CAROLINA DE CARVALHO

Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em complexação com hidroxipropil–β–ciclodextrina e citotoxicidade

São Paulo

2014

CAROLINA DE CARVALHO

Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em complexação com hidroxipropil–β–ciclodextrina e citotoxicidade

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Clínica Integrada

Orientador: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Carvalho, Carolina de.
Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em complexação com hidroxipropil – β- ciclodextrina e citotoxicidade / Carolina de Carvalho; orientador Rodney Garcia Rocha. -- São Paulo, 2014.

98 p. : il. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Clínica Integrada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Anestésicos locais - Odontologia. 2. Anestesia odontológica. I. Rocha, Rodney Garcia. II. Título.

Carvalho C. Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em complexação com hidroxipropril-β-ciclodextrina e citotoxicidade. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Cada caminho percorrido por meus pés, por mais obstáculos que se mostrassem, estiveram sob a guarda de Deus, Nosso Senhor Onipotente, com intercessão de Maria, nossa Mãe e Senhora do céu, para os quais vai meu agradecimento especial. E mais que agradecer pelas oportunidades surgiram em minha caminhada, agradeço, sobretudo pelos anjos que encontrei, e que venho encontrando durante meus anos de vida: avós, pais, amigos, namorado, docentes. Por esses anjos acordo e luto a cada dia, nesses anjos encontro forças para continuar a caminhar.

Começo agradecendo e dedicando esse trabalho a meus pais a quem devo tudo, a eles que são a razão da minha vida e donos do meu amor mais puro e intenso. São os maiores presente de minha vida, meus espelhos, muito obrigada por tudo: educação, transferência de valores, respeito, noites em claro, preocupações, cuidados. Por não permitirem que nada faltasse a mim e a meus irmãos e, sobretudo, por garantirem amor em abundância. AMO MUITO VOCÊS!

A meus avós que não estão mais entre nós há alguns anos, mas que fazem parte dos meus momentos e lembranças mais doces. Meus avós paternos: Geraldo de Carvalho, com quem não pude conviver, mas conheço ótimas histórias e tenho boas referências e Juliana Barta de Carvalho, a minha amada “Vó Júlia”, que deixou um vazio enorme em nossas vidas, da qual tenho as melhores lembranças, ainda posso sentir o cheiro da comida dela e ouvir seu sorriso gostoso. Meus avós maternos: Geraldo Neves de Souza, nosso xodó, que fazia todas as vontades dos netos, mimava a gente sem medidas, e Carolina Maria de Jesus, minha xará, a “Vó Calú”, mulher de fibra, mas cheia de doçura. Com muita felicidade, aproveitamos cada segundo do tempo que Deus permitiu que estivessem entre nós.

A meus irmãos, Alek Sander de Carvalho e Renan de Carvalho, donos dos meus melhores anos, da minha infância, tão doce e alegre. Infância de muitas travessuras, muitas brigas (o Renan sempre envolvido nelas... rs), mas sempre com muita união. Quando crescemos, os caminhos tomaram rumos diferentes, mas saibam que vou amá-los por toda a minha vida, são responsáveis diretos pela formação da minha personalidade e caráter. Estarei sempre torcendo e pedindo a Deus pela vida de vocês. E o Renan, nos deu o maior presente de nossas vidas: a Iris, minha sobrinha (filha de coração), amada, por quem eu daria minha vida sem pestanejar.

Ao meu presente perfeito, meu grande amor, meu recentemente noivo: Renato Machado de Sobral, para quem uma vida é curta demais para agradecer. Tenho uma certeza nesta vida: o amor que sinto e recebo de você, e de que quero formar uma família junto a você. Muito obrigada por todo o amor, carinho, companheirismo, amizade e dedicação a mim, agradeço a Deus todos os dias por nossos caminhos terem se encontrado. TE AMO!

A meus queridos sogros, Amara Ferreira de Sobral e Claudenor Machado de Sobral, por todo o carinho, amor e acolhida.

A meus tios (as), especialmente: Paulo de Carvalho e Arlete Mathias de Carvalho, Cida Carvalho, Helvio de Jesus Souza e Imaculada Santos Souza, Maria Aparecida Souza e José Benedito (Neco), e em memória de Maria das Graças (Tia Graçinha). A todos os meus primos (as), sobretudo: Júlio, Fernando, Duda, Paulinho, Silvinha, Patrícia, Juninho, Luciano e Luciana, meus companheiros de infância.

A meus padrinhos: Janete Stefano Porto e Luiz Alberto Brito Porto por serem sempre tão amáveis e dedicados, por entenderem o verdadeiro significado do que é ser madrinha e padrinho.

A meus amigos tão queridos e especiais, meus anjos: Karina Stefano Porto, minha irmãzinha de coração, desde que tínhamos 5 anos, que traz leveza e inocência à minha vida; Josy Malone Simões Gomes, pela amizade e amor que nem mesmo o tempo e a distância são capazes de apagar; Miriam Ben Aluch Gonzalez Barcello e sua família linda (Diógenes e Natália): foram tantas histórias juntas que não caberia aqui, amo vocês demais, minha irmã; Lila Yucari Miyahira, minha companheira de aventuras, sofremos tanto juntas para passar no vestibular e essa amizade, e esse amor, e a torcida pelo sucesso de uma para a outra, e as orações, persistem e vão durar para sempre... “e ficaremos ricas” (rs); Tatiana Veríssimo, a minha matusquela, que dá cor e diversão à minha vida, te “amodoro”; Lilian Lima do Nascimento, o que falar de você e do Mô (Carlos Henrique do Nascimento)? Vocês me deram o maior presente da minha vida: seu primogênito, a grande paixão da minha vida, o meu Lucas, meu afilhado lindo e doce... a você minha irmã de coração, meu muito obrigada, te amo muito...e de brinde, ainda ganhei uma estrelinha, o Leonardo; Regina da Silva, exemplo de mulher, amiga, filha, mãe, luta... te amo; Aline e André, primos, amigos recentes mas tão especiais, pelos quais sinto tanto amor e que nos deram de presente a convivência com nosso anjinho Gabriel; à Elaine, pelo carinho, cuidado, amizade, acolhida, compreensão e apoio sem o qual

ficaria muito mais difícil esta caminhada... te amo e admiro imensamente, amiga... Muitíssimo obrigada por tudo.

À minha Japanela linda, e agregrados (rs)...donos dos meus melhores anos na FOUSP, dos meus melhores risos, companheiros de graduação e torcida certa pela minha felicidade: Débora Paes Macedo (minha irmãzinha do coração), Bruno Eiti Wakamoto (Toru, meu irmão), Bruno Nakanishi, Milena Keiko Tago, Luciane Madruga de Matos (Liãozinha), Camila Ferreira Kawakita, Fernanda Kaneko, Denise Moral Nakamura, Victor Pedro Chung, Marcelo de Souza Quinelato, Karime Elias, Mariana Marin Monteiro, Carla Petrone, e Isabella Tomazelli... Muito obrigada, amo vocês.

Aos funcionários e docentes do departamento de Odontopediatria da FOUSP, por todo o carinho, pelo despertar da paixão pela pesquisa. Aos professores: José Carlos Pettorossi Imparato, Daniela Prócida Raggio, Fausto Medeiros Mendes e Mariana Minatel Braga Fraga, muito obrigada pelo carinho. Aos funcionários: Julio César de Lima Farias, Maria de Fátima Pereira da Silva, Marize Morais de Paiva, Annelry Costa Serra Xavier e Antonio Carlos Lopes da Silva, muito obrigada pela amizade.

A todos os funcionários da SDO – FOUSP, com os quais tive a honra de fazer monitoria por 2 anos durante a minha graduação.

A Rita Diná Pires Mascarenhas, minha mãe na odonto USP e à Nynna Mascarenhas, minha tia. Amo vocês demais e prometo que não as deixarei em paz para todo o sempre... rs.

A todos os docentes do departamento de Estomatologia, em especial aos da Disciplina de Clínica Integrada: Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, Prof. Dr. Waldyr Antonio Jorge, Profa. Dra. Isabel de Freitas Peixoto, Prof. Dr. José Leonardo Simone, Prof. Dr. Mário Sérgio Soares, Prof. Dr. Flávio Eduardo Guillin Perez, Profa. Dra. Inês Aparecida Buscariolo e Prof. Dr Marcelo Munhóes Romano, obrigada pela oportunidade. Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Alberto Adde, pelo carinho, confiança e apoio desde a graduação, quando foi meu professor de corredor.

Às professoras Profa. Dra. Sibele Sarti Penha Profa. e Dra. Carina Domaneschi, pela gentileza em dividir a sala, pelos ensinamento, pelas risadas... enfim pela amizade... serei sempre agradecida.

Á minha mentora e amiga, aquela que desperta em mim a gana por conhecimento: Profa. Dra. Maria Aparecida Borsatti. Obrigada pela paciência,

ensinamentos, dedicação, carinho, acolhida e confiança... Obrigada pela oportunidade, por abrir boas portas, por querer sempre o melhor para seus alunos, por tratar-nos como filhos.

As queridíssimas funcionárias: Regina Maria da Conceição Santos e Maria Cecilia Forte Muniz, pelo carinho, cuidado e amizade.

A todos os meus colegas da pós-graduação, atuais e egressos: Maurício José Tornelli, Thiago Pallin Gomes, Patrícia Aulestia Viera, Talita Carnaval, Roberta Sampaio, Julia Smanio, Cristina Kassab, Henrique Bauer, muito obrigada.

Ás queridas: Valdirene dos Santos, Helena Regina Tornelli e Kazue Kanegane,muito obrigada pela amizade, companheirismo e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro durante o decorrer do curso de mestrado.

Ao Profº Dr. Rodney Garcia Rocha, pelo exemplo de liderança, pela disponibilidade em ajudar, por abrir as portas da disciplina de Clínica Integrada me concedendo a oportunidade de compor o quadro de pós-graduação. Meus sinceros agradecimentos!

À Profª Marinilce Fagundes dos Santos, e a todos do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, por toda a paciência, carinho e dedicação. Por dividir tão gentilmente o laboratório e estar sempre pronta a nos auxiliar e transmitir conhecimento.

À Gabriella Moraes Malheiros, técnica do ICB-USP, por toda a paciência, didática, amizade e disposição em ensinar.

À Profª Maria Esperanza Cortés Segura e à doutoranda Alinne Damásia Gomes, da UFMG: pelo auxílio, parceria, ensinamentos e fabricação dos fármacos utilizados.

Aos amigos Camila Ferreria Kawakita, Victor Oliveira Murakami e Andréia Neves de Oliveira, pela ajuda e parceria no desenvovimento dos trabalhos que envolvem esta linha de pesquisa: muitíssimo obrigada.

A todas as funcionárias do setor de pós-graduação pelo apoio e oportunidade.

E, novamente, agradeço de todo o coração à Profª Maria Aparecida Borsatti, por toda a experiência adquirida, por todo o conhecimento incorporado e pela amizade. Por fazer questão de participar de cada etapa, com total dedicação, ensinando e fazendo questão de aprender coisas novas. Serei eternamente grata por sua companhia nesta etapa da minha carreira.

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver"

Martin Luther King.

RESUMO

Carvalho C. Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em complexação com hidroxipropil –β-ciclodextrina e citotoxicidade [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O uso da enzima hialuronidase como adjuvante do anestésico local está consagrado em oftalmologia, por melhorar a eficácia anestésica devido ao seu efeito difusor de fármacos, ocasionado pela quebra temporária do hialuronan (ácido hialurônico) que é o principal constituinte de tecidos conectivos. Em odontologia, a utilização da enzima como adjuvante no bloqueio do nervo alveolar inferior não apresentou vantagens quando injetada concomitante ao anestésico local, resultando em dor e trismo. Entretanto, com a utilização de um novo protocolo onde a aplicação da hialuronidase ocorria aos 30 min do início da anestesia, prolongou o efeito anestésico e sem ocorrência de efeitos adversos. Este protocolo oferecia a vantagem de evitar complementação anestésica reduzindo os riscos de toxicidade local e sistêmica, porém ainda havia a desvantagem da necessidade de uma nova puntura para aplicação da enzima. Surgiu a hipótese de se manter os benefícios desse protocolo com o uso da hialuronidase, de prolongar a duração da ação anestésica, injetando-a concomitantemente ao anestésico local, porém estando a enzima em um sistema de liberação lenta. Deste modo, a hialuronidase (75 UTR/ml) foi incorporada a uma nanopartícula, a hidroxipropil-β-ciclodextrina, que atrasaria sua biodisponibilidade e simularia o protocolo da injeção antes do término da ação anestésica. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a eficácia do complexo de inclusão hialuronidase: hidroxipropil-β-ciclodextrina injetado concomitantemente ao anestésico local, em prolongar a duração de ação do bloqueio nervoso funcional, a fim de oferecer uma alternativa futura de solução anestésica em procedimentos clínicos demorados ou para o alívio de dor, principalmente, em pacientes com comprometimento sistêmico cuja utilização de vasoconstritor adrenérgico ou anestésico de ação prolongada esteja contraindicada. Também foi avaliada a citotoxicidade do novo sistema carreador, o complexo de inclusão hialuronidase: hidroxipropil-β-ciclodextrina. O bloqueio funcional sensitivo, motor e proprioceptivo do nervo ciático de ratos foi avaliado através de reflexo de retirada da pata e pinçamento, reflexo extensor tibiotarsal e claudicação, e resposta de salto. A

citotoxicidade foi avaliada através do teste contagem por Azul de Tripan em fibroblastos e de hemólise em eritrócitos, ambos de rato. Os grupos onde o complexo de inclusão hialuronidase:hidroxipropil-β-ciclodextrina foi injetado concomitantemente ao anestésico local apresentaram aumento significativo em comparação a todos os demais. O complexo de inclusão não se apresentou citotóxico, mas quando associado à lidocaína, manteve a citotoxicidade desta. Nenhum efeito hemolítico foi observado nas concentrações utilizadas para enzima, o complexo de inclusão e para a lidocaína.
Palavras-chave: Anestésico Local. Hialuronoglicosaminidase. Adjuvantes Anestésicos. Anestesia. Ciclodextrina.

ABSTRACT

Carvalho C. Functional analysis of rat sciatic block with lidocaine associated to hyaluronidase in complexation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and cytotoxicity. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

The use of hyaluronidase as an adjuvant to local anesthetic is established in ophthalmology anesthesia to improve the effect of the drugs due to its spreading effect caused by a temporary break of hyaluronan (hyaluronic acid), which is the main component of connective tissue. In dentistry, the use of the enzyme as adjuvant in inferior alveolar nerve blockade was not advantageous when injected concomitantly with local anesthetic, resulting in pain and trismus. However, when the enzyme was injected before the end of nervous block, the anesthetic effect was extended and had no adverse effects. This protocol offered the advantage of avoiding anesthetic supplementation and reduces the risk of local and systemic toxicity, but there was still the disadvantage of receiving a new puncture to inject the enzyme. It has been hypothesized to maintain the benefits of this protocol with the use of hyaluronidase, to extend the duration of anesthetic action, injecting the hyaluronidase concomitantly with the local anesthetic, but the enzyme should be in a slow release system. Thus, hyaluronidase (75 TRU/ml) was incorporated into a nanoparticle, hydroxypropyl - β - cyclodextrin, which would delay its bioavailability and simulate the protocol of the injection before the end of anesthetic action. This study aimed to determine the efficacy of inclusion complex hyaluronidase: hydroxypropyl - β - cyclodextrin injected concomitantly with the local anesthetic to extend the duration of action of functional nervous block, to offer a future alternative of anesthetics to the clinical prolonged procedures or to relieve the pain, mainly in patients with systemic compromising whose the use of adrenergic vasoconstrictor or long-acting anesthetic are contraindicated. The cytotoxicity of the inclusion complex hyaluronidase: hydroxypropyl- β -cyclodextrin was also evaluated. The nociceptive, motor and proprioceptive functional blockade of the sciatic nerve in rats was assessed by paw withdrawal reflex and clamping (pinprick), tibiotarsal extensor reflex response and claudication, and jumping response, respectively. The cytotoxicity was assessed through cell viability test by Trypan blue counts of fibroblasts and hemolysis test, both in rat cells. Groups where the inclusion complex hyaluronidase :

hydroxypropyl - β - cyclodextrin was injected concomitantly to the local anesthetic showed a significant increase of duration of anesthetic action compared to the others. The plain inclusion complex showed no cytotoxicity, but when associated with lidocaine, the cytotoxicity of this was maintained. None haemolytic effect was observed for the concentration used to the groups hyaluronidase, inclusion complex and lidocaine.
Keywords: Local anesthetic. Hyaluronoglucosaminidase. Adjuvants, Anesthesia, Cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Classificação das isoformas da hialuronidase segundo Meyer.....26

Figura 2.2 - Representação da quebra da ligação β-1,4 glicosídica, entre o ácido glucurônico e a N-acetilglicosamina pela hialuronidase.....27

Figura 2.3 - Esquema comparativo do perfil da concentração plasmática de fármaco em função do tempo e número de doses, para a administração de formulações pela via convencional versus sistema de liberação controlada.....33

Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura tronco cônica das ciclodextrinas naturais: α, β e γ-ciclodextrina.....34

Figura 2.5 - Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais: α, β e γ-ciclodextrina.. 35

Figura 2.6 - Representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre a ciclodextrina e o hóspede.. 37

Figura 4.1 - Distribuição dos grupos em triplicada nas placas de 6 poços. Relação da quantidade de soluções em cada poço de células.....52

Figura 4.2 - Ilustração das células vistas ao microscópio óptico para contagem em câmara de Neubauer utilizando o teste de exclusão por Azul de Tripan.....54

Figura 4.3 - (A) Rotador Barnstead Lab-Line 2314 Multi-Purpose e (B) centrífuga Eppendorf 5415..... 56

Figura 4.4 - Microplacas de 96 poços preparadas para leitura em espectrofotômetro..... 57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Histograma indicando valores médios ± EP do tempo de latência para o bloqueio sensitivo em nervo ciático e análise estatística. 59

Gráfico 5.2 - Histograma indicando valores médios ± EP da duração do bloqueio sensitivo em nervo ciático. 61

Gráfico 5.3 - Valores médios (gramas) da intensidade de pressão (peso) suportada para ocorrer o RRP, após estímulo nociceptivo ao longo do tempo nos grupos, ou seja, durante bloqueio sensitivo. 62

Gráfico 5.4- Valores médios (escore) obtido para análise de bloqueio sensitivo após o teste de pinçamento (bloqueio completo escore 3, parcial 2, ausência 1) ao longo do tempo nos grupos.....62

