópica, não teve ação anti-inflamatória no modelo de edema de orelha nem no modelo de perda óssea induzida por ligadura. Por outro lado, a aplicação sistêmica da solução de lipossomas de PS teve ação anti-inflamatória no modelo de edema de pata, mas não no modelo de perda óssea induzida por ligadura. Isso demonstra que a forma de aplicação é um

fator importante dentro da terapia. Porém, não é possível concluir que uma forma é melhor que outra, visto que, isto depende da característica do processo inflamatório envolvido (edema de orelha induzido por TPA, edema de pata induzido por carragenina e perda óssea induzida por ligadura).

A partir do modelo de edema de orelha induzido pela aplicação do TPA, o gel lipossomal de PS não teve efeito anti-inflamatório. O TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) induz uma inflamação cutânea e respostas hiperproliferativas, levando a um aumento da espessura da orelha, devido ao infiltrado inflamatório. O pico máximo do processo se dá na sexta hora e em seguida tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas (De Young et al.<sup>54</sup> 1989, Niu et al.<sup>64</sup> 2012, Huang et al.<sup>65</sup> 2010). Esses aspectos foram observados em nosso estudo. O TPA estimula a liberação de fosfolipase A2, induzindo a expressão da COX-2, resultando na liberação de ácido araquidônico e produção de prostaglandinas e leucotrienos. Portanto, o modelo de edema de orelha é um método válido para análise do potencial anti-inflamatório de agentes por via tópica (De Young et al.<sup>54</sup> 1989, Niu et al.<sup>64</sup> 2012). A ausência de um efeito anti-inflamatório do gel lipossomal de PS pode estar relacionado à uma baixa absorção cutânea não atingindo concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico.

Para complementar os resultados da análise de espessura da orelha, avaliamos a migração celular no processo inflamatório, por meio da atividade da enzima MPO. Sendo esta, um bom marcador enzimático da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado (Bradley et al.<sup>55</sup> 1982). Assim, como o resultado anterior, aplicação do gel lipossomal PS não inibiu o acúmulo de neutrófilos induzido pelo TPA.

O modelo de edema de pata foi utilizado para análise do efeito da aplicação sistêmica (i.p.) da solução lipossomal de PS. Já com este modelo foi possível observar efeito anti-inflamatório, caracterizado pela redução do edema a partir de 2 horas após a aplicação da carragenina. Resultados semelhantes foram encontrados na literatura mostrando o efeito anti-inflamatório da solução lipossomal de PS no modelo de edema de pata (Ramos et al.<sup>20</sup> 2007). O modelo de edema de pata, modelo, que é amplamente utilizado para análise de efeitos de drogas anti-inflamatórias (Foletto et al.<sup>56</sup> 2013, Li et al.<sup>66</sup> 2011). A resposta inflamatória aguda induzida pela injeção de carragenina envolve duas fases: a fase precoce ocorre durante a primeira hora de exposição e está associada com a liberação de



histamina, serotonina, bradicinina e, em menor grau, as prostaglandinas (PGs). A fase tardia após uma hora é atribuída a infiltração de leucócitos e a continuação da geração de PG. A solução de lipossomas de PS em nosso estudo, teve ação anti-inflamatória diminuindo edema na fase tardia. O tratamento com lipossomas de PS no modelo edema de pata, não apresentou nenhum efeito sobre o perfil de migração de neutrófilos, reforçando o papel da fosfatidilserina na resolução da inflamação pela interação fagócito e células apoptótica (Ramos et al.<sup>20</sup> 2007, Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002). Isso também é mostrado em estudo no modelo de artite em ratos, em que os lipossomas de PS em solução, inibiram a osteoclastogênese e perda de massa óssea. Este efeito foi atribuído à secreção de prostaglandina E2 e TGF- $\beta$ 1. Os macrófagos após fagocitarem lipossomas de PS secretam mediadores anti-inflamatórios, diminuindo a produção de IL-1b, e aumentando a produção de IL-10 (Ma et al.<sup>23</sup> 2011, Wu et al.<sup>24</sup> 2010).

No modelo de perda óssea induzida por ligadura em ratos, a aplicação local e sistêmico de lipossomas de PS não preveniu a perda óssea alveolar. Após indução da perda óssea por ligadura, quase que imediatamente ocorre perda óssea (Gaspersic et al.<sup>41</sup> 2003). Os molares inclinam-se distalmente, assim como o osso interproximal é estreitado, resultando em uma constante remodelação do osso alveolar (Kuhr et al.<sup>60</sup> 2004).