Gráfico 5.5 - Histograma indicando valores médios ± EP do tempo de latência para o bloqueio motor em nervo ciático e análise estatística.. 64

Gráfico 5.6 - Histograma indicando valores médios ± EP da duração do bloqueio motor em nervo ciático. 66

Gráfico 5.7 - Valores médios (escore) obtido para análise de bloqueio motor (bloqueio completo escore 3, parcial 2, ausência 1) pela ausência do reflexo extensor postural ao longo do tempo nos grupos.....66

Gráfico 5.8 - Histograma indicando valores médios ± EP do tempo de latência para o bloqueio proprioceptivo em nervo ciático e análise estatística.....68

Gráfico 5.9 - Histograma indicando valores médios ± EP da duração do bloqueio proprioceptivo em nervo ciático.....70

Gráfico 5.10 - Valores médios (escore) obtidos pela análise de bloqueio proprioceptivo (bloqueio completo: escore 3, parcial: 2, ausência de resposta: 1) pela ausência de resposta de salto da pata ao longo do tempo nos grupos.....70

Gráfico 5.11 - Histograma indicando valores médios ± EP do percentual de células mortas através da análise da viabilidade celular de contagem por Azul de Tripan nos tempos de 1, 6, e 12 h para os grupos estudados e análise estatística.....72

Gráfico 5.12 - Gráfico de linhas indicando o percentual de hemólise em eritrócitos de ratos após exposição à lidocaína, hialuronidase, HP-β-CD, CI 1:1, CI 2:1 comparado aos controles C1 (hemólise mecânica - PBS) e C2 (hemólise total - água destilada). 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Derivados da β-ciclodextrina de uso industrial. 36

Tabela 5.1- Média ± EP do tempo de demora para início e instalação do bloqueio sensitivo (min) nos grupos estudados 58

Tabela 5.2- Média aritmética ± EP do bloqueio sensitivo (min), tamanho da amostra e análise estatística nos grupos estudados..... 60

Tabela 5.3- Média ± EP do tempo de demora para início e instalação do bloqueio motor (min) nos grupos estudados..... 63

Tabela 5.4- Média aritmética ± EP do bloqueio motor (min), tamanho da amostra e análise estatística nos grupos estudados..... 65

Tabela 5.5- Média ± EP do tempo de demora para início e instalação do bloqueio proprioceptivo (min) nos grupos estudados 67

Tabela 5.6- Média aritmética ± EP do bloqueio proprioceptivo (min), tamanho da amostra e análise estatística nos grupos estudados..... 69

Tabela 5.7- Média das absorbâncias de amostras contendo os fármacos nos diferentes volumes analisados: lidocaína 2%, hialuronidase, HP-β-CD e CI 1:1..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	absorbância
AL	anestésico local
°C	graus Celsius
CD	ciclodextrinas
CI	complexo de inclusão
CIn	células inviáveis
conc	concomitantemente
CO_2	dióxido de carbono
cm^2	centímetro quadrado
CV	células viáveis
C1	controle de hemólise mecânica (branco)
C2	controle de hemólise total
C_{50}	concentração que induz 50% de hemólise
CI_{50}	concentração que induz 50% de morte celular
C_{prot}	concentração protetora
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsufóxido
dl	decalitro
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
FDA	food and drug administration
g	grama
g/s	gramas por segundo
*x*g	gravidade
GAG	glicosaminoglicanas
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolSulfônico
HIA	hialuronidase
H	hora
HP-β-CD	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina
Kg	quilograma
l	litro

LDC	lidocaína
MC	meio de cultura
mg	miligrama
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
nm	nanômetros
NEAA	non-essential amino acids
PBS	phosphate buffered saline
PCT	patent cooperation treaty
PI	propriedade intelectual
PsA	pseudopterosina A
RPM	rotações por minuto
RRP	reflexo de retirada da pata
RS(±)	bupivacaína racêmica
SFB	soro fetal bovino
S(-)	bupivacaína levógira
TA	total de células na amostra
TRU	turbidity relative unit
UTR	unidade de turbidade relativa
vc	vasoconstritor
µl	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
>	maior

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 REVISÃO DA LITERATURA 23
3 PROPOSIÇÃO 43
4 MATERIAL E MÉTODOS 44
5 RESULTADOS 58
6 DISCUSSÃO 75
7 CONCLUSÕES 85
REFERÊNCIAS 86
ANEXOS 98

1 INTRODUÇÃO

A enzima hialuronidase (HIA) tem sido amplamente utilizada como adjuvante do anestésico local (AL), sobretudo em oftalmologia, graças ao seu efeito difusor que é responsável por melhorar a eficácia do efeito anestésico (Dempsey et al., 1997). Este efeito é devido à quebra temporária do hialuronan ou ácido hialurônico (Khorlin et al., 1973; Watson, 1993; Dempsey et al., 1997; Farr et al., 1997; Hynes; Walton, 2000; Dunn et al., 2010), o principal polímero glicosaminoglicano de tecidos conectivos. Age clivando de modo reversível a ligação ß-1,4 glicosídica entre o ácido glucurônico e a N-acetilglucosamina, diminuindo a viscosidade da matriz extracelular, facilitando a difusão do anestésico local, e tem se mostrado segura, não exercendo influência negativa, inclusive, no processo de cicatrização (Wohlrab et al., 2012).

Em odontologia, a HIA (150 UTR/ml) não apresentou vantagem quando injetada concomitantemente ao AL em bloqueio do nervo alveolar inferior (Ridenour et al., 2001), pois supõe-se que a injeção da enzima no momento em que o AL estava em alta concentração permitiu a difusão do mesmo para os tecidos adjacentes, não prolongou a duração de ação, causando ainda dor e trismo.

Entretanto, em outro protocolo, quando a HIA (75 UTR/ml) foi injetada não concomitante, mas antes do término da anestesia local, aos 30 minutos do início do bloqueio do nervo alveolar inferior, induziu aumento significativo da duração de anestesia (Tempestini-Horliana et al., 2008), o mesmo ocorrendo na anestesia para tratamento de pulpite em outro estudo (Satish et al., 2013). Neste momento, provavelmente, o AL já estava em menor concentração, prolongando a duração anestésica sem induzir os efeitos adversos (Tempestini-Horliana et al., 2008). Com este protocolo, evita-se a necessidade de complementação anestésica, diminuindo o risco de toxicidade sistêmica pelo AL, o que é vantajoso para todos os pacientes e principalmente para aqueles com condição sistêmica que contraindique a utilização de vasoconstritor adrenérgico ou anestésico de ação prolongada. Contudo, havia nesse protocolo o inconveniente para o paciente de ter que receber uma nova puntura da agulha para se injetar a HIA antes do regresso do efeito anestésico.

Surgiu a possibilidade de se manter os benefícios do uso da HIA para prolongar a duração anestésica, porém, sem ter que injetá-la antes do término da

anestesia, injetando-a concomitantemente ao AL, em um sistema de liberação tardia. Deste modo, a HIA foi incorporada a uma nanopartícula, a 2-hidroxipropil-ß-ciclodextrina (HP-ß-CD), formando o complexo de inclusão HIA:HP-ß-CD, já caracterizado físico-quimicamente por Murakami (2012). Esse sistema de liberação controlada retardaria a disponibilidade da HIA para que sua ação enzimática ocorresse ao término da anestesia, possibilitando a difusão do anestésico tardiamente e, portanto, simulando o protocolo da injeção da HIA aos 30 minutos.

A contribuição deste trabalho para a literatura está na verificação da eficácia de um novo sistema carreador para liberar o agente difusor (HIA), que quando associado ao AL, prolongaria a ação anestésica, além da análise da citotoxicidade do complexo de inclusão (CI) HIA:HP-ß-CD isolado ou associado ao AL.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Para procedimentos clínicos mais prolongados, mesmo em odontologia, se utiliza anestésicos locais de ação intermediária associado a um adjuvante vasoconstritor, o que resulta com frequência na necessidade de complementação anestésica para cobrir o procedimento sem dor. Já os anestésicos locais de longa duração estão indicados não somente pela maior duração de ação, mas também quando se deseja analgesia pós-operatória (Groban; Dolinski, 2001; Parirokh et al., 2012; Sampaio et al., 2012). Contudo, para pacientes com comprometimento sistêmico que apresentam contraindicação relativa ou principalmente absoluta de utilização de vasoconstritores adrenérgicos (Pérusse et al., 1992) ou a anestésicos locais mais cardiotóxicos, como a bupivacaína não há alternativa segura para realização de procedimentos clínicos demorados (Ogle; Mahjoubi, 2012). O risco de toxicidade pode ser potencializado quando da ocorrência de acidente de injeção intravascular (Weinberg, 2002). Mesmo os anestésicos locais de longa duração considerados mais seguros como o enantiômero S da bupivacaína, levobupivaína, e seu correspondente estrutural, a ropivacaína, ainda apresentam maior cardiotoxicidade se comparados a lidocaína, comprovados em animais (bupivacaína> levobupivacaína> ropivacaína> lidocaína em injeção intravascular) (Groban; Dolinski, 2001).

Deste modo, a literatura busca a utilização de adjuvantes não adrenérgicos para melhorar a eficácia e segurança de anestésicos locais de ação intermediária, como a lidocaína, associada, por exemplo, ao bicarbonato de sódio, a clonidina, aos opióides (Carnaval et al., 2013; Borghi et al., 2013; Adams, 2011), a hialuronidase (Adams, 2011), a sistemas de liberação lenta, e como neste estudo a combinação destes últimos, sistema de liberação lenta de hialuronidase.

A seguir uma revisão contemplando a ação da enzima hialuronidase e de sua utilização como adjuvante de anestésico local, bem como, da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina na obtenção de sistemas de liberação controlada.

2.1 Ácido hialurônico e hialuronidase

As principais classes de macromoléculas que compõem a matriz extracelular são as glicosaminoglicanas (GAG), proteoglicanas e as adesinas. As GAG juntamente com as proteoglicanas formam uma matriz hidratada, um gel consistente onde as proteínas estão embebidas, e que possui o papel de regular o processo de difusão de substâncias do meio extracelular para o intracelular (Cooper; Hausman, 2009).

Uma das principais GAG que compõe a matriz extracelular, sobretudo no tecido conjuntivo frouxo, é o ácido hialurônico (ou hialuronan). O ácido hialurônico apresenta a capacidade de interagir com diferentes receptores incluindo proteínas da superfície celular e proteoglicanos (Hynes; Walton, 2000; Salmen, 2003; Alberts et al., 2004; Noble, 2011; Siiskonen, 2013), e desempenha papel fundamental na formação e consolidação da matriz extracelular (Tammi et al., 2002). Também atua no comportamento celular, no que diz respeito à migração e morfogênese, (Heldin, 2003) e no processo de cicatrização ao estimular inflamação e em seguida, participar de sua modulação (Chen; Abatangelo, 1999). Hoje se sabe que o ácido hialurônico é liberado diretamente da superfície celular por um complexo enzimático embebido na membrana plasmática, enquanto que outras GAG são sintetizadas dentro da célula e liberadas por exocitose (Alberts et al., 2004; Noble et al., 2011).

A degradação do ácido hialurônico é mediada principalmente pela enzima hialuronidase (HIA), identificada inicialmente por Duran em 1929 que descreveu um “fator de difusão” de substâncias quando da injeção concomitante com certas vacinas, tinturas e toxinas, subcutaneamente. O fator de difusão descrito foi posteriormente identificado como uma enzima, e a seguir, outros autores relataram que a difusão se devia à quebra do ácido hialurônico (Watson, 1993; Farr et al., 1997; Hynes; Walton, 2000; Salmen, 2003).

A HIA, também chamada de hialuronoglucosaminidase, quebra a barreira intersticial presente entre as células ao clivar a ligação glicosídica ß- 1,4, entre o ácido glucurônico e a N-acetilglucosamina (Lee et al., 2010; Hynes, Walton, 2000; Watson, 1993; Farr et al., 1997). Esta quebra promove uma diminuição da viscosidade da matriz extracelular, sendo esta ação reversível, pois a estrutura do tecido é restabelecida (Adams, 2011). Sabe-se que aproximadamente um terço de

todo o ácido hialurônico, presente nos diversos tecidos humanos, é renovado por dia, sendo essa renovação variável para cada tipo da enzima e do tecido alvo (Tammi et al., 2002).

A HIA é encontrada nos tecidos de todos os vertebrados (Hofinger et al., 2007), desempenhando funções diversas, e também em bactérias patogênicas, tais como *Streptococcus* e *Pasteurella* (Heldin, 2003; Lee et al., 2010), além de alguns tipos de fungos e animais invertebrados (Salmen, 2003; Farr et al., 1997).

De acordo com o mecanismo hidrolítico, Meyer (1971) classificou cada isoforma nas seguintes classes: HIA de mamíferos ou testiculares, que quebram o na ligação β-1,4 glicosídica o hialuronan , a condroitina e o sulfato de condroitina (Belém-Gonçalves et al., 2006), tendo como produtos, sobretudo, tetra e hexassacarídeos; há um segundo grupo denominado HIA de sanguessuga que quebra exclusivamente a ligação β-1,3, não tendo ação sobre outras glicosaminoglicanas, e que também apresenta como produto tetra e hexassacarídeos; e, por fim, HIA microbiana que catabolíza a ligação β-1,4 glicosídica obtendo oligossacarídeos insaturados, conforme ilustrado na figura 2.1. (Muckenschnabel et al., 1998; Girish; Kemparaju, 2007).

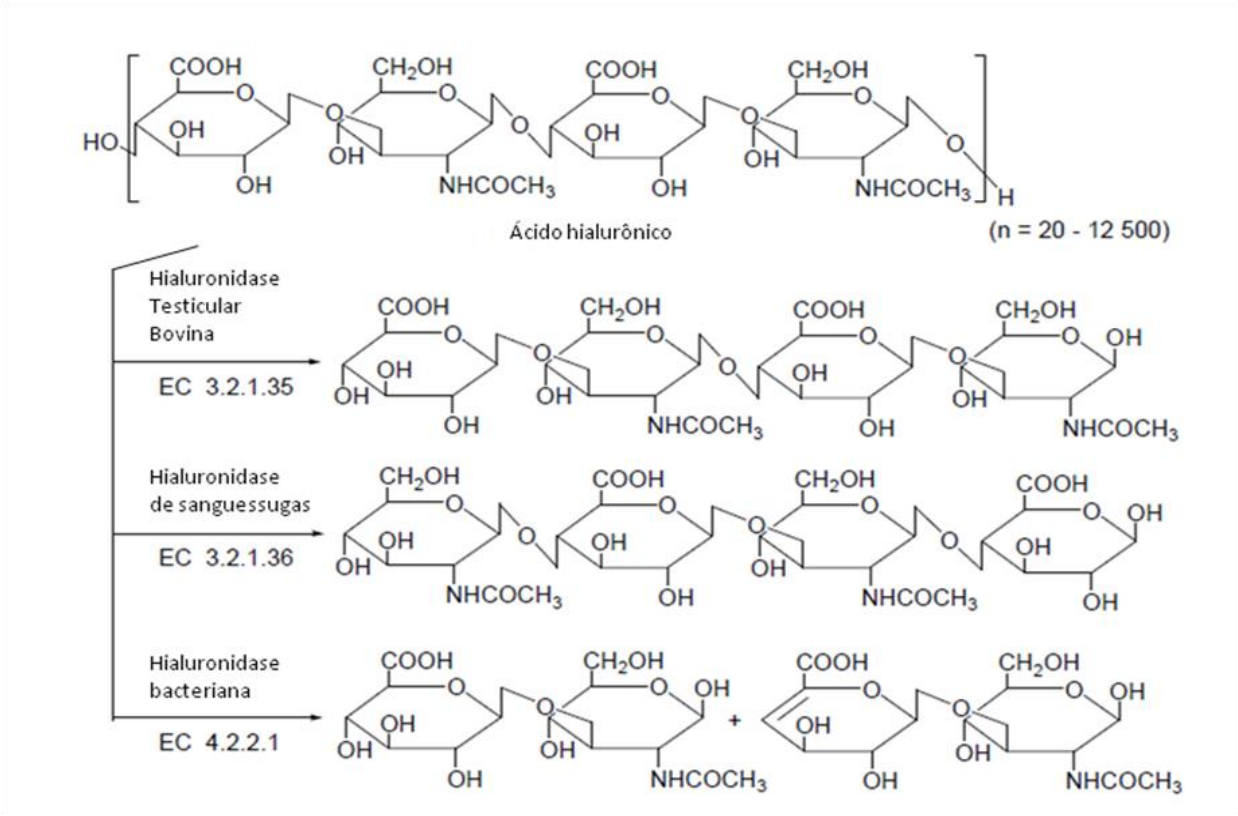


Figura 2.1 - Classificação das isoformas da hialuronidase segundo Meyer (1971). (Adaptado de Muckenschnabel et al., 1998)

Em seres humanos existem ao menos 6 tipos identificados da enzima: HIA 1, HIA 2, HIA 3, HIA 4, PH-20 e PI, sendo a expressão de cada isoforma regulada por citocinas e fatores de crescimento. A HIA 1 é encontrada com predominância em órgãos como fígado, coração, rins e baço (Noble et al., 2011). A HIA 2 é encontrada em todos os tecidos humanos, exceto em cérebros adultos; a HIA 3 está presente em condrócitos, testículos, medula óssea e em alguns tipos de câncer mamário; HIA 4 é expressa na placenta e músculos esqueléticos (Csoka; Stern, 2013). Outros tecidos nos quais é possível identificar a presença de HIA são: olhos, pele, órgãos do sistema reprodutor feminino (ovário e útero), secreções nasal e lacrimal, porção posterior da hipófise (Watson, 1993; Farr et al., 1997). Nos espermatozoides, a PH-20 exerce um importante papel na fertilização dos mamíferos, inclusive em humanos (Heldin, 2003; Salmen, 2003; Farr et al., 1997). Suas isoformas apresentam em torno de 40% de similaridade e acredita-se que haja semelhança em sua ação para a degradação do ácido hialurônico (Heldin, 2003).

Atualmente, os tipos de HIA disponíveis comercialmente são: testicular bovina purificada, testicular ovina purificada e, a mais recente, HIA recombinante humana, produzida a partir de DNA recombinante (Lee et al., 2010).

O tipo mais utilizado em anestesia oftalmológica é a testicular bovina (Belém-Gonçalves et al., 2006), hialuronato-4-glicanohidrolase, a mesma que utilizamos neste estudo (Figura 2.2).

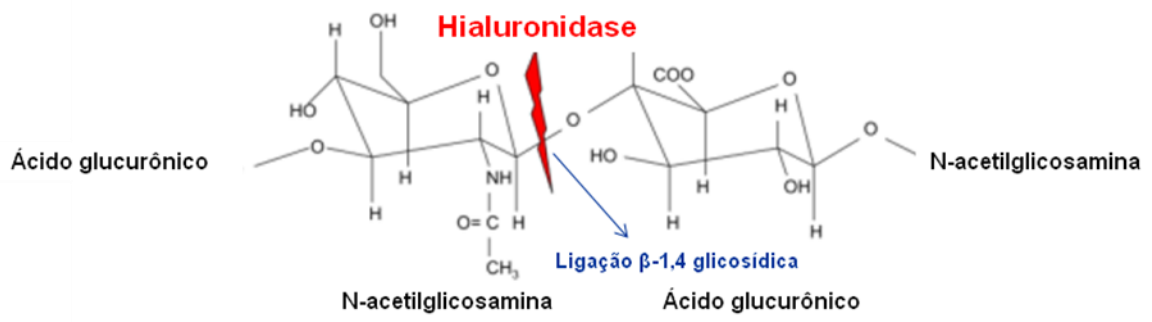


Figura 2.2 - Representação da quebra da ligação β-1,4 glicosídica, entre o ácido glucurônico e a N-acetilglicosamina, pela hialuronidase. (Adaptado de Lee et al., 2010)

2.1.1 Hialuronidase em anestesia oftalmológica

A HIA causa a diminuição da viscosidade da matriz extracelular facilitando, deste modo, a difusão de substâncias injetadas, concomitantemente a ela, através dos tecidos (Khorlin et al., 1973; Watson, 1993; Farr et al., 1997; Hynes; Walton, 2000; Girish; Kemparaju, 2007; Necas et al., 2008; Wohlrab et al., 2012).

Esta enzima tem sido utilizada em diversas áreas para fins terapêuticos, tais como: ortopedia, oncologia, ginecologia e cirurgia (Girish; Kemparaju, 2007), mas não em associação a anestésicos locais. É em oftalmologia que a enzima tem seu uso consagrado como adjuvante dos anestésicos locais há mais de 4 décadas, por melhorar a eficácia anestésica, tendo maior êxito nessa área médica pelo fato do globo ocular apresentar uma delimitação anatômica óssea, configurando um leito fechado, restringindo a área de ação do anestésico no local. Em outros nervos periféricos, o uso concomitante da HIA ao AL não melhorou a eficácia do bloqueio

por se tratar de leitos mais abertos, facilitando a difusão do AL também para tecidos adjacentes (Sarvela; Nikki, 1992).

Ainda, acelera a taxa de absorção do anestésico local (Lee et al., 2010) e pode promover alcalinização do meio o que pode explicar a rápida instalação da anestesia (menor latência), quando injetada concomitantemente (Adams, 2011).

As vias de administração da HIA podem ser tópica, intradérmica ou intramuscular, não sendo aconselhável a aplicação via intravenosa, pois a enzima é rapidamente inativada no sangue (mecanismos ainda desconhecidos) (Lee et al., 2010). A HIA é rapidamente eliminada do plasma, comprovado por Menzel e Farr (1998) após injeção intravascular de 5000 UI/Kg de peso, onde não foi encontrada nenhuma atividade da enzima após 45 minutos e observada meia-vida de 2,1 ± 0,2 min.

Após a ação da hialuronidase, a alta viscosidade e a habilidade lubrificante do ácido hialurônico ficam temporariamente diminuídas, o que aumenta a difusão das substâncias injetadas pelos planos teciduais. Vários estudos em oftalmologia utilizam a enzima como adjuvante ao AL, testando diferentes concentrações e associando diferentes anestésicos e técnicas. Alguns estudos avaliaram a eficácia da HIA nos bloqueios retrobulbares (Mindel, 1978; Nicoll et al,, 1986; Thomson, 1988; Kallio et al., 2000; Remy et al., 2008) e peribulbares (Sarvela; Nikki, 1992; Dempsey et al., 1997; Hamada et al., 2005; Mantovani et. al, 2001; Pacella et al., 2013), e em outros, a redução da latência do bloqueio nervoso (Sarvela; Nikki, 1992; Nicoll et al., 1986) e diminuição de efeitos adversos pós-anestesia (Hamada et al., 2005).

Uma avaliação de 27 casos de bloqueio retrobulbar utilizando 7,5 UTR/ml de HIA associado à mepivacaína 2% foi realizada por Mindel (1978) que concluiu que havia uma rápida instalação da anestesia quando da associação. Nicoll et al. (1986) utilizaram 15 UTR/ml de HIA associados a uma mistura de bupivacaína 0,5% e lidocaína 2% em 100 pacientes, obtendo uma melhora significativa do bloqueio motor em anestesia retrobulbar.

A mesma concentração de HIA para o bloqueio retrobulbar (7,5 UTR/ml) foi usada por Thomson (1988) associada à lidocaína 2%, num estudo com 150 pacientes, tendo como resultado melhora na eficácia anestésica e na taxa de sucesso para o bloqueio completo.

Utilizando HIA 3.75 e 7.5 UTR/ml associada a uma mistura de bupivacaína 0,75% e lidocaína 2%, Kallio et al. (2000) realizaram bloqueio retrobulbar e peribulbar, encontrando uma diminuição do tempo para início do bloqueio, além de maior taxa de sucesso quando da associação com a enzima. Concluem ainda, que não houve diferença significativa entre os grupos com diferentes concentrações da HIA.

No estudo randomizado de Remy et al. (2008) participaram 80 pacientes dispostos em 2 grupos de 40 indivíduos, onde em um deles foi utilizada mepivacaína 1% associada à HIA a 75 UTR/ml e no outro o mesmo anestésico associado a placebo, encontraram maior ocorrência de bloqueio retrobulbar completo e diminuição de efeitos colaterais quando da utilização da HIA.

A anestesia peribulbar também foi avaliada pelo estudo de Sarvela e Nikki (1992), composto por 70 pacientes, no qual metade deles foram submetidos à anestesia com etidocaína 1,5% isolada e a outra metade a uma associação do mesmo anestésico com HIA 7,5 UTR/ml. A partir da observação dos resultados eles concluíram que a utilização de HIA diminui o volume de anestésico necessário para um bloqueio eficaz, além de diminuir a necessidade de anestesia complementar.

Dempsey et al. (1997) avaliaram 200 pacientes com indicação de cirurgia ocular, utilizando para o bloqueio anestésico peribulbar uma mistura de bupivacaína 0.5% e lidocaína 2% associadas a 2 diferentes concentrações de HIA: 50 e 300 UTR/ml. Encontraram como resultado um aumento na duração do bloqueio anestésico para ambas as concentrações, no entanto, a associação com 300 UTR de HIA resultou num tempo menor para o início do bloqueio.

Ainda para avaliar a utilização de HIA como adjuvante no bloqueio peribulbar, Mantovani et al. (2001) fizeram um estudo variando a concentração da enzima associada a uma mistura de lidocaína 2% e ropivacaína 1% (1:1). Assim utilizaram 15 e 150 UTR/ml obtendo como resultado o aumento da duração anestésica e menor tempo para início do bloqueio para ambos anestésicos. A latência do bloqueio foi menor ($p < 0,03$) quando a HIA estava em maior concentração.

Hamada et al. (2005) avaliaram a ocorrência de complicações advindas da manobra anestésica no bloqueio peribulbar, no caso, a diplopia ocorrida após a cirurgia de catarata. O estudo utilizou lidocaína 2% e bupivacaína 0.5% (1:1) associado ou não à HIA variando de 12.5 a 50 UTR/mL. Concluíram que a

associação do anestésico local à HIA diminuiu significantemente a ocorrência de diplopia.

Mais recentemente, Pacella et al. (2013) realizaram um estudo em 160 pacientes comparando os anestésicos locais levobupivacaína 0,5% e bupivacaína racêmica 0,5%, com e sem HIA (10 UTR/ml) associada para o bloqueio peribulbar. Concluíram que a utilização da enzima aumentou a duração de ação anestésica para ambos os grupos, bem como diminuiu o tempo para a instalação da anestesia.

2.1.2 Hialuronidase em anestesia odontológica

Apesar dos benefícios observados em oftalmologia, somente em 1949 surgiu a primeira discussão sobre a possibilidade do uso da HIA em odontologia e, somente em 2001, surge um estudo com adequada metodologia científica na literatura odontológica sobre o assunto. Utilizando a enzima como adjuvante ao anestésico local em bloqueio do nervo alveolar inferior, Ridenour et al. (2001) avaliaram a eficácia anestésica da lidocaína 2% com epinefrina (1:100.000) injetada concomitantemente a HIA 150 UTR/ml, ministradas numa mesma solução para bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos, através de testes de estimulação elétrica (teste de vitalidade pulpar). Os pacientes (n=30) teriam que ter todos os dentes inferiores, ausência de cáries e/ou restaurações extensas. Os autores concluem que tal associação não aumentou a incidência do sucesso da anestesia local e aumentou a ocorrência de efeitos indesejáveis, como dor e trismo, contraindicando seu uso para fins odontológicos.

No entanto, quando a enzima HIA foi injetada não concomitantemente, mas tardiamente, antes do término da ação anestésica, em bloqueio ciático de ratos (Borsatti et al., 2004) e em bloqueio do nervo alveolar inferior em humanos (Tempestini-Horliana et al., 2008) melhorou a eficácia anestésica sem induzir efeitos adversos. Embora o mecanismo de ação ainda não esteja bem estabelecido possivelmente a HIA quebra o hialuronan facilitando a difusão das moléculas residuais de AL ao nervo, prolongando, deste modo, a anestesia. A estratégia de administrar HIA não concomitantemente ao AL, mas quando possivelmente já não havia uma grande quantidade de moléculas de AL ao redor do feixe nervoso pode

ter evitado a dispersão excessiva do mesmo e os resultados indesejáveis observados em outros estudos. Além disso, foi demonstrado que antes do término do bloqueio nervoso há intraneuralmente cerca de 1,6% do volume total de anestésico injetado, quantidade ainda capaz de promover um bloqueio completo. (Popitz et al., 1995), sendo o restante das moléculas dispersas para os tecidos adjacentes. Assim, o protocolo que utilizou a HIA injetada antes do término da anestesia ainda encontrou moléculas suficientes para serem direcionadas ao feixe nervoso (Tempestini-Horliana et al., 2008; Borsatti et al., 2004).

Este protocolo de injetar 75 UTR/ml após 30 minutos do início de ação anestésica da lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000 em bloqueio alveolar inferior foi repetido por Satish et al. (2013) para o tratamento de 40 paciente diagnosticados com pulpite irreversível em molares. Obtiveram como resultado o aumento significativo ($p<0,001$) da duração anestésica tanto em tecido pulpar como em gengiva.

Apesar dos benefícios de aumento do tempo de duração anestésica e da ausência de efeitos adversos, o protocolo apresentava o inconveniente para o paciente da necessidade de nova puntura da agulha para a injeção da HIA antes do término da anestesia local. Deste modo, a fim de eliminar esse inconveniente vislumbrou-se a possibilidade de incorporar a HIA em um sistema de liberação lenta, a fim de injetar a enzima complexada com nanopartícula e concomitantemente ao anestésico local (conforme P. I.: 1.105.045-4 de 10/11/2011). Tendo em vista manter os benefícios do protocolo de injeção tardia da HIA sem a necessidade de nova puntura, nosso grupo de pesquisa recentemente desenvolveu e caracterizou fisico-quimicamente o complexo de inclusão da HIA na nanopartícula 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) (Murakami, 2012), formando a HIA: HP-β-CD, visando alterar a biodisponibilidade da enzima mesmo se injetada concomitantemente ao AL.

2.2 Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos

Os sistemas de liberação controlada via nanopartículas representam uma nova alternativa para a indústria farmacêutica proporcionando uma entrega mais

eficiente do fármaco encapsulado, associado, complexado ou agregado (Bawa, 2008; Misal et al., 2013). Desta maneira o fármaco (hóspede) pode atingir áreas de difícil acesso, como por exemplo, a barreira hematoencefálica e junções epiteliais, além de áreas onde a solubilidade de fármacos hidrófobos esteja prejudicada. Oferece, também, vantagem econômica já que o desenvolvimento de novos fármacos geram altos custos e demandam um longo período, entre 10-15 anos, para que cheguem ao mercado (Hughes, 2005; Bawa, 2008). Assim, a nanotecnologia contribui para a redução dos custos para descoberta, desenho e desenvolvimento de fármacos, utilizando fármacos já aprovados pela FDA (Bawa, 2008).

Temos duas modalidades de liberação controlada via nanopartículas: 1) nanopartículas com efeito terapêutico; 2) nanopartículas que servem de carreadores para o princípio ativo (fármaco ou hóspede) (Langer, 1990; Misal et al., 2013).

Uma das maiores vantagens da utilização de sistema de liberação controlada é a possibilidade de diminuição da quantidade de fármaco administrada, prevenindo assim os efeitos tóxicos da superdosagem, mantendo a formulação agregada e/ou encapsulada sendo liberada na faixa que compreende a dose terapêutica (Langer, 1990; Misal et al., 2013), além de diminuir a necessidade de ministrar doses repetidas, deste modo podendo obter maior adesão dos pacientes ao tratamento (Rajewski; Stella, 1996), conforme figura 2.3.

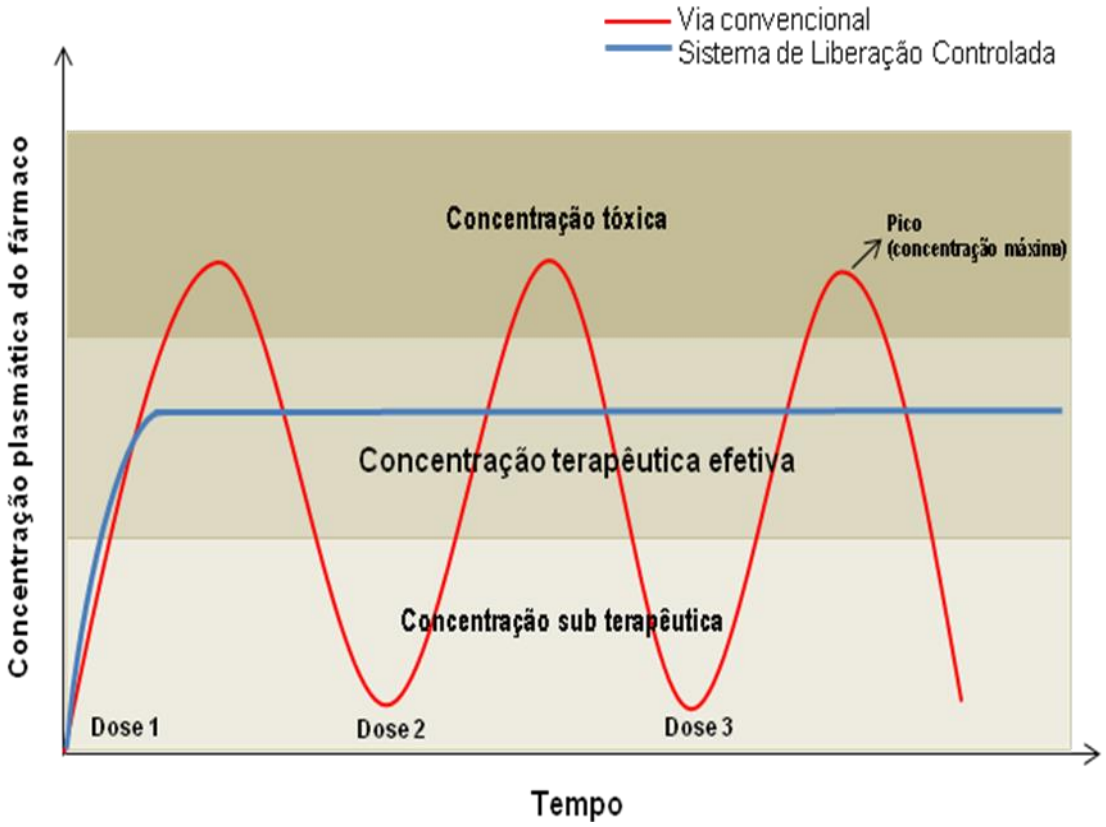


Figura 2.3 - Esquema comparativo do perfil da concentração plasmática de fármaco em função do tempo e número de doses, para a administração de formulações pela via convencional *versus* sistema de liberação controlada. (Modificado de Misal et al., 2013)

Atualmente, associado a anestésicos locais encontramos os seguintes sistemas de liberação lenta: lipossomas, biopolímeros (micro/nanocápsulas e micro/nanoesferas) (Hughes, 2005; Moraes et al., 2009), Xybrex (matriz contendo lidocaína 16%) (Wang et al., 2011) e as ciclodextrinas (Cortes, 1999; Kim et al., 2013) que são as nanopartículas utilizadas neste estudo, devido à possibilidade de da administração pela via parenteral de um de seus subtipos (HP-β-CD) (Shipton, 2012).

2.2.1 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) têm sido amplamente utilizadas nas indústrias alimentícia, cosmética e, sobretudo, farmacêutica, graças à sua habilidade em formar complexos com outras substâncias (Rasheed et al., 2008; Kurkov; Loftsson, 2013), além de oferecer segurança, estabilidade, e aumento da biodisponibilidade de fármacos, merecendo destaque pela capacidade de aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas, e pela melhoria na eficiência de entrega de fármacos a sistemas biológicos (Gould; Scott, 2005). Formam estruturas tronco cônicas que possuem superfície externa hidrofílica e uma cavidade interna lipofílica, na qual moléculas podem ser incluídas (Taupitz et al., 2013; Kurkov; Loftsson, 2013) (Figura 2.4).

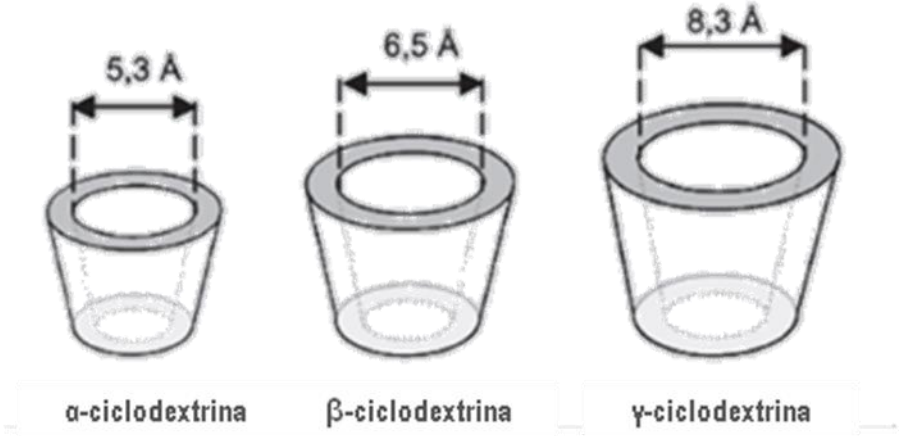


Figura 2.4 - Representação esquemática da estrutura tronco cônica das ciclodextrinas naturais: α, β e γ-ciclodextrina [Araújo et al, (2003) adaptado de Biwer et al., 2002].