A periodontite é um processo inflamatório crônico e infeccioso, onde a perda óssea local é mediada principalmente por linfócitos T, que são ativados pelas bactérias locais e passam a produzir mediadores (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e RANKL) que conduzem a um aumento na atividade dos osteoclastos já existentes além de estimularem a diferenciação de novos osteoclastos (Milward et al.<sup>4</sup> 2013, Kinane et al.<sup>38</sup> 2011, Demmer et al.<sup>39</sup> 2008, Kawai et al.<sup>40</sup> 2006, Nagasawa et al.<sup>42</sup> 2007, Kebschull e Papapanou<sup>67</sup> 2011). A presença de microrganismos patógenos leva a uma resposta inflamatória acentuada (Zijngel et al.<sup>3</sup> 2012), onde lipossomas de PS não promoveram a resolução da inflamação conforme o observado em modelos de inflamação como de artrites (Ma et al.<sup>23</sup> 2011). O objetivo do tratamento para doença periodontal é o controle da inflamação e a eliminação dos agentes etiológicos (microrganismos) presentes na periodontite. Nos processos inflamatórios periodontais, há grande influxo de polimorfonucleares, esse aspecto é visto somente na cavidade bucal, com a presença do dente e tecidos periodontais, onde o desafio bacteriano é constante (Cochran<sup>1</sup> 2008, Zijngel et al.<sup>3</sup> 2012, Kebschull e Papapanou<sup>67</sup>

2011). Considerando que lipossomas de PS mimetizam o efeito das células apoptóticas, isso poderia contribuir para uma modulação da resposta inflamatória, contribuindo para a prevenção da perda óssea alveolar, observada na periodontite (Redlich e Smolen<sup>5</sup> 2012, Ma et al.<sup>23</sup> 2011, Wu et al.<sup>24</sup> 2010). Portanto, uma das possíveis razões para que não fosse observado efeito de lipossomas de PS (local e sistêmico) pode ter sido devido à presença constante de bactérias na região dento-gengival. Lipossomas não apresentam efeito antimicrobiano, sendo assim, a sua ação anti-inflamatória, pode ter contribuído para uma maior ação das bactérias e seus componentes, aumentando a perda óssea alveolar (Lawrence et al.<sup>34</sup> 2002, Zhang et al.<sup>51</sup> 2006, Di Turi et al.<sup>68</sup> 2012, Petelin et al.<sup>69</sup> 2000).

Em nosso estudo, o grupo com tratamento de gel lipossomal de PS reduziu a permeabilidade vascular ao comparar com o veículo, demonstrando um menor exsudato inflamatório no tecido gengival, reforçando o potencial anti-inflamatório do lipossoma de PS. A permeabilidade vascular sofre alterações quando há inflamação, o exsudato contém mais proteínas plasmáticas. Para análise da permeabilidade vascular, utilizamos o corante azul de Evans, que se combina à albumina plasmática extravasando a barreira endotelial lesada. O exsudato plasmático em um tecido lesado eleva as taxas de azul de Evans neste tecido, resultado da reação inflamatória (Pochapski et al.<sup>61</sup> 2012, Sousa et al.<sup>62</sup> 2005, Gyorfi et al.<sup>63</sup> 1994).

A aplicação sistêmica da solução lipossomal de PS não alterou o perfil lipídico dos animais. Esta análise foi importante, considerando a composição de fosfolipídeos utilizada.

Vários parâmetros físico-químicos influenciam a absorção e a eliminação dos lipossomas da circulação sanguínea, dentre eles o tamanho das vesículas, a natureza dos componentes lipídicos, a carga elétrica da superfície, o reconhecimento pelo sistema complemento, reconhecimento pelos macrófagos e a via de administração (Shi et al.<sup>18</sup> 2007, Huynh et al.<sup>27</sup> 2002, Vonarbourg et al.<sup>70</sup> 2006). Trabalhos de desenvolvimento de novas formulações com objetivo terapêutico para várias doenças relatam a eficácia e a segurança dos tratamentos realizados com formulações lipossômicas, constatando uma grande vantagem em relação aos tratamentos convencionais (Harel-Adar et al.<sup>19</sup> 2011, Franz-Montan et al.<sup>48</sup> 2007, Franz-Montan et al.<sup>71</sup> 2012). Já são comercializadas formulações contendo lipossomas para o tratamento do câncer e infecções sistêmicas por fungos (Ghobrial et al.<sup>12</sup> 2005, Di Turi et al.<sup>68</sup> 2012, Petelin et al.<sup>69</sup> 2000).

A fosfatidilserina utilizada em nosso estudo é um fosfolípídeo presente no folheto interno da membrana celular (Hoffmann et al.<sup>14</sup> 2005, Shi et al.<sup>18</sup> 2007, Ma et al.<sup>23</sup> 2011, Wu et al.<sup>24</sup> 2010, Frasch et al.<sup>26</sup> 2000, Huynh et al.<sup>27</sup> 2002). Quando a célula sofre apoptose ocorre um rearranjo da disposição dos lipídios da membrana e a há exposição da fosfatidilserina que será reconhecida e captada por fagócitos (Ravichandran e Lorenz<sup>25</sup> 2007, Fadok et al.<sup>28</sup> 2000, Armstrong e Ravichandran<sup>29</sup> 2011), e consequente resposta anti-inflamatória que é desenvolvida por este processo (Huynh et al.<sup>27</sup> 2002). Portanto a fagocitose de uma célula apoptótica representa apenas o início de um processo ativo de resolução da resposta inflamatória (Liu et al.<sup>12</sup> 2006).

A modulação da resposta inflamatória na doença periodontal vem sendo estudo utilizando diferentes agentes como antimicrobianos em dose subclínica compostos naturais, estatinas, agentes anti-inflamatórios e ácido lipóico (Milward et al.<sup>4</sup> 2013, Di Turi et al.<sup>68</sup> 2012, Petelin et al.<sup>69</sup> 2000, Caton e Ryan<sup>72</sup> 2011, Grover et al.<sup>73</sup> 2013, Guimaraes et al.<sup>74</sup> 2012). Este é o primeiro estudo que faz uso de lipossomas de PS com o objetivo de modular a resposta inflamatória na perda óssea induzida por ligadura em ratos. Uma vez que a destruição de tecidos mediada pelo hospedeiro, deve ser controlada, os lipossomas PS mimetizariam o efeito das células apoptóticas e desencadeariam a diminuição da resposta inflamação por meio da liberação de citocinas anti-inflamatórias. Em nosso estudo os lipossomas de PS não reduziram a inflamação e a perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos. A presença constante das bactérias bucais pode ter sido um fator determinante no resultado encontrado. Portanto, diferentes formulações, vias de aplicação e o desafio microbiano devem ser considerados nos estudos de modulação da resposta inflamatória na doença periodontal.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo foi possível concluir que:

1. A obtenção do gel e solução lipossomal de fosfatidilserina é simples e baixo custo.
2. A formulação de lipossomas de fosfatidilserina não foi citotóxica, apresentando-se biocompatível.
3. A formulação de lipossomas de fosfatidilserina apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata (aplicação sistêmica).
5. A formulação de lipossomas de fosfatidilserina não apresentou efeito na prevenção da perda óssea induzida por ligadura em ratos com os dois métodos de aplicação (local e sistêmico).
6. A formulação de lipossomas de fosfatidilserina não alterou o perfil lipídico dos animais tratados.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008; Aug;79(8 Suppl):1569-76.
2. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; Jun;53:28-44.
3. Zijlge V, Ammann T, Thurnheer T, Gmur R. Subgingival biofilm structure. *Front Oral Biol*. 2012;15:1-16.
4. Milward MR, Chapple IL, Carter K, Matthews JB, Cooper PR. Micronutrient modulation of NF-kappaB in oral keratinocytes exposed to periodontal bacteria. *Innate Immun*. 2013;19(2):140-51.
5. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; Mar;11(3):234-50.
6. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*. 2004; Aug;31(8):596-603.
7. Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010; Jun;53:70-88.
8. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010; Jun;10(6):427-39.
9. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; Mar;9(3):231-41.
10. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 2008; Mar;44(3):205-21.
11. Liu G, Wu C, Wu Y, Zhao Y. Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation. *Scand J Immunol*. 2006; Jul;64(1):1-9.
12. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin*. 2005; May-Jun;55(3):178-94.
13. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001; Oct 2;11(19):R795-805.
14. Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, et al. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits

immune responses in vivo. *J Immunol.* 2005; Feb 1;174(3):1393-404.

15. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005; Dec;6(12):1191-7.

16. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue Cell.* 2001; Aug;33(4):318-25.

17. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000; Jan 13;403(6766):199-203.