São formadas por oligossacarídeos cíclicos constituídos de ligações do tipo α-1, 4 de α-D- glicopiranose, e surgem a partir da ciclização enzimática do amido, ou seja, da formação de oligômeros cíclicos desencadeada pela enzima ciclodextrina-glicosil-transferase lipofílica (Brewster et al., 1990; Cereda, 1997; Szejtli, 1998; Munro et al., 2004; Davis; Brewster, 2004; Rasheed et al., 2008; Taupitz et al., 2013; Kurkov; Loftsson, 2013). Dentre as CD naturais temos a α, β e γ que contêm respectivamente 6, 7 e 8 unidades de α-D-glicopiranose ligadas fortemente entre si por pontes de hidrogênio (Figura 2.5).

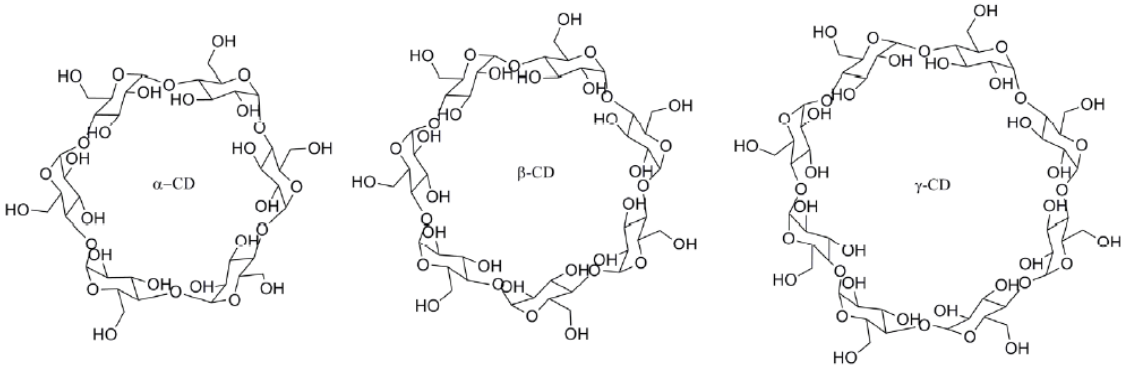


Figura 2.5 - Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais: α, β e γ-ciclodextrina. (Olsson; Westman, 2013)

A ligação através de pontes de hidrogênio limita a solubilidade aquosa das CD naturais, assim, para aumentar sua solubilidade, passam por um processo de esterificação e inclusão de grupos -OH resultando no aumento da hidrossolubilidade (Davis; Brewster, 2004). As CD naturais, em particular α-ciclodextrina, têm solubilidade aquosa limitada (16,4 mM ou 18,6 mg/mL) e a formação de complexos com compostos lipofílicos geralmente resulta em precipitação dos complexos sólidos, caso o limite de solubilidade seja atingido. Assim, numerosas modificações na estrutura química, que constituem acréscimo de radicais aos íons hidroxila das CD, têm sido realizadas originando derivados mais solúveis (Araújo et al., 2003). Para a β-ciclodextrina são encontrados 21 pontos de possíveis modificações estruturais com vistas ao aumento da hidrossolubilidade, taxa de dissolução, estabilidade e biodisponibilidade (Hirayama et al., 2002) do hóspede associado e/ou complexado. Uma dessas modificações originou a 2-hidroxipropril-β-ciclodextrina (HP-β-CD), objeto desse estudo, conforme tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Derivados da β-ciclodextrina de uso industrial (Rasheed et al., 2008)

Ciclodextrina	**R=H**
β-ciclodextrina	-H
2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina	$-CH_2CHOHCH_3$
Sal sódico do éter sulfobutil-β-cyclodextrina	$-(CH_2)_4SO_3^- Na^+$
β-ciclodextrina aleatoriamente metilada	$-CH_3$
β-ciclodextrina ramificada	Grupo glicosil ou maltosil

As CD e seus derivados podem ser utilizadas por via tópica e oral, mas somente as do tipo α e derivados hidrofílicos da β, podem ser utilizadas pela via parenteral. A γ-ciclodextrina forma agregados em solução aquosa, sendo contraindicada para a via parenteral (Kurkov; Loftsson, 2013).

A modificação estrutural da β-ciclodextrina se apresenta vantajosa, pois esta apresenta características favoráveis tais como: fácil disponibilidade, tamanho de cavidade apropriado, além do baixo custo (Kurkov; Loftsson, 2013). Um de seus derivados, a 2-hidroxilpropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) é uma alternativa para as CD naturais e apresenta hidrossolubilidade melhorada, podendo ser utilizada por via parenteral (Gould; Scott 2005) e apresentando menor toxicidade (Stella; He, 2008). Assim temos que as CD naturais, por seu caráter lipofílico, apresentam-se tóxicas pela alta taxa de absorção no trato gastrointestinal e nefrotoxicidade (Davis; Brewster, 2004; Rasheed et al., 2008).

As CD quando em solução aquosa possuem a habilidade de formar complexos de inclusão (CI = CD+ fármaco), interagindo com o fármaco ao qual estão expostas por meio de forças não covalentes, levando a um rápido equilíbrio entre as moléculas livres e complexadas no meio (Rasheed et al., 2008; Kurkov;Loftsson, 2013). A formação do complexo de inclusão (CI) pode levar a uma alteração na conformação espacial do fármaco (hóspede) conferindo, ao mesmo, diferentes propriedades (Gould; Scott 2005). Além disso, as ligações com o hóspede ocorrem de formas distintas, podendo envolver toda a molécula ou apenas parte dela. Vale ressaltar que as ligações são realizadas do modo mais eficiente possível, ou seja, havendo afinidade e sítios livres, haverá a possibilidade de interação entre a CD e o hóspede (Davis; Brewster, 2004). A figura 2.6 ilustra os possíveis tipos de interação.

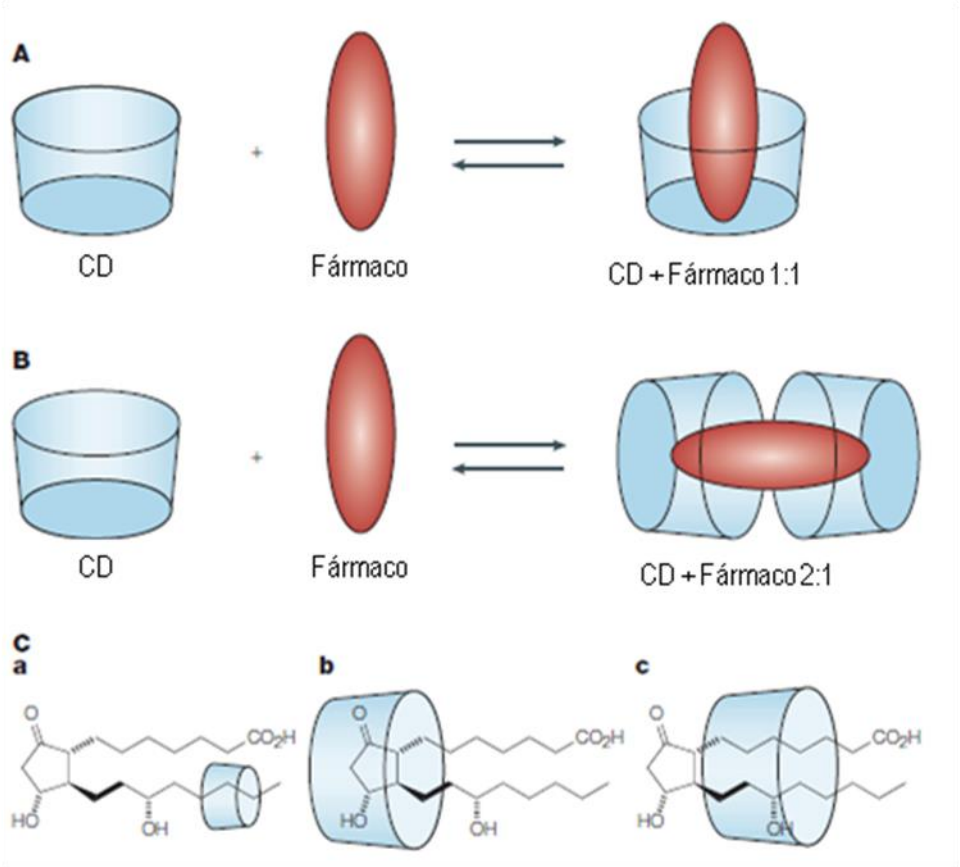


Figura 2.6 - Representação esquemática da formação de complexos de inclusão entre ciclodextrina e o hóspede. (Adaptado de Davis e Brewster, 2004)

Quanto à cinética de liberação do hóspede, em sua grande maioria, se deve ao processo de diluição, no entanto, também há a ação de forças advindas de ligações entre o hóspede e proteínas ou tecidos, além de ligações competitivas no sítio de ação (Kurkov; Loftsson, 2013). No entanto, não há relatos de competição dos fármacos coadministrados com o complexo de inclusão pelo sítio de ligação na ciclodextrina (Stella; He, 2008), até a presente data.

As CD apresentam resistência à degradação por enzimas humanas e quando injetadas intravascularmente sua eliminação ocorre principalmente pelos rins. No entanto, amilases provenientes de fungos ou bactérias podem metabolizá-las, e sendo assim, ocorre excreção via cólon (Davis; Brewster, 2004). Quando administrada por via oral, a biodisponibilidade encontrada para a HP-β-CD é menor que 1% enquanto que 100% é eliminada por via renal entre 6-12 horas (Stella; He, 2008).

Finalmente, quanto à utilização das CD, além das vantagens já elucidadas no que diz respeito ao hóspede, podemos citar: prevenção de perdas por volatilidade,

prevenção de misturas de substâncias incompatíveis, proteção da degradação ou desestabilização, redução de sabores e odores desagradáveis, decomposição por luz e/ou calor e redução da taxa de hemólise (Loftsson; Masson, 2001; Kurkov; Loftsson, 2013).

2.2.1.1 toxicidade da 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

Conforme elucidado, as CD naturais, dentre as quais encontramos a β-ciclodextrina, apresentam baixa solubilidade o que pode ocasionar sua precipitação nos túbulos renais sendo, portanto, nefrotóxicas (Brewster et al., 1990). O aumento da solubilidade pode ser melhorado através de modificações estruturais, como ocorreu com a 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD), e consequentemente, diminuição da toxicidade (Gould; Scott, 2005). Além disso, as CD apresentam-se vantajosas no que diz respeito à segurança de sua utilização, pois é sabido que não são capazes de penetrar membranas biológicas (Kurkov; Loftsson, 2013). Dentre as CD modificadas, as que apresentam maior nível de segurança quanto à nefrotoxicidade são a HP-β-CD e a sulfobutileter-β-ciclodextrina (Stella; He, 2008).

Para avaliação da toxicidade aguda e subcrônica da HP-β-CD após infusão intravenosa em ratos e macacos, Brewster et al. (1990) realizaram um estudo e, mesmo com a dose de 10 g/kg, não observaram acúmulo renal ou manifestações de toxicidade em nenhum dos grupos avaliados. Outros estudos avaliando a toxicidade aguda e subcrônica e que levavam em consideração diferentes vias de administração (intraperitoneal, intramuscular, intracraniana ou tópica) da HP-β-CD etambém não observaram nefrotoxicidade (Pitha et al., 1994; Loftsson, Brewster, 1996; Gould; Scott, 2005). Embora haja relato de nefrotoxicidade após administração parenteral de HP-β-CD em ratos e coelhos devido à cristalização do fármaco nos túbulos renais (documento NDA 50-763 da FDA), Albers e Müller (1995), destacam que ela é bem tolerada por essa via de administração e o acúmulo de substância pode ser atribuído à presença de β-ciclodextrina livre presente na mistura injetada.

Na pesquisa de Bellringer et al. (1995) a β-ciclodextrina foi administrada por via oral, misturada à dieta, por 52 dias, para ratos Sprague-Dawley e cães da raça

Beagle. As doses diárias para o grupo dos ratos variaram de 0 (grupo controle) a 3614 mg/Kg (dose máxima) e para o grupo dos cães a variação foi de 0 (grupo controle) a 1967 mg/Kg (dose máxima). Foram avaliados os seguintes parâmetros: alterações de peso, apetite, exames oftalmológicos, exames hematológicos para avaliação de níveis séricos de vitaminas e exames de urina. No grupo dos ratos foram observadas algumas alterações no fígado e rins (quanto à morfologia celular) nas doses maiores, enquanto no grupo dos cães não houve nenhuma alteração significativa. As alterações encontradas nos ratos não foram consideradas de grande importância toxicológica, lembrando que, conforme exposto anteriormente, a β-ciclodextrina possui toxicidade elevada quanto comparada com a HP-β-CD, objeto desse estudo.

O estudo de Irie e Uekama (1997) mostrou que a HP-β-CD é considerada não tóxica quando administrada numa dose diária inferior a 16 g/kg e não apresenta potencial mutagênico e teratogênico. Demonstraram também que quanto ao caráter hemolítico a HP-β-CD é a mais segura em concordância com os resultados encontrados por Gould e Scott (2005).

Testes de citotoxicidade com fármacos, excipientes e ciclodextrinas utilizados em anestesia oftalmológica foram realizados por Saarinen-Savolainen (1998). Utilizando células epiteliais imortalizadas da córnea humana, demonstraram que a HP-β-CD apresenta-se segura, causando mais morte celular apenas quando comparada à γ-ciclodextrina nas condições experimentais empregadas.

Mosher e Thompson (2002) realizaram infusão intravenosa de HP-β-CD de 400 mg por 90 dias em ratos e encontraram toxicidade moderada, ocasionando perda de peso, alteração de parâmetros séricos, ativação do sistema fagocitário nos pulmões e fígado, além de alterações no pâncreas.

A pesquisa de Varca et al. (2007) utilizou a enzima proteolítica papaína que é normalmente utilizada no processo de cicatrização de feridas. Numa tentativa de aumentar a biodisponibilidade e estabilidade da enzima, procedem à caracterização dos complexos de inclusão da papaína com β-ciclodextrina e HP-β-CD, e avaliam a citotoxicidade quando da exposição de fibroblastos e queratinócitos. Concluíram que, nas condições experimentais apresentadas e nos tempos de 12 e 24h de exposição das células, o complexo de inclusão formado entre a enzima e as ciclodextrinas avaliadas não se apresentou citotóxico.

Uma diminuição do efeito hemolítico do anestésico em hemácias humanas foi verificado pelo estudo de Araújo et al. (2008), quando os eritrócitos eram expostos ao complexo de inclusão formado entre a ropivacaína e a HP-β-CD. Concluíram ainda, analisando o bloqueio anestésico do nervo ciático de ratos (motor e sensitivo), que a complexação resultou num aumento da duração do bloqueio nociceptivo enquanto para o bloqueio motor não apresentou diferença significativa comparando com o grupo que utilizava a ropivacaína isolada.

Parâmetros de neurotoxicidade e de miotoxicidade foram avaliados por Cereda et al. (2012) comparando a bupivacaina e a ropivacaína isoladas e complexadas com HP-β-CD. Utilizando células de Schwann, obtidas a partir do sacrifício de ratos neonatos, não encontraram diferença significativa entre os grupos com o anestésico local isolado e complexado no que tange à morte celular, o mesmo ocorrendo nos testes que avaliavam os danos causados ao nervo ciático após injeção intraneural. Já, a miotoxicidade foi avaliada através da quantificação dos níveis séricos de proteína creatina-quinase e histopatológico do músculo gastrocnêmio dos ratos. Observaram diminuição dos efeitos miotóxicos dos anestésicos locais quando da complexação.

A complexação da HP-β-CD com o analgésico opióide sufentanil foi utilizada por Volobuef et al. (2012), que avaliaram o efeito hemolítico (utilizando hemácias humanas) e miotóxico (níveis séricos de creatina-quinase) do fármaco: este isolado, complexado e da ciclodextrina. Encontraram como resultado, redução do efeito hemolítico quanto da complexação e a ausência de indução de hemólise no grupo da HP-β-CD isolada, concluindo que ela é segura. Quanto à miotoxicidade, após injeção dos fármacos pela via intramuscular (músculo gastrocnêmio de rato), procedia-se a análise da quantidade de creatina-quinase no plasma sanguíneo. Seus resultados relataram níveis normais de creatina-quinase nos grupos onde houve a utilização do complexo de inclusão e no qual era administrada a ciclodextrina isolada.

A HP-β-CD tem sido utilizada para proteger o organismo da toxicidade de outros fármacos, como exemplo, no estudo de Day et al. (2013), utilizaram a pseudopterosina A (PsA), extraída de gorgonáceas marinhas (organismos semelhantes a corais), que possui aplicação terapêutica na reparação de feridas por sua ação antinflamatória e analgésica. A PsA é altamente lipofílica, e portanto, a associação com a HP-β-CD foi a alternativa encontrada para melhorar sua

solubilidade. Realizando testes de citotoxicidade em células epiteliais do cordão umbilical humano, verificaram aumento da proliferação celular quando o fármaco era associado à HP-β-CD em comparação ao fármaco isolado, não sendo avaliada a nanopartícula isolada. Assim, concluíram que a associação é vantajosa pela proteção aos efeitos tóxicos da PsA para uso tópico mantendo a capacidade de acelerar a cicatrização de feridas.

Até o momento não foram encontrados estudos sobre os efeitos citotóxicos do complexo de inclusão HIA:HP-β-CD.

2.2.1.2 ciclodextrinas em associação a anestésicos locais

Inúmeros estudos utilizam os diversos tipos de ciclodextrinas e suas derivações associadas a anestésicos locais, descrevendo caracterização, testes de estabilidade, latência e duração de ação anestésica, além de testes de citotoxicidade (Franco de Lima et al., 2012; Ranjbar et al., 2012; Soares da Silva et al., 2011; Arantes et. al, 2009; Araújo et al., 2006; Fréville et al., 1996). A inclusão de anestésico local em ciclodextrinas foi descrita pela primeira vez pela patente PCT/DK94/00307, de Borgbjerg (1994), Dinamarca. As pesquisas que utilizam a HP-β-CD complexada ou associada a anestésicos locais estão relatadas a seguir.

Utilizando coelhos, Fréville et al. (1996) realizaram a injeção epidural de bupivacaína complexada com HP-β-CD, e a seguir em tempos predeterminados realizavam a coleta do sangue dos animais para análise dos níveis sanguíneos do anestésico, buscando verificar se a ciclodextrina exercia alguma influência nesse parâmetro. Além disso, realizavam a análise do bloqueio motor através da observação das características de ambulação e movimentação espontânea da pata traseira. Observaram que a duração do bloqueio motor foi aumentada com a bupivacaína complexada e, além disso, os níveis plasmáticos do anestésico local se apresentaram significativamente diminuídos nesse grupo.

Para o bloqueio dos membros posteriores de ratos pela via subaracnoidea Araújo et al. (2006) realizam a complexação da HP-β-CD com a bupivacaína racêmica e com a mistura com excesso enantiomérico 50% comparando com o anestésico isolado. Seus resultados demonstraram redução da latência para o

bloqueio motor nos 2 grupos onde houve a utilização do complexo. Quanto ao bloqueio nociceptivo verificaram, através de escores (pela resposta de pinçamento da pata), a intensidade e o tempo de duração anestésica, sendo que para o grupo com excesso enantiomérico de bupivacaína complexada foi encontrado aumento no limiar de dor e na duração de antinocicepção de 5 horas.

Ranjbar et al. (2012) utilizaram a HP-β-CD complexada à lidocaína na razão molar de 1:1 para anestesia oftalmológica num colírio anestésico. Selecionaram 30 pacientes que possuíam indicação de intervenções oftalmológicas com anestesia tópica. Todos os pacientes eram submetidos à mesma técnica anestésica que consistia do recebimento inicial de gotas de colírio de tetracaína, caso não houvesse bloqueio anestésico completo, esperava-se o tempo para “wash out” e aplicava-se a lidocaína complexada, e se esta falhasse, procedia-se ao método anestésico convencional (injeção subconjuntival). Para todos os pacientes houve ausência do bloqueio anestésico completo quando da anestesia com tetracaína, enquanto que o bloqueio completo foi alcançado em aproximadamente 93% dos pacientes quando do recebimento da lidocaína complexada (LDC: HP-β-CD 1:1).

De forma distinta dos trabalhos anteriores, a proposta de nosso estudo foi a complexação da HIA na HP-β-CD, e não do anestésico local, com o objetivo de prolongar a duração do efeito anestésico através da utilização da enzima como adjuvante, que seria liberada tardiamente da ciclodextrina, utilizando modelo animal.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo geral: Verificar se a enzima hialuronidase incorporada em sistema de liberação controlada (2-hidroxipropil-β-ciclodextrina) injetada concomitantemente ao anestésico local é capaz de prolongar a duração de ação do bloqueio nervoso funcional utilizando modelo experimental: bloqueio ciático de rato. Verificar, também, citotoxicidade (*in vitro*) do sistema de liberação controlada associado à lidocaína.

Objetivos específicos: Analisar a duração de bloqueio de condução em nervo ciático através da avaliação do bloqueio sensitivo, motor e proprioceptivo, bem como a citotoxicidade (*in vitro*) dos compostos utilizados, através dos testes de contagem (exclusão) por Azul de Tripan e de hemólise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A utilização de animais no experimento está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e tem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FOUSP) sob o protocolo n° 026/2013 de novembro de 2013 (Anexo A). Não foram utilizadas células de linhagem humana nos procedimentos de citotoxicidade. Todos os experimentos foram realizados no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, no laboratório de Biologia do Movimento Celular, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Os animais utilizados no estudo foram submetidos às condições experimentais por duas vezes, na semana anterior, para condicionamento.

A preparação dos compostos de inclusão de HIA: HP-β-CD, em ambas as razões molares (1:1 e 2:1) foi realizada pelo laboratório do Instituto de Nanomateriais do ICEx-UFMG conforme técnica descrita por Murakami (2012).

4.1 Material

Fármacos utilizados:

1) Lidocaína (Sigma Chem. Co – USA);
2) Epinefrina 1:100.000 (Adren, Hipolabor & Sanval, Brasil);
3) Hialuronidase (Hyalozima®, Apsen Ind. Com. Brasil);
4) 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β -CD) (Roquette Serv, Tech Lab. – Lestrem, Cedex, France);
5) Complexo de inclusão HIA: HP-β-CD na razão molar de 1:1 (Massa molar da: HIA= 578g/mol e da HP-β-CD= 1375 g/mol) e 2:1 (Massa molar da: HIA= 1156 g/mol e da HP-β-CD= 1375 g/mol) (Murakami, 2012).

Equipamentos de proteção individual e desinfecção:

1) Luvas de látex para procedimento;
2) Máscara e gorro descartável;
3) Óculos de proteção;
4) Luvas de lã para manipulação dos animais;

5) Toalhas de papel absorvente;
6) Álcool etílico hidratado 70%;

Experimentação animal – Bloqueio nervoso ciático

Material para uso permanente:

1) Analgesímetro fotoelétrico (Analgesymeter ref. 37215 – Ugo Basile: Biological Research, Itália);
2) Base de madeira com forro de cortiça para apoiar os animais;
3) Caixa acrílica com tampa;

Material para procedimento anestésico:

1) Seringas hipodérmicas 1 ml com agulha 13X38 – 27,5G;
2) Frascos de vidros com tampa de borracha 10 ml para acondicionamento e mistura dos fármacos utilizados;
3) Pinça hemostática reta do tipo Kelly, para o teste de picada na pata ("pinprick");

Teste de citotoxicidade por azul de Tripan

1) Cultura de células fibroblásticas embrionárias de ratos *Mus musculus* NIH3T3 (Catálogo ATCC® CRL1658™);
   a. Frasco (Garrafa) para Cultura de Tecidos - 150 cm² - 690mL;
   b. Placas de 6 poços (Costar 3516 – Corning Incorporated);
   c. Filtro membrana PES 0,22 µm (TRP Sprintzen/Syringe-filter 0,22 µm);
2) Corante Azul de Tripan;
3) Câmara de Neubauer;
4) Microscópio óptico Olympus Tokyo;
5) Centrífuga Eppendorf 55804;
6) Solução base para cultura de células (meio de cultura): DMEM Low (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com: 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% L-Glutamina e 1% de NEAA (Non-essential amino acids);
7) Solução PBS 1:100 = 90 mL de água destilada + 10 ml de PBS(Na_2HPO4 – 22.2 mmol/ L, KH_2PO4 – 5.6 mM/L, NaCl 123.3 mM/L e Glucose 10.0 mM/L);

8) Tripsina;
9) Micropipetadores e ponteiras.

Teste de hemólise

1) 5 mL de sangue de 01 (um) rato Wistar;
2) Soluções e reagente:
   a. EDTA 15g/dL (Hemstab®);
   b. Tampão HEPES (20 mM, pH 7,4) contendo: NaCl (154 mM) e DMSO (5%);
   c. PBS isotônico (Na_2HPO4 – 22.2 mmol/ L, KH_2PO4 – 5.6 mM/L, NaCl 123.3 mM/L e Glucose 10.0 mM/L), pH 7.4 em temperatura ambiente.
3) Tubo do tipo Falcon de 15 mL;
4) Tubos Eppendorf de 1,5 ml para processamento das amostras;
5) Centrífuga Eppendorf 55804;
6) Centrífuga Eppendorf 5415 C;
7) Micropipetadores e ponteiras;
8) Placa de 96 poços do tipo ELISA;
9) Espectrofotômetro e software SOFTMax Pro.
10) Rotador Barnstead Lab-Line 2314 Multi-Purpose Rotator.
11) Guilhotina Bonther.

4.2 Métodos

A eficácia do complexo de inclusão no aumento da duração de ação anestésica foi mensurada por testes para avaliação de bloqueio funcional, após anestesia em nervo ciático de ratos.

Para avaliação dos efeitos citotóxicos foram utilizados: os testes de citotoxicidade por Azul de Tripan, buscando quantificar os níveis de morte celular e, o teste de hemólise que é um bom parâmetro para avaliação da interação de fármacos com membranas biológicas. Todos os procedimentos estão descritos a seguir.

4.2.1 Análise da duração do bloqueio nervoso

Para comparação da duração do bloqueio nervoso ciático com os fármacos, foram utilizados 11 grupos de ratos machos Wistar (*Rattus novergicus*) de aproximadamente 12 semanas, pesando entre 200 e 300 kg.

Os ratos eram mantidos em gaiolas do tipo rack ventilado com suprimento alimentar (ração) e água *ad libitum*, e aclimatados no Biotério de Experimentação do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas USP. O estudo utilizou 117 ratos para esta fase experimental.

Para o bloqueio de nervo ciático foi utilizada a técnica descrita por Truant (1958) com 0,14 mL de cloridrato de lidocaína 2% com, ou sem, epinefrina 1:100.000. A dose de LDC associada à epinefrina foi de 7 mg/kg de peso corporal. Conforme o esquema abaixo, 5 grupos receberam anestesia com lidocaína associada à epinefrina, 3 grupos receberam anestesia com lidocaína sem vasoconstritor e 3 grupos não receberam anestésico local (um grupo recebeu a solução HIA , um segundo grupo HP-β-CD e, o terceiro grupo, recebeu o complexo de inclusão HIA: HP-β-CD 1:1. Assim, os animais foram distribuídos conforme os seguintes grupos:

(1) LDC vc = anestésico local (lidocaína 2%) com vasoconstritor (n=9);
(2) LDC = anestésico local (lidocaína 2%) sem vasoconstritor (n=5);
(3) LDC vc + Hialuronidase (HIA) injetada concomitantemente (n=29);
(4) LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5);
(5) LDC vc+ HIA : HP-β-CD 1:1 injetadas concomitantemente (n=18);
(6) LDC vc+ HIA : HP-β-CD 2:1 injetadas concomitantemente (n=10);
(7) LDC : HP-β-CD 1:1 (n=12);
(8) LDC + HIA : HP-β-CD 1:1 injetadas concomitantemente (n=4);
(9) HIA: HP-β-CD 1:1(n=5);;
(10) HIA (n=5);
(11) HP-β-CD (n=5).

A HIA 75 UTR (1 UTR = 0,1 mg) do grupo controle foi preparada a partir da hialuronidase liofilizada (Hyalozima®, Apsen Ind. Com, Brasil), dissolvida em seu veículo (água destilada estéril, cloreto de benzalcônio, manitol e cloreto de sódio), para se obter a concentração de 75 UTR/ml.

Neste estudo, tanto a solução de HIA 75 UTR/ml quanto as soluções contendo o complexo de inclusão HIA: HP-β-CD foram injetadas com volume de 0,18 ml (13,5 UTR), pela mesma técnica e local da injeção do anestésico local. Os grupos de (1), (2), (3), (4), (9), (10) e (11) foram considerados grupos controle.

4.2.1.1 avaliação do bloqueio nervoso

Como o nervo ciático é um nervo misto, a avaliação do bloqueio nervoso foi feita através de avaliação neurológica de nocicepção (reflexo de retirada da pata e pinçamento) (Thalhammer et al., 1995; Popitz-Berguez et al., 1995; Nakamura et al., 2003), função motora (reflexo extensor da articulação tibiotarsal e claudicação) (Popitz-Berguez et al., 1995; Paavola et al., 1995) e proprioceptiva (salto) (Thalhammer et al., 1995; Popitz-Berguez et al., 1995; Nakamura et al., 2003), iniciada logo após a administração das soluções. Cada teste foi realizado a cada 2 minutos até as funções serem bloqueadas e a cada 5 minutos até a recuperação destas. Para condicionamento, todos os ratos foram expostos às condições experimentais duas vezes durante a semana anterior.

A. Resposta nociceptiva **-** Avaliada através do reflexo de retirada da pata (RRP) do rato após estímulo nociceptivo – pressórico utilizando-se aparelho medidor de analgesia (Analgesymeter, Ugo Basile, Itália), conforme método descrito por Randall e Sellito (1957). Foi aplicada uma força linear crescente (16 g/s) com uma ponta cônica romba de plástico na parte lateral dorsal da pata traseira, entre os terceiros e quarto metatarsos, acionada por um pedal a comando do operador. O aparelho possui uma régua de 25 cm, onde cada centímetro ultrapassado pelo cursor corresponde a um acréscimo de 10 g sobre a pata, exercendo uma pressão máxima de 250 g evitando possíveis lesões (considerado *cut – off*, valor limite que não pode ser ultrapassado). Quando o rato retirava a pata (reflexo de retirada da pata – RPP) ou expressava vocalização, a pressão era imediatamente interrompida, e o valor pressórico registrado. O valor basal considerado foi o registro obtido após estímulo pressórico realizado antes da anestesia local.

Para complementar o teste de RRP, foi realizado o teste de pinçamento da pele do dedo mais distal da pata traseira com pinça hemostática, e utilizada uma escala de escore quanto ao grau de alteração da resposta: 1 = resposta normal; 2= resposta parcial e 3=ausência de resposta.

A *latência de ação* anestésica foi avaliada a cada 1 minuto até a instalação do bloqueio nervoso. A *duração de ação* anestésica foi considerada como o intervalo sem dor (ausência do RRP), avaliado com testes a cada 5 minutos até o retorno da dor (exibir RRP) ao estímulo. O bloqueio sensitivo (nociceptivo) foi considerado eficaz (bloqueio completo) quando o reflexo de retirada da pata estava ausente sendo atingido o valor máximo de 250 g no analgesímetro e escore 3 para o teste de pinçamento, considerando o tempo de duração do bloqueio completo em minutos. A pata contralateral foi utilizada como um controle.

B. Função motora – O bloqueio motor foi avaliado utilizando a técnica descrita por Poptiz-Berguez et al. (1995) e pela claudicação (Thalhammer et al., 1995). Os animais eram levantados pela parte dorsal e suas patas traseiras suspensas até desencostar da superfície de apoio. Normalmente, nestas circunstâncias, o animal tenta mover a articulação tibiotarsal, estendendo a pata para alcançar o chão e manter a postura (reflexo extensor postural). O bloqueio completo da função motora foi definido como a total ausência do reflexo extensor postural (extensão da articulação tibiotarsal), considerando pontuação (escore) 3, através de uma escala numérica (1) andar normal, (2) movimentação parcial (3) ausência de movimento da pata anestesiada (resultando em claudicação).

A duração do bloqueio motor (min) foi considerada como o período durante a ausência do reflexo de extensor da pata e pela presença de claudicação. O início do bloqueio nervoso foi avaliado observando-se a atividade locomotora espontânea, a normalidade ao andar e a dificuldade de guiar-se sozinho e claudicando, conforme escala numérica citada acima.

C. Propriocepção – O bloqueio proprioceptivo foi avaliado por 2 testes utilizados em neurologia veterinária. Um dos testes é a resposta de salto onde o rato era mantido em postura ereta, seguro pelas patas dianteiras pelo pesquisador, mantendo o peso corporal sobre as patas traseiras tocando a superfície. O corpo do animal era movido lateralmente na direção da pata anestesiada. A resposta normal do animal sem anestesia é a de realizar um salto naquela direção a fim de sustentar o peso sobre a pata, para evitar a queda. Com o bloqueio proprioceptivo completo, o

animal perde este reflexo, arrastando a pata sobre a superfície. Além disso, pode-se confirmar a existência do bloqueio através da observação do reflexo de reposicionamento da pata, neste teste a pata do animal é posicionada com superfície plantar dos dedos da pata flexionados com seu dorso colocado sobre a mesa. Com a propriocepção intacta, o animal imediatamente reposiciona seus dedos do pé. Se a função proprioceptiva estivesse prejudicada, esta correção postural ficaria ausente (Thalhammer et al., 1995).

Foi utilizada uma escala de escore quanto ao grau de alteração da resposta basal normal (1= normal; 2= resposta parcial e 3=ausência de resposta). A duração do bloqueio proprioceptivo compreendeu o período de ausência dos reflexos citados, ou seja, período de escore 3.

A duração do bloqueio completo motor e proprioceptivo foi considerado o intervalo de tempo (min) com escore 3.

Todos os testes foram realizados desde 5 minutos antes da injeção de anestesia local e a cada 5 minutos, até a completa recuperação funcional.

4.2.2 Análise da viabilidade celular

4.2.2.1 cultivo celular e ensaio de citotoxicidade por Azul de Tripan

As células embrionárias de ratos *Mus musculus* (ATCC Catalog. N° CRL-1658) foram cultivadas de acordo com protocolo sugerido pelo fornecedor. Após retirar as células do nitrogênio líquido, procedemos ao descongelamento em banho a 37°C. Em seguida foi acrescido 1 ml de meio de cultura às células e realizada a centrifugação da amostra a 1100 rpm (centrífuga Eppendorf 5804) durante 5 minutos, para a retirada do meio de congelamento DMSO (Dimetilsufóxido). Após a centrifugação, realizou-se a aspiração e descarte do meio, e a suspensão do pellet em 3 ml de meio de cultura [MC = DMEM Low com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1% L-Glutamina e 1% de NEAA], que foram acrescidos a duas garrafas de 150 cm^2 contendo mais 7 ml de MC em cada uma. Foram cultivadas $5x10^3$ células por cm^2 de acordo com recomendação do fornecedor. As garrafas foram levadas à estufa de

CO_2 para cultura de células a uma temperatura de 37°C e a 8% de CO_2, onde permaneceram por 72 horas para crescimento. Após o tempo para crescimento celular, as garrafas foram retiradas da estufa, o MC aspirado e foi feita a adição de PBS [1:100] para lavagem das células. Aspiração do PBS e colocação de 1 ml de tripsina em cada garrafa e incubação em estufa (37°C, a 8% de CO_2) por 5 minutos para que as células se soltassem. Em seguida procedeu-se à inativação da tripsina com 3 ml de MC, homogeneização, recolhimento em tubo Falcon e nova centrifugação da amostra (1100 rpm/5 minuto em centrígua Eppendorf 5804), descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o pellet com 1 ml MC sendo realizada a contagem em câmara de Neubauer com uma amostra 20 µl de células.

As células obtidas foram cultivadas em placas de 6 poços (Costar 3516 – Corning Incorporated), sendo 4,28 x 10^4 células por poço, com 3ml de MC, por mais 72 horas, quando foram expostas aos fármacos investigados pelos tempos de 1, 6 e 12 horas.