18. Shi D, Fu M, Fan P, Li W, Chen X, Li C, et al. Artificial phosphatidylserine liposome mimics apoptotic cells in inhibiting maturation and immunostimulatory function of murine myeloid dendritic cells in response to 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in vitro. *Arch Dermatol Res.* 2007; Sep;299(7):327-36.

19. Harel-Adar T, Ben Mordechai T, Amsalem Y, Feinberg MS, Leor J, Cohen S. Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; Feb 1;108(5):1827-32.

20. Ramos GC, Fernandes D, Charao CT, Souza DG, Teixeira MM, Assreuy J. Apoptotic mimicry: phosphatidylserine liposomes reduce inflammation through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in vivo. *Br J Pharmacol.* 2007; Jul;151(6):844-50.

21. Mourdjeva M, Kyurkchiev D, Mandinova A, Altankova I, Kehayov I, Kyurkchiev S. Dynamics of membrane translocation of phosphatidylserine during apoptosis detected by a monoclonal antibody. *Apoptosis.* 2005; Jan;10(1):209-17.

22. Cocco RE, Ucker DS. Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol Biol Cell.* 2001; Apr;12(4):919-30.

23. Ma HM, Wu Z, Nakanishi H. Phosphatidylserine-containing liposomes suppress inflammatory bone loss by ameliorating the cytokine imbalance provoked by infiltrated macrophages. *Lab Invest.* 2011; Jun;91(6):921-31.

24. Wu Z, Ma HM, Kukita T, Nakanishi Y, Nakanishi H. Phosphatidylserine-containing liposomes inhibit the differentiation of osteoclasts and trabecular bone loss. *J Immunol.* 2010; Mar 15;184(6):3191-201.

25. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 2007; Dec;7(12):964-74.

26. Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, et al.

Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem.* 2000; Jul 28;275(30):23065-73.

27. Huynh ML, Fadok VA, Henson PM. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2002; Jan;109(1):41-50.

28. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000; May 4;405(6782):85-90.

29. Armstrong A, Ravichandran KS. Phosphatidylserine receptors: what is the new RAGE? *EMBO Rep.* 2011; Apr;12(4):287-8.

30. Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, et al. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem.* 2006; Feb 17;281(7):4326-33.

31. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998; Feb 15;101(4):890-8.

32. Urban BC, Willcox N, Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; Jul 17;98(15):8750-5.

33. Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol.* 2001; Jun 1;166(11):6847-54.

34. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002; Oct;2(10):787-95.

35. Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A. Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol.* 2002; Feb 15;168(4):1627-35.

36. Rowan AD, Koshy PJ, Shingleton WD, Degnan BA, Heath JK, Vernallis AB, et al. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum.* 2001; Jul;44(7):1620-32.

37. Legendre F, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol JP. Role of interleukin 6 (IL-6)/IL-6R-induced signal transducers and activators of transcription and mitogen-activated protein kinase/extracellular. *J Rheumatol.* 2005; Jul;32(7):1307-16.

38. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011; Mar;38 Suppl 11:44-8.
39. Demmer RT, Behle JH, Wolf DL, Handfield M, Kebschull M, Celenti R, et al. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. *J Periodontol*. 2008; Nov;79(11):2112-24.
40. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006; Sep;169(3):987-98.
41. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2003; Apr;38(2):198-203.
42. Nagasawa T, Kiji M, Yashiro R, Hormdee D, Lu H, Kunze M, et al. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000. 2007;43:65-84.
43. Gilbert LC, Rubin J, Nanes MS. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; May;288(5):E1011-8.
44. Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. *Cytokine*. 2003; Apr;22(1-2):33-41.
45. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; Sep 7;275(3):768-75.
46. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; May 15;423(6937):337-42.
47. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res*. 2003; Apr;38(2):223-6.
48. Franz-Montan M, Silva AL, Cogo K, Bergamaschi Cde C, Volpato MC, Ranali J, et al. Liposome-encapsulated ropivacaine for topical anesthesia of human oral mucosa. *Anesth Analg*. 2007; Jun;104(6):1528-31.
49. Torre-Amione G, Anker SD, Bourge RC, Colucci WS, Greenberg BH, Hildebrandt P, et al. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic



heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet*. 2008; Jan 19;371(9608):228-36.

50. Sliwa K, Ansari AA. Immunosuppression as therapy for congestive heart failure. *Lancet*. 2008; Jan 19;371(9608):184-6.