As soluções contendo os fármacos foram preparadas e filtradas com filtro membrana PES 0,22 µm (TRP Sprintzen/Syringe-filter 0,22 µm). Para todos os grupos foram preparadas soluções contendo o fármaco com concentrações elevadas, assim, a concentração final desejada seria alcançada por meio de diluição destas em MC. Sendo assim obteve-se:

- Solução de lidocaína (LDC) 3%: contendo 30mg de lidocaína sem vasoconstritor em cada 1 ml de MC.
- Solucão do complexo de inclusão (HIA:HP-β-CD 1:1): contendo 25,3mg de HIA:HP-β-CD 1:1 com 170 µl de solvente da HIA em cada ml. Deste modo a HIA estaria a 75 UTR/ml.
- Solucão de HIA :HP-β-CD 1:1 + LDC 2%: contendo 1,72 ml de solução do complexo de inclusão, 7,1 ml da solução de lidocaína 3% e 27,2 ml de meio de cultura.

As células NIH3T3 foram expostas a concentrações variadas dos fármacos em estudo, sendo assim, para todos os grupos utilizamos uma concentração inicial igual à injetada clinicamente, ou seja, lidocaína 2% e hialuronidase com 75 UTR/ ml, e em seguida, foram feitas diluições. Para a lidocaína utilizamos 4 diluições da concentração de 2%, ou seja, foi diluída 10, 25, 50 e 100 vezes; para os demais grupos realizamos 3 diluições: 10, 50 e 100 vezes.

Os testes foram feitos em triplicatas conforme esquematizado na figura 4.1, a seguir:

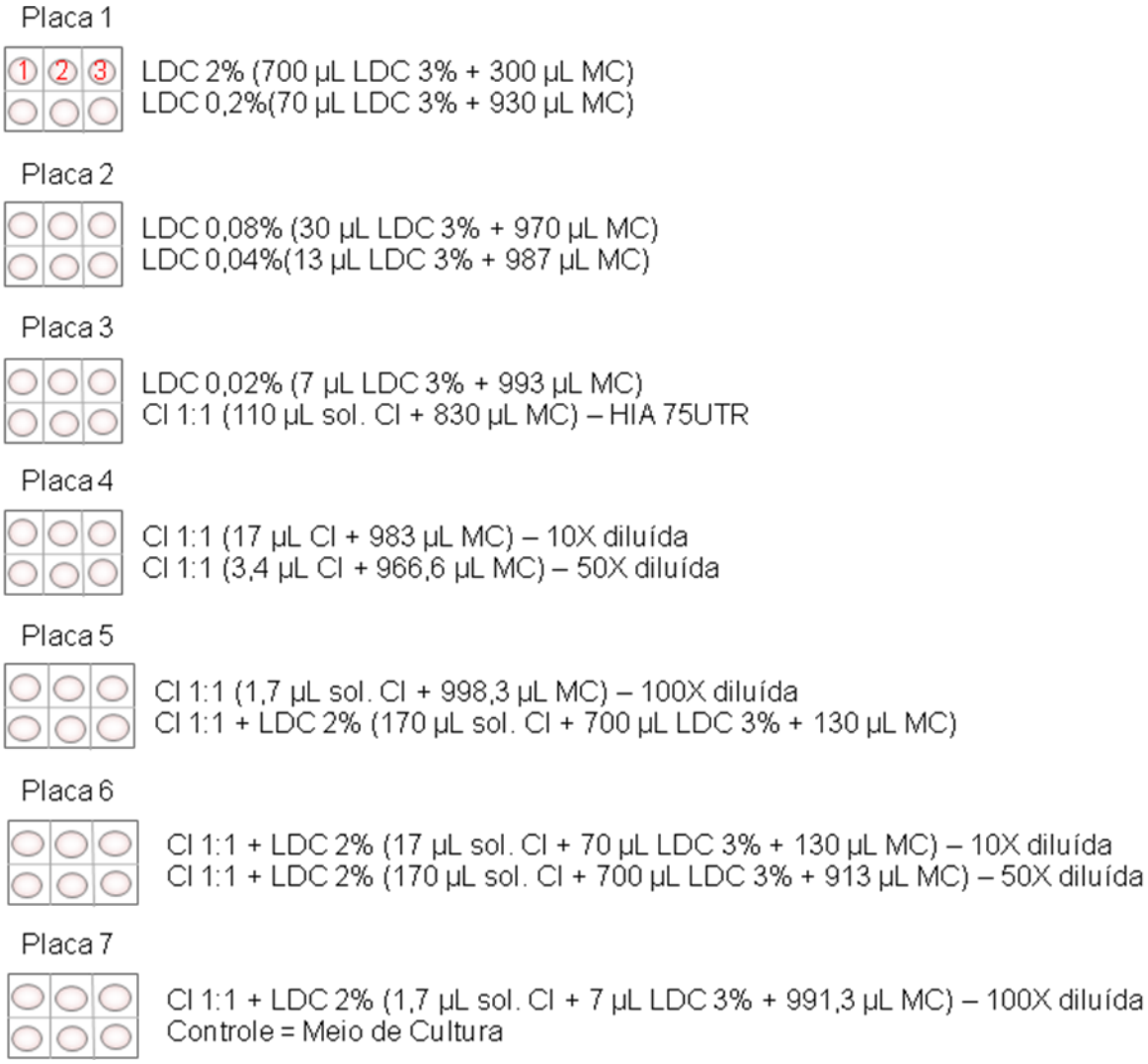


Figura 4.1 - Distribuição dos grupos em triplicada nas placas de 6 poços. Relação da quantidade de soluções em cada poço de células. LDC = lidocaína; CI = complexo de inclusão HIA:HP-β-CD 1:1.

O ensaio de citotoxicidade por azul de Tripan foi realizado de acordo com o protocolo a seguir:

1. Troca do MC pelo meio contendo o fármaco;
2. Incubação das placas pelos períodos de 1, 6 e 12 horas em estufa. Após a incubação, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer de acordo com as seguintes etapas:
    a. Recolhimento do sobrenadante (MC + fármacos);
    b. Lavagem com 500 µL de PBS [1:100] e recolhimento em tubo Falcon;

c. Adição de 500 µL tripsina;

d. Inativação da tripsina com 1 ml meio de cultura;

e. Recolhimento das células tripsinizadas (soltas) do tubo Falcon;

f. Lavagem com 500 µL PBS [1:100] e recolhimento no respectivo tubo Falcon;

g. Centrifugação a 1100 rpm /5 min em centrífuga Eppendorf 5804;

h. Descarte do sobrenadante;

i. Ressuspensão do pellet em 500 µL de MC;

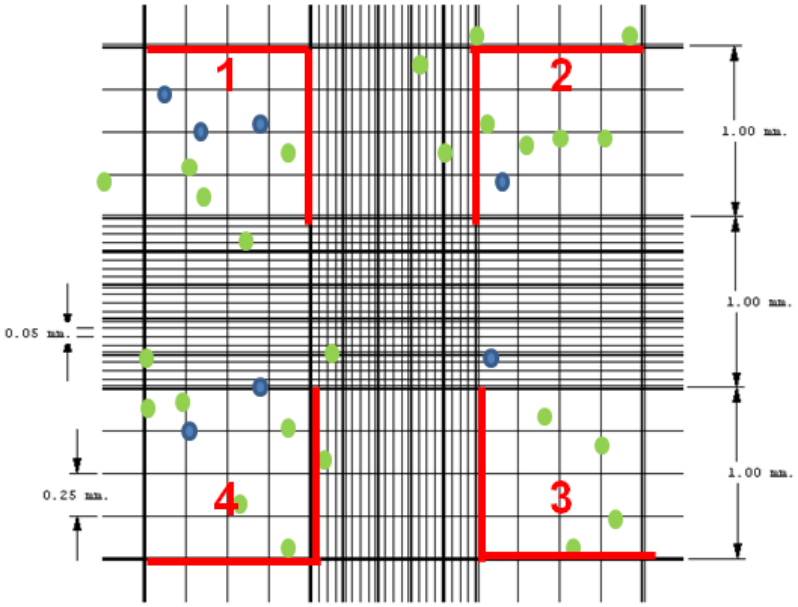
j. Mistura de 20 µL de suspensão de células em 20 µL Azul de Tripan;

k. Contagem em câmara de Neubauer.

Simplificadamente, há 2 formas possíveis de realização da contagem de células em câmara de Neubauer: contagem do quadrado central (o mais subdividido) ou, a forma utilizada neste estudo que considera a contagem dos 4 quadrantes externos (numerados de 1-4 na figura 4.2). Em cada quadrante elegem-se dois lados do quadrado em formato de L (assinaladas em vermelho na figura 4.2), os quais serão descartados, ou seja, as células que tocarem esses lados não deverão ser contabilizadas. Contabilizam-se as células contidas no interior do quadrado e, que tocam, interna ou externamente, os lados que serão considerados. As células viáveis (vivas) não são coradas ao contato com o Azul de Tripan, ao passo que as células inviáveis (mortas) apresentam coloração azulada ao serem visualizadas com auxílio de microscópio óptico. A penetração do corante intracelularmente indica que houve alteração na permeabilidade das células que sofreram dano após exposição aos fármacos utilizados, indicando que as mesmas estão inviáveis. A contabilização das células é feita aplicando-se a fórmula:

$$\frac{\text{N° células viáveis (ou inviáveis)}}{\text{N° de quadrantes}} \times 2 \times 10^4 \text{ cél/ml},$$

...onde o número de quadrantes é 4, e a multiplicação por 2 serve para corrigir a diluição da amostra no corante (http://www.protocolosbiomed.com.br/page_19.html acessado em Dezembro de 2013).



Volume/quadrante = 1mm x 1mm x 0,1mm

Figura 4.2 - Ilustração das células vistas ao microscópio óptico para contagem em câmara de Neubauer utilizando o teste de exclusão por Azul de Tripan. As células coradas em azul representam células não viáveis (coradas pelo Azul de Tripan), as demais, são células viáveis. (Adaptado de: http://www.protocolosbiomed.com.br/page_19.html acessado em Dezembro de 2013).

Neste estudo, a quantidade de células na amostra foi contabilizada, através da somatória das células vivas com as células mortas o que nos forneceu a quantidade total de células na amostra e nos possibilitou o cálculo do percentual de células viáveis:

$$CV + CIn = TA$$

$$\% CV = \frac{CV \times 100}{TA}$$

,

...onde CV representa o total de células viáveis (vivas), CIn o total de células inviáveis (mortas) e TA o total de células na amostra (http://www.protocolosbiomed.com.br/page_19.html acessado em Dezembro de 2013). .

4.2.2.2 teste de hemólise

O preparo da suspensão de eritrócitos foi realizado segundo o protocolo INVITTOX n° 37, com algumas modificações. Para esse teste foi utilizado o sangue de apenas 1 rato Wistar macho adulto, sacrificado por decaptação, coletado em tubo Falcon com EDTA. Deste modo, procedeu-se à centrifugação de uma amostra de 2 ml de sangue de rato diluída em EDTA 15g/dl (Hemstab® – 1 gota para cada 5 ml de sangue) durante 10 min a 500 *x*g (Malheiros et al., 2004), havendo o descarte do plasma, das células brancas e impurezas através de aspiração. O concentrado de hemácias, produto da centrifugação seguido da aspiração, foi ressuspenso em tampão de PBS isotônico (contendo: Na_2HPO_4 – 22.2 mmol/l, KH_2PO_4 – 5.6 mmol/l, NaCl 123.3 mmol/l e Glucose 10.0 mmol/l) num pH de 7.4, e em temperatura ambiente, passando por nova centrifugação obedecendo ao mesmo protocolo, sendo o procedimento acima elucidado repetido por 3 vezes. O concentrado de hemácias foi mantido em temperatura constante de 4°C quando não estava sendo manipulado. A ressuspensão levou em consideração a presença de 8 x 10^9 células (25 µl do concentrado de hemácias), sendo que as alíquotas contendo as suspensões foram incubadas com volumes crescentes dos fármacos estudados (10 µl a 80 µl), completados com PBS até que fosse atingido o volume final de 1 ml. Todos os grupos foram feitos em triplicata.

Os grupos controle foram:

- C1 = controle branco: eritrócitos em PBS (hemólise mecânica) composto de 25 µl da suspensão de eritrócitos;
- (C2) = eritrócitos em água destilada (chamado de controle de hemólise total).

Para que a concentração do fármaco, ou a turbidade relativa da HIA, fosse a desejada no volume de 80 µl, nas alíquotas de 1 ml (contendo: suspensão de eritrócitos + fármaco + PBS) , foram preparadas soluções saturadas conforme descrito a seguir:

- Grupo 1 (G1) – LDC 2% sem vasoconstritor: solução contendo 300 mg de cloridrato de lidocaína em 1,2 ml de PBS, para que a amostra contendo LDC no volume de 80 µL tivesse uma concentração final de 2%;

- Grupo 2 (G2) – HIA (75 UTR/ml): solução contendo 112,5 mg de HIA em 1,2 ml de solvente, para que a concentração em 80 µl fosse de 75 UTR ;
- Grupo 3 (G3) - HIA: HP-β-CD 1:1 (CI 1:1): solução contendo 380 mg de CI 1:1 em 1,2 ml de solvente, para que a concentração de HIA em 80 µl fosse de 75 UTR;
- Grupo 4 (G4) – HP-β-CD: solução contendo 267 mg de HP-β-CD em 1,2 ml de solução de PBS.
- Grupo 5 (G5) – HIA: HP-β-CD 2:1 (CI 2:1): solução contendo 380 mg de CI 2:1 em 1,2 ml de solvente, para que a concentração de HIA em 80 µl fosse de 75 UTR;
- C1 - Controle branco: 25 µl da suspensão de eritrócitos + 975 µl de solução de PBS.
- C2 – H100% (hemólise total): 25 µl da suspensão de eritrócitos + 80 µl de água destilada + 895 µl de solução de PBS.

Para os grupos G1 a G4, o volume de 1,2 ml foi distribuído nos poços da miniplaca de 96 poços para leitura em espectrofotômetro nos volumes: 80 µl, 70 µl, 60 µl, 50 µl, 40 µl, 30 µl, 20 µl e 10 µl.

Antes da leitura, as composições de cada grupo (G1 a G4) foram dissolvidas em tampão para alcançar o volume final de 1 ml. As amostras e controles (tampão e água destilada) foram colocados sob leve agitação em rotador (Barnstead Lab-Line 2314 Multi-Purpose Rotator – figura 4.3 A) e incubadas por 15 minutos a uma temperatura de 37°C, antes de serem submetidas aos procedimentos de centrifugação (centrífuga Eppendorf 5415 – figura 4.3 B).

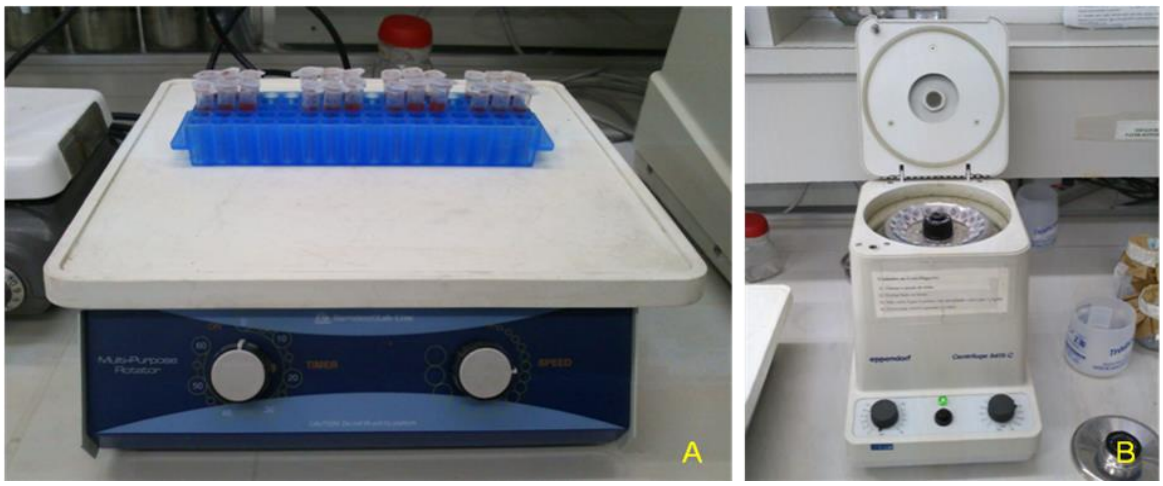


Figura 4.3 - (A) Rotador Barnstead Lab-Line 2314 Multi-Purpose com grupos sob agitação e (B) centrífuga Eppendorf 5415. (Laboratório de Biologia do Movimento Celular – ICB/USP)

Após o período de incubação e centrifugação foram dispensados 200 µL de cada amostra em microplaca para leitura em espectrofotômetro, conforme ilustrado na figura 4.4. A avaliação espectrofotométrica utilizou o sobrenadante para determinação da absorbância da hemoglobina com pico de absorção em 560 nm (INVITTOX n°37). A leitura do espectrofotômetro leva em consideração a quantidade de hemoglobina liberada após lise celular, sendo a hemólise mecânica aquela devida a danos celulares comuns oriundos dos processos de manipulação das células e centrifugação, e a hemólise total devido à lise por pressão osmótica induzida pela utilização de água destilada.

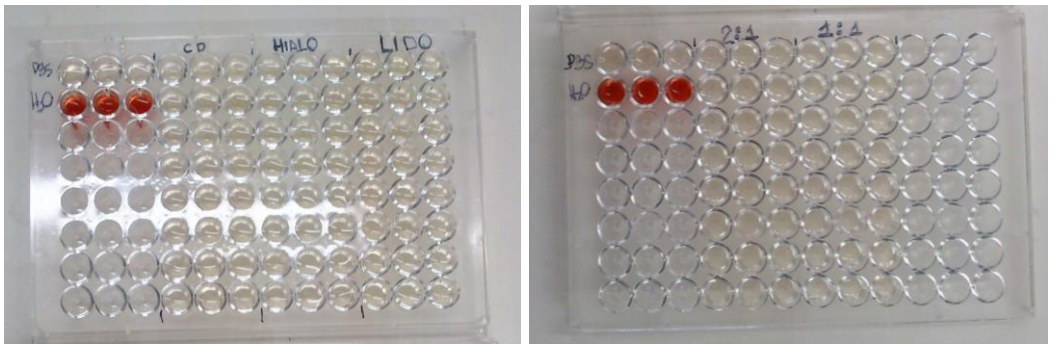


Figura 4.4 – Microplacas de 96 poços preparadas para leitura em espectrofotômetro. (Laboratório de Biologia do Movimento Celular – ICB/USP)

O efeito hemolítico foi monitorado mensurando a concentração de hemoglobina no sobrenadante, conforme a equação...

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A\,(G1 \text{ ao } G4) - AC1}{AC2 - AC1} \times 100$$

... onde A representa a absorbância, A (grupos 1 ao 4) é a absorbância obtida para cada amostra individualmente, AC1 (controle 1) é o valor obtido para o controle da hemólise mecânica e AC2 é o valor obtido para o controle de hemólise total.

5 RESULTADOS

5.1 Análise do bloqueio nervoso

5.1.1 Bloqueio sensitivo

Os valores para o tempo de latência do bloqueio sensitivo, ou seja, o tempo para início e instalação de bloqueio sensitivo completo está apresentado na tabela 5.1, e o gráfico 5.1 ilustra os resultados e apresenta a análise estatística (Kruskal-Wallis com teste auxiliar de comparações múltiplas de Dunn, $p<0,01$).

Tabela 5.1 – Média ± EP do tempo de demora para início e instalação do bloqueio sensitivo (min) nos grupos estudados

Grupos	**Média ± Erro padrão (min)**
LDC (n=5)	16 ± 2
LDC vc (n=9)	17 ± 1
LDC vc + HIA injetada concomitantemente (n=29)	16 ± 1
LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5)	17 ± 1
LDC vc + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=18)	19 ± 1
LDC + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=10)	6 ± 1
LDC vc + CI 2:1 injetadas concomitantemente (n=12)	17 ± 1
LDC : HP-β-CD 1:1 (n=4)	15 ± 3
CI 1:1 (n=5);	Não se aplica
Hialuronidase (n=5)	Não se aplica
HP-β-CD (n=5)	Não se aplica

LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD.

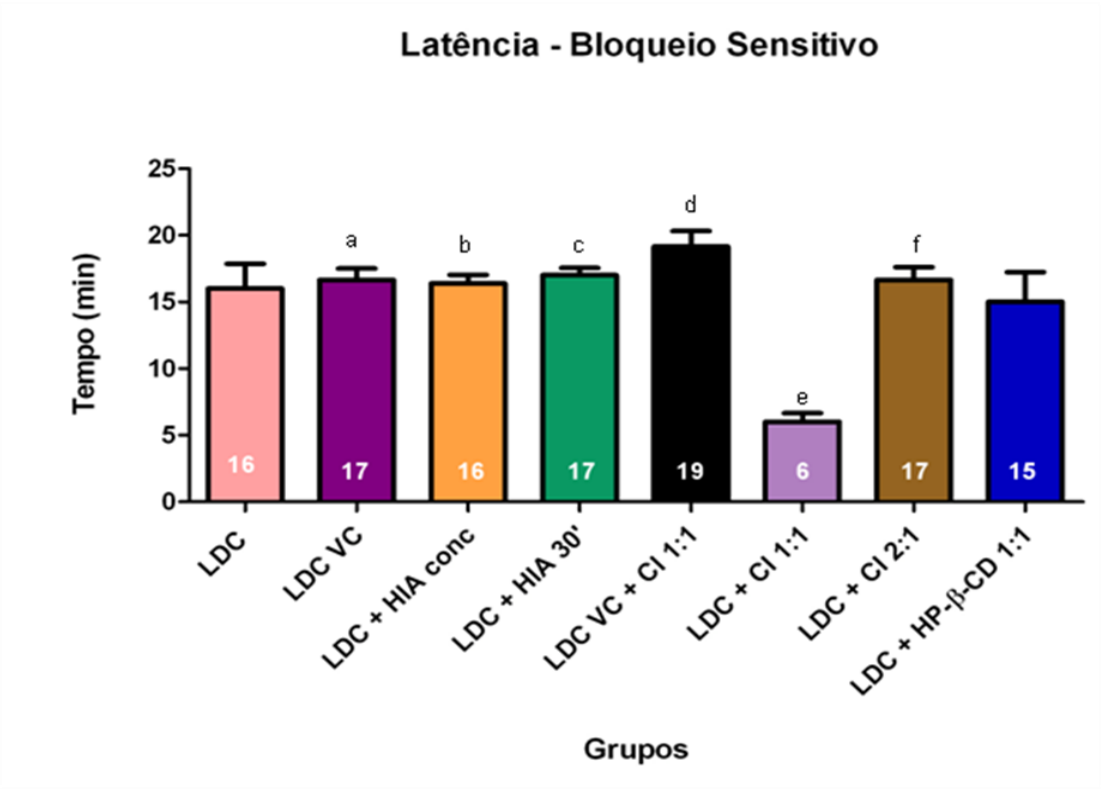


Gráfico 5.1 - Histograma indicando valores médios ± EP do tempo de latência para o bloqueio sensitivo em nervo ciático e análise estatística. Grupo [e] p<0,01 quando comparado aos grupos [a], [b], [c], [d], e [f]. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

Os resultados do bloqueio sensitivo em minutos com o tamanho da amostra para cada grupo e resultado estatístico estão apresentados na tabela 5.2 (Kruskal-Wallis com teste auxiiar de comparações múltiplas de Dunn, p<0,01). Os gráficos 5.2 e 5.3 apresentam os resultados da ausência de RRP (250 g utilizando o analgesímetro) e o gráfico 5.4 apresenta os resultados dos valores médios em escore para o teste de pinçamento (pinprick).

Tabela 5.2 – Média aritmética ± EP do bloqueio sensitivo (min), tamanho da amostra e análise estatística nos grupos estudados

Grupos	**Média ± Erro padrão (min)**
LDC vc (n=9)	66,11 ± 5[c]
LDC (n=5)	28,00 ± 5[b]
LDC vc + HIA injetada concomitantemente (n=29)	72,07 ± 4[c]
LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5)	100,00 ± 4[d]
LDC vc + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=18)	164,17 ± 16[a]
LDC vc + CI 2:1 injetadas concomitantemente (n=12)	107,08 ± 10[d]
LDC : HP-β-CD 1:1 (n=4)	78,75 ± 4[c]
LDC + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=10)	86,00 ± 8[d]
CI 1:1 (n=5);	0 [f]
Hialuronidase (n=5)	0 [f]
HP-β-CD (n=5)	0 [f]

Análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis com auxiiar de Dunn de comparações múltiplas (p<0,01). Grupo [a] p<0,01 dos demais; [b] p<0,01 dos demais; entre [c] e [d] : p<0,01; f p<0,01 exceto entre si. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD.

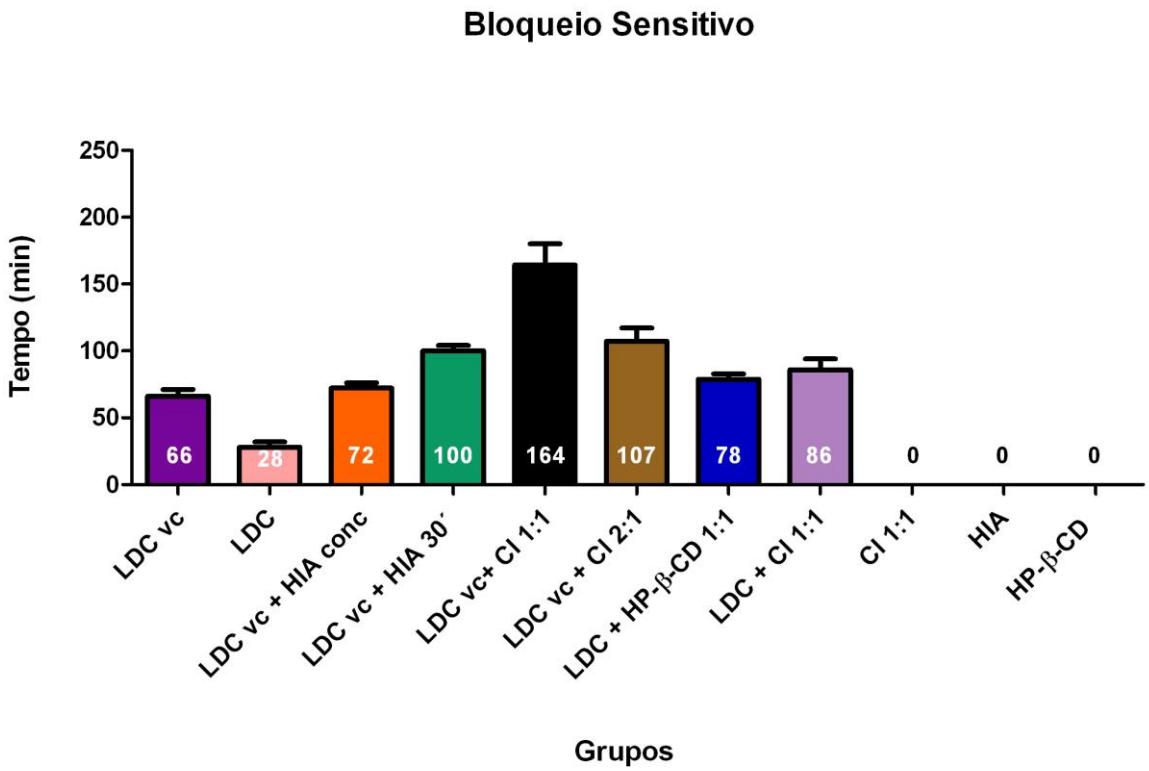


Gráfico 5.2 - Histograma indicando valores médios ± EP da duração do bloqueio sensitivo em nervo ciático. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

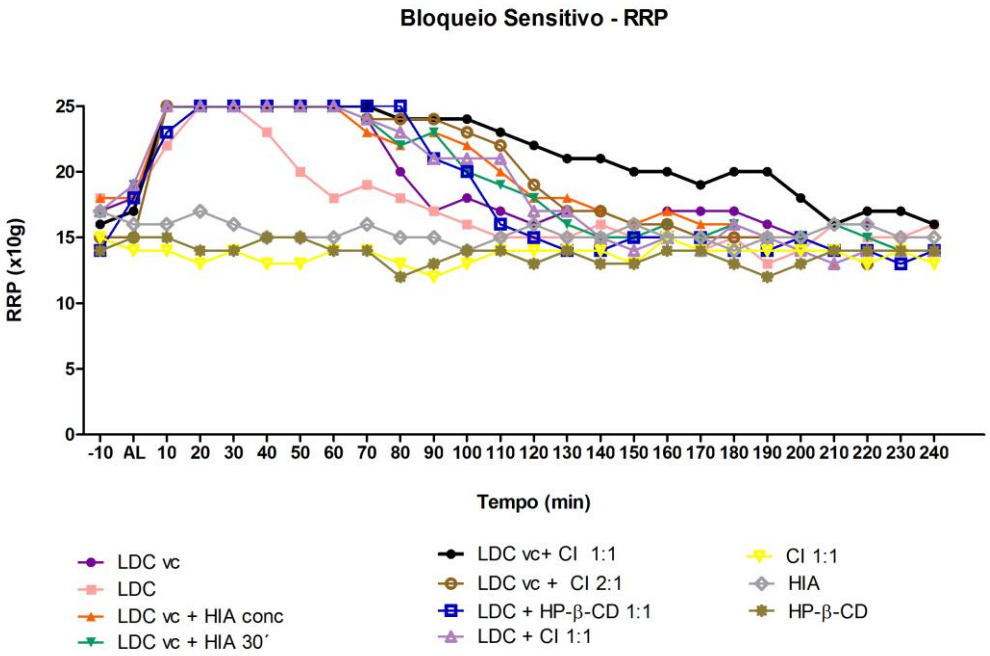


Gráfico 5.3 - Valores médios (gramas) da intensidade de pressão (peso) suportada para ocorrer o RRP, após estímulo nociceptivo ao longo do tempo nos grupos, ou seja, durante bloqueio sensitivo. RRP = reflexo de retirada da pata. RRP= reflexo de retirada da pata; LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

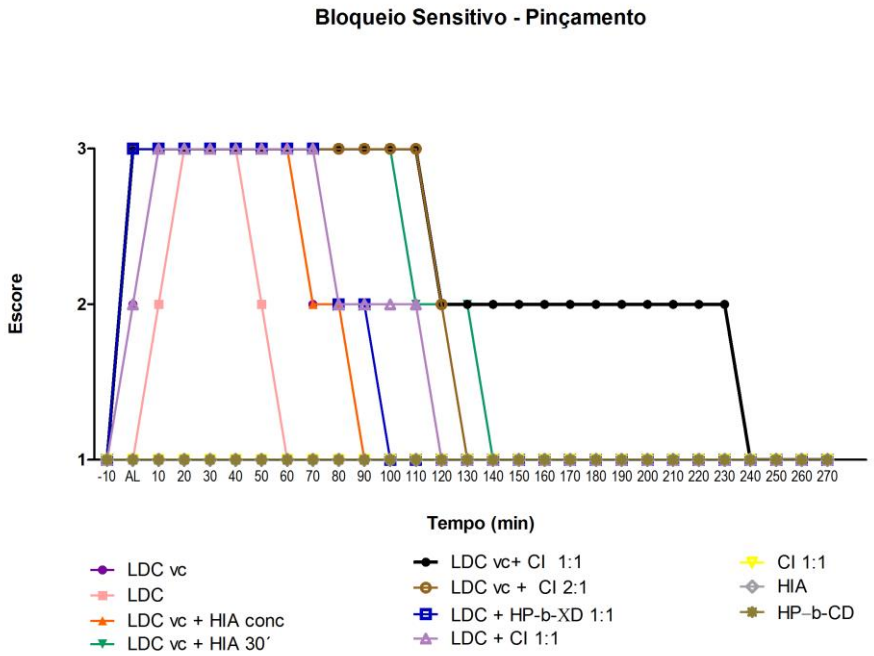


Gráfico 5.4 - Valores médios (escore) obtido para análise de bloqueio sensitivo após o teste de pinçamento (bloqueio completo escore 3, parcial 2, ausência 1) ao longo do tempo nos grupos. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

5.1.2 Bloqueio motor

Os valores para o tempo de latência do bloqueio motor, ou seja, o tempo para início e instalação de bloqueio motor completo, estão apresentados na tabela 5.3 e o gráfico 5.5 ilustra os resultados e apresenta a análise estatística (Kruskal-Wallis com teste auxiliar de comparações múltiplas de Dunn, $p<0,01$).

Tabela 5.3 **–** Média ± EP do tempo de demora para início e instalação do bloqueio motor (min) nos grupos estudados

Grupos	**Média ± Erro padrão (min)**
LDC (n=5)	5 ± 0
LDC vc (n=9)	9 ± 1
LDC vc + HIA injetada concomitantemente (n=29)	5 ± 0
LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5)	5 ± 0
LDC vc + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=18)	9 ± 1
LDC + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=10)	5 ± 0
LDC vc + CI 2:1 injetadas concomitantemente (n=12)	9 ± 2
LDC : HP-β-CD 1:1 (n=4)	5 ± 0
CI 1:1 (n=5);	Não se aplica
Hialuronidase (n=5)	Não se aplica
HP-β-CD (n=5)	Não se aplica

LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30” = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

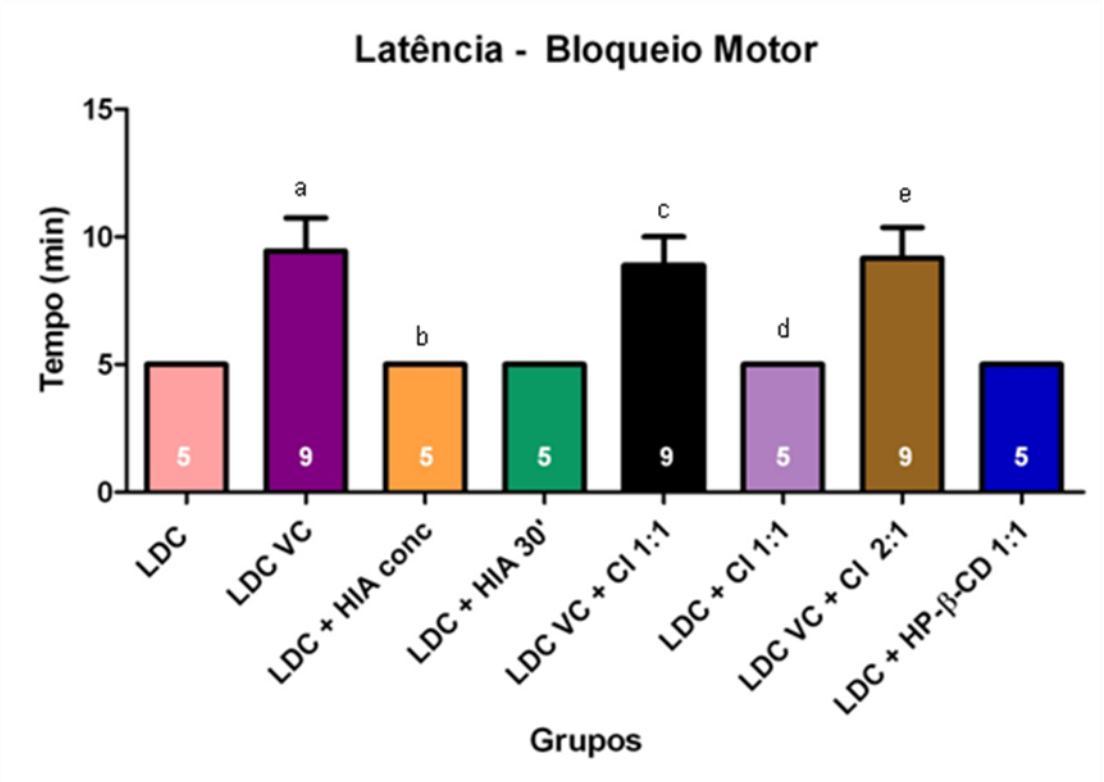


Gráfico 5.5 - Histograma indicando valores médios ± EP do tempo de latência para o bloqueio motor em nervo ciático e análise estatística. p<0,01 entre os grupos: [a] comparado com [b], [c] ; [b] comparado a [e]; [d] comparado a [b], [c] e [e]. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

Os resultados com o tamanho da amostra para cada grupo e resultado estatístico estão apresentados na apresentados na tabela 5.4 (Kruskal-Wallis com teste auxiliar de comparações múltiplas de Dunn, p<0,01). Os gráficos 5.6 apresenta os valores médios e erro padrão da média em minutos da duração do bloqueio motor completo, ou seja, duração da ausência do reflexo extensor postural e presença de claudicação período em que houve escore 3 e o gráfico 5.7 apresenta os dados em decorrência dos valores médios dos escores para cada grupo estudado.