51. Zhang J, Fujii S, Wu Z, Hashioka S, Tanaka Y, Shiratsuchi A, et al. Involvement of COX-1 and up-regulated prostaglandin E synthases in phosphatidylserine liposome-induced prostaglandin E2 production by microglia. *J Neuroimmunol*. 2006; Mar;172(1-2):112-20.

52. Otsuka M, Tsuchiya S, Aramaki Y. Involvement of ERK, a MAP kinase, in the production of TGF-beta by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; Nov 26;324(4):1400-5.

53. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2010; May;235(1):172-89.

54. De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989; Mar;26(3-4):335-41.

55. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982; Mar;78(3):206-9.

56. Foletto VR, Martins MA, Tonussi CR. The involvement of potassium channels in the peripheral antiedematogenic effect of intrathecally injected morphine in rats. *Anesth Analg*. 2013; Jan;116(1):232-8.

57. Bentzen BH, Grauballe MCB, Björnsson MJ, Stoltze K, Hjørting-Hansen E, Holmstrup P. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. *Scand J Lab Anim Sci*. 2005;32(2):73-80.

58. Björnsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res*. 2003; Dec;38(6):543-50.

59. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res*. 2007; Jul-Sep;21(3):216-21.

60. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004; Apr;39(2):101-6.

61. Pochapski MT, Neto JL, Jassen JL, Farago PV, Santos FA. Effect of lidocaine- and prilocaine-based topical anesthetics on the inflammatory exudates in subcutaneous tissue of rats. *Anesth Prog.* 2012; Summer;59(2):57-61.
62. Sousa SM, Bramante CM, Taga EM. Biocompatibility of EDTA, EGTA and citric acid. *Braz Dent J.* 2005;16(1):3-8.
63. Gyorfi A, Fazekas A, Suba Z, Ender F, Rosivall L. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol.* 1994; Oct;21(9):601-5.
64. Niu X, Xing W, Li W, Fan T, Hu H, Li Y. Isofraxidin exhibited anti-inflammatory effects in vivo and inhibited TNF-alpha production in LPS-induced mouse peritoneal macrophages in vitro via the MAPK pathway. *Int Immunopharmacol.* 2012; Oct;14(2):164-71.
65. Huang Q, Yu H, Ru Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *J Food Sci.* 2010; Jan-Feb;75(1):R50-7.
66. Li YC, Xian YF, Ip SP, Su ZR, Su JY, He JJ, et al. Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis Herba* in animal models. *Fitoterapia.* 2011; Dec;82(8):1295-301.
67. Kebschull M, Papapanou PN. Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses. *J Clin Periodontol.* 2011; Mar;38 Suppl 11:17-27.
68. Di Turi G, Riggio C, Vittorio O, Marconcini S, Briguglio F, Funel N, et al. Sub-micrometric liposomes as drug delivery systems in the treatment of periodontitis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012; Jul-Sep;25(3):657-70.
69. Petelin M, Pavlica Z, Ivanusa T, Sentjurs M, Skaleric U. Local delivery of liposome-encapsulated superoxide dismutase and catalase suppress periodontal inflammation in beagles. *J Clin Periodontol.* 2000; Dec;27(12):918-25.
70. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Benoit JP. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials.* 2006; Aug;27(24):4356-73.
71. Franz-Montan M, de Paula E, Groppo FC, Silva AL, Ranali J, Volpato MC. Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012; Jan;50(1):60-4.
72. Caton J, Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res.* 2011; Feb;63(2):114-20.
73. Grover HS, Luthra S, Maroo S, Maroo N. The pleotropic role of statins: Could

it be the imminent host modulation agent in periodontics? Dent Res J (Isfahan). 2013; Mar;10(2):143-8.

74. Guimaraes MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C, Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. Innate Immun. 2012; Feb;18(1):155-63.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 31/2012**

**Protocolo UEPG – 18584/2012**

**Título – “Projeto de pesquisa intitulado “Lipossomas de fosfatidilserina: potencial intervenção farmacológica na inflamação e perda óssea alveolar induzida pela periodontite”.**

**Interessado – Letícia Antonelo Campos**

**Data de Entrada – 2/10/2012**

**Resultado: Aprovado**

**Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.  
1/10/2014**

**Considerações**

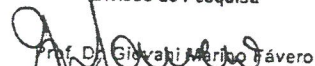
Prezado Professor,

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de 42 animais (em 7 grupos).  
Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para 90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo.**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Divisão de Pesquisa

  
Prof. Dr. Giovanni Marino Favero

Professor Dr. Giovanni Marino Favero  
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas  
Ponta Grossa – Paraná  
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP  
Fone: (042) 3220-3264