Tabela 5.4 **-** Média aritmética ± EP do bloqueio motor (min), tamanho da amostra e análise estatística nos grupos estudados

Grupos	**Média ± Erro padrão (min)**
LDC vc (n=9)	63,33 ± 5
LDC (n=5)	30,33 ± 3[c]
LDC vc + HIA injetada concomitantemente (n=29)	75,03 ± 4
LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5)	78,33 ± 4
LDC vc + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=18)	148,89 ± 14[a]
LDC vc + CI 2:1 injetadas concomitantemente (n=12)	102,5 ± 11
LDC : HP-β-CD 1:1 (n=4)	72,5 ± 13
LDC + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=10)	138,00 ± 9[b]
CI 1:1 (n=5);	0 [c]
HIA (n=5)	0 [c]
HP-β-CD (n=5)	0 [c]

Análise estatística pelo teste Kruskal-Wallis com auxiiar de Dunn de comparações múltiplas (p<0,01). Grupo [a] P<0,01 com demais; entre [a] e [b] p>0,01; [c] P<0,01 com demais. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

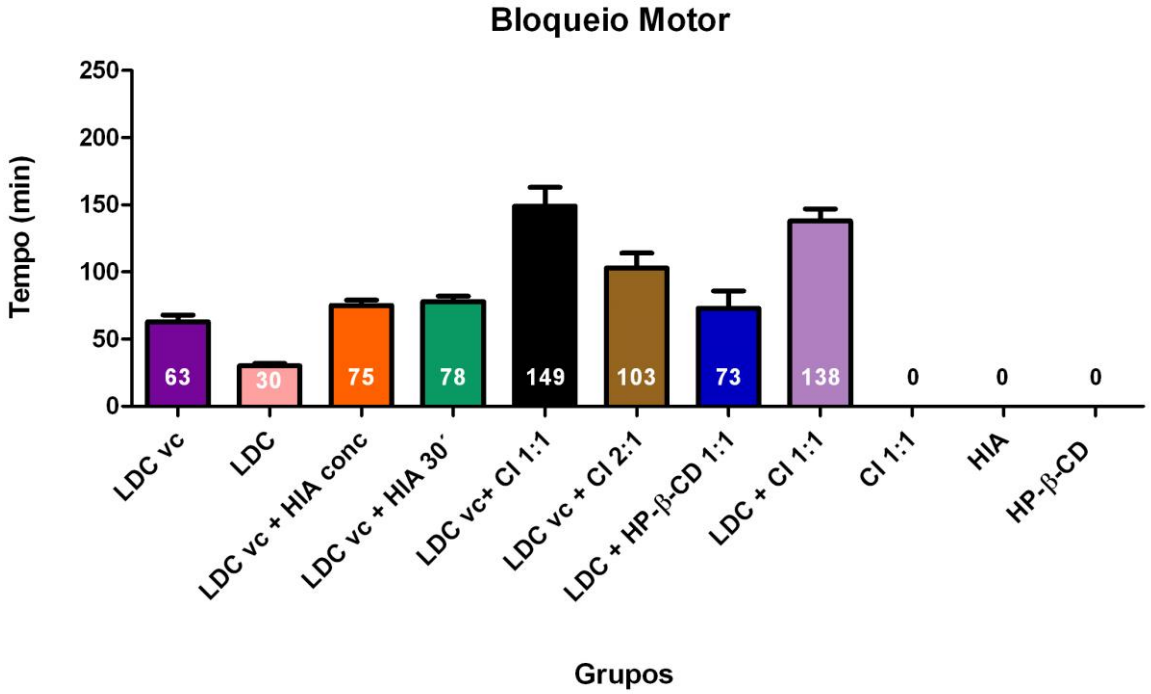


Gráfico 5.6 - Histograma indicando valores médios ± EP da duração do bloqueio motor em nervo ciático. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

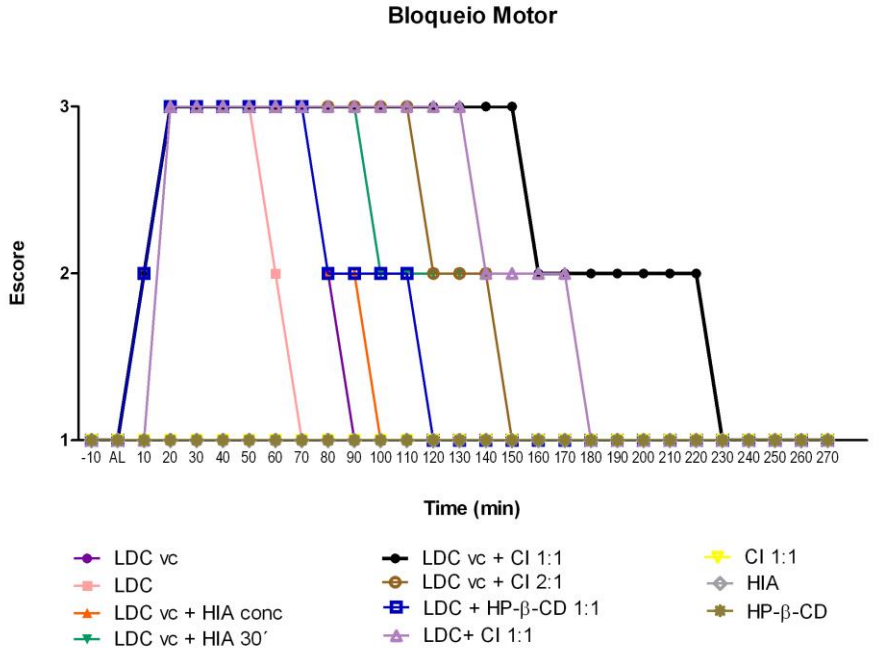


Gráfico 5.7 - Valores médios (escore) obtido para análise de bloqueio motor (bloqueio completo escore 3, parcial 2, ausência 1) pela ausência do reflexo extensor postural ao longo do tempo nos grupos. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

5.1.2 Bloqueio proprioceptivo

Os valores para o tempo de latência, ou seja, o tempo para início e instalação de bloqueio proprioceptivo completo, estão apresentados na tabela 5.5 e no gráfico 5.8.

Os valores para o tempo de latência do bloqueio proprioceptivo, ou seja, o tempo para início e instalação de bloqueio proprioceptivo completo, estão apresentados na tabela 5.5 e o gráfico 5.8 ilustra os resultados e apresenta a análise estatística (Kruskal-Wallis com teste auxiliar de comparações múltiplas de Dunn, $p<0,01$).

Tabela 5.5 - Média ± EP do tempo de demora para início e instalação do bloqueio proprioceptivo (min) nos grupos estudados

Grupos	**Média ± Erro padrão (min)**
LDC (n=5)	18 ± 1
LDC vc (n=9)	9 ± 1
LDC vc + HIA injetada concomitantemente (n=29)	5 ± 1
LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5)	5 ± 0
LDC vc + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=18)	7 ± 1
LDC + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=10)	5 ± 0
LDC vc + CI 2:1 injetadas concomitantemente (n=12)	8 ± 1
LDC : HP-β-CD 1:1 (n=4)	10 ± 4
CI 1:1 (n=5);	Não se aplica
Hialuronidase (n=5)	Não se aplica
HP-β-CD (n=5)	Não se aplica

LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30” = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

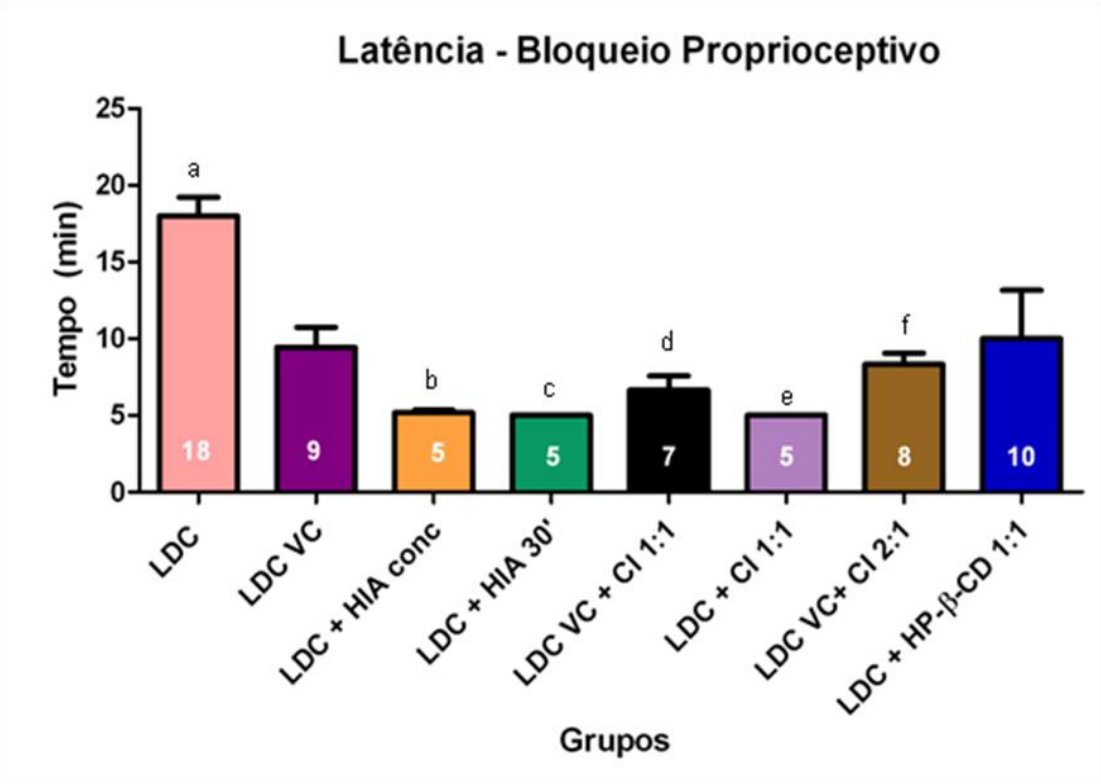


Gráfico 5.8 - Histograma indicando valores médios ± EP do tempo de latência para o bloqueio proprioceptivo em nervo ciático e análise estatística. p<0,01entre os grupos [a] comparado [b], [c], [d] e [e]; e entre os grupos [b] e [f]. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

Os resultados com o tamanho da amostra para cada grupo e resultado estatístico estão apresentados na apresentados na tabela 5.6 (Kruskal-Wallis com teste auxiliar de comparações múltiplas de Dunn, p<0,01). O gráficos 5.9 apresenta os valores médios e erro padrão da média em minutos da duração do bloqueio proprioceptivo completo, ou seja, duração da ausência da resposta de salto e da resposta de reposicionamento da pata (período em que houve escore 3) e o gráfico 5.10 apresenta os dados em decorrência dos valores médios dos escores para cada grupo estudado.

Tabela 5.6 - Média aritmética ± EP do bloqueio proprioceptivo (min), tamanho da amostra e análise estatística nos grupos estudados

Grupos	**Média ± Erro padrão (min)**
LDC vc (n=9)	64,44 ± 4[f]
LDC (n=5)	33,00 ± 3[d]
LDC vc + HIA injetada concomitantemente (n=29)	73,97 ± 4[f]
LDC vc + HIA injetada aos 30 min da anestesia (n=5)	88,33 ± 15[f]
LDC vc + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=18)	189,44 ± 16[a]
LDC vc + CI 2:1 injetadas concomitantemente (n=12)	107,05 ±10,45[c]
LDC : HP-β-CD 1:1 (n=4)	80,00 ± 9[f]
LDC + CI 1:1 injetadas concomitantemente (n=10)	116,00 ± 5[b]
CI 1:1 (n=5);	0 [g]
HIA (n=5)	0 [g]
HP-β-CD (n=5)	0 [g]

Grupo a p<0,01 dos demais; b p<0,01 dos demais, exceto de c ; d p<0,01 dos demais; f p>0,01 entre si; g p<0,01 exceto entre si. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30” = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente..

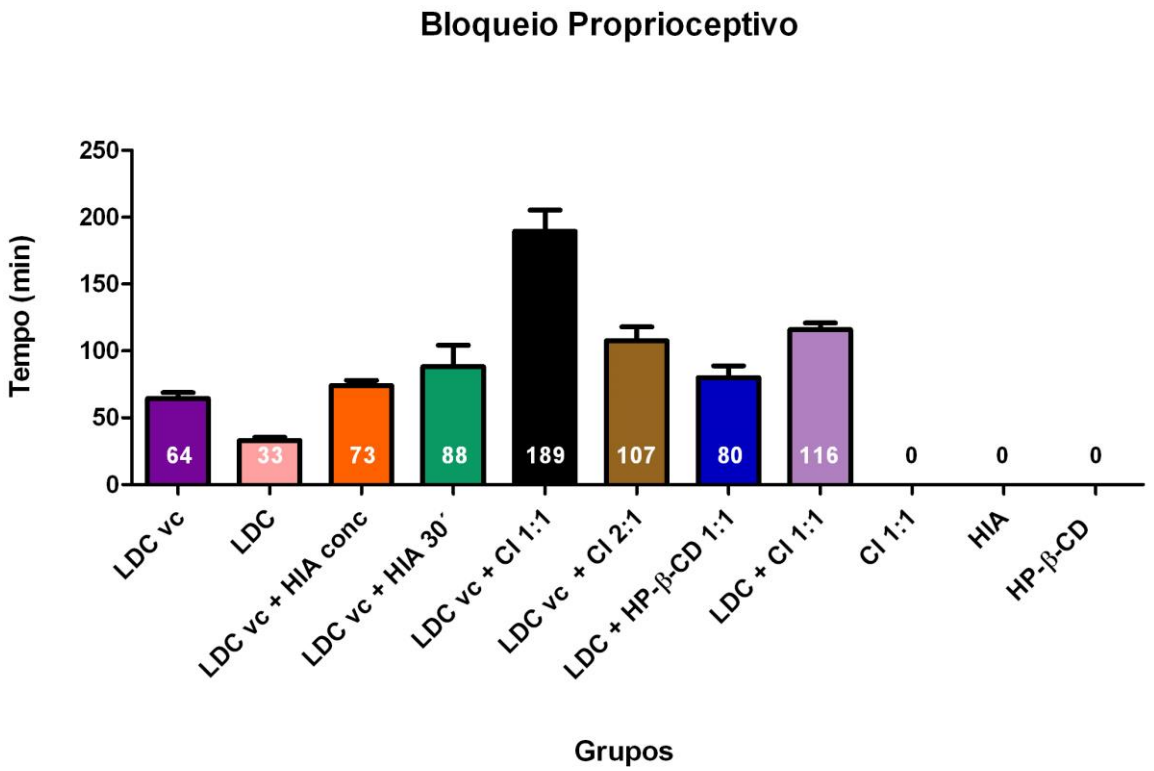


Gráfico 5.9 - Histograma indicando valores médios ± EP da duração do bloqueio proprioceptivo em nervo ciático. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

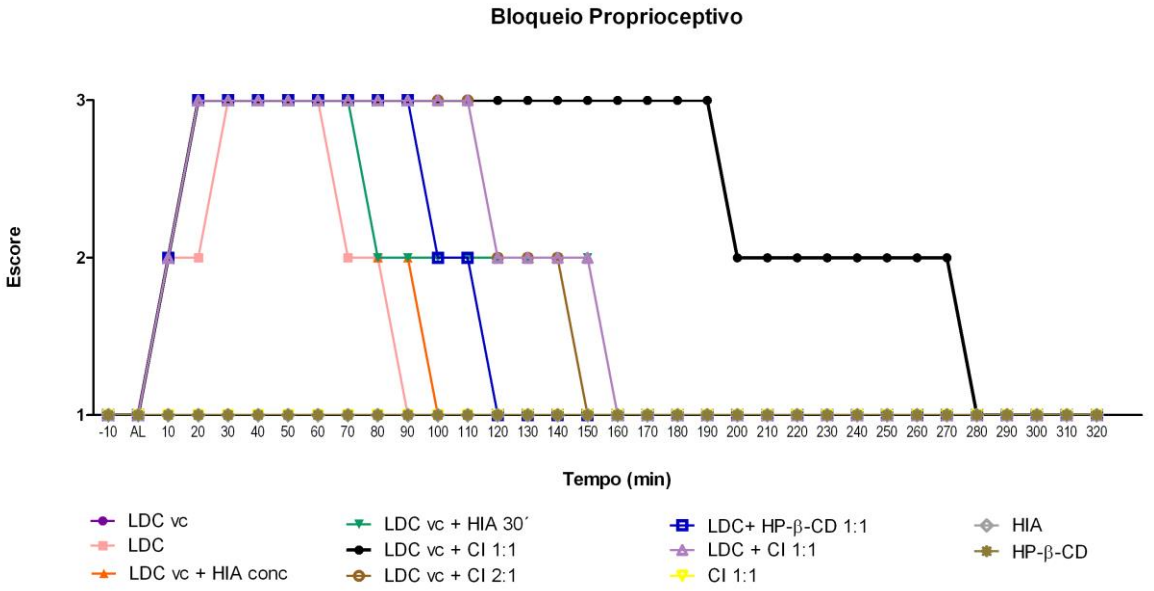


Gráfico 5.10 - Valores médios (escore) obtidos pela análise de bloqueio proprioceptivo (bloqueio completo: escore 3, parcial: 2, ausência de resposta: 1) pela ausência de resposta de salto da pata ao longo do tempo nos grupos. LDC vc= lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000; LDC= lidocaína sem vasoconstritor; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA:HP-β-CD; HIA 30" = HIA aplicada aos 30 minutos do início de ação anestésica; HIA conc = HIA aplicada concomitantemente.

5.2 Análise da Viabilidade Celular

Os resultados para os testes de citotoxicidade por Azul de Tripan e hemólise, estão expostos a seguir:

5.2.1 Ensaio de citotoxicidade por Azul de Tripan

Foi realizada análise estatística através do teste two-way ANOVA com auxiliar Bonferroni post-test, com dois fatores de variação (fármaco e tempo), conforme apresentado no gráfico 5.11. A lidocaína apresentou-se citotóxica em diluições menores que 25 vezes, isolada ou associada ao complexo de inclusão HIA: HP-β-CD ($p<0,001$, ANOVA), sendo que a associação não alterou sua citotoxicidade.

O complexo de inclusão isolado, não se apresentou citotóxico quando comparado ao grupo controle, em nenhuma das diluições estudadas ($p>0,05$, ANOVA).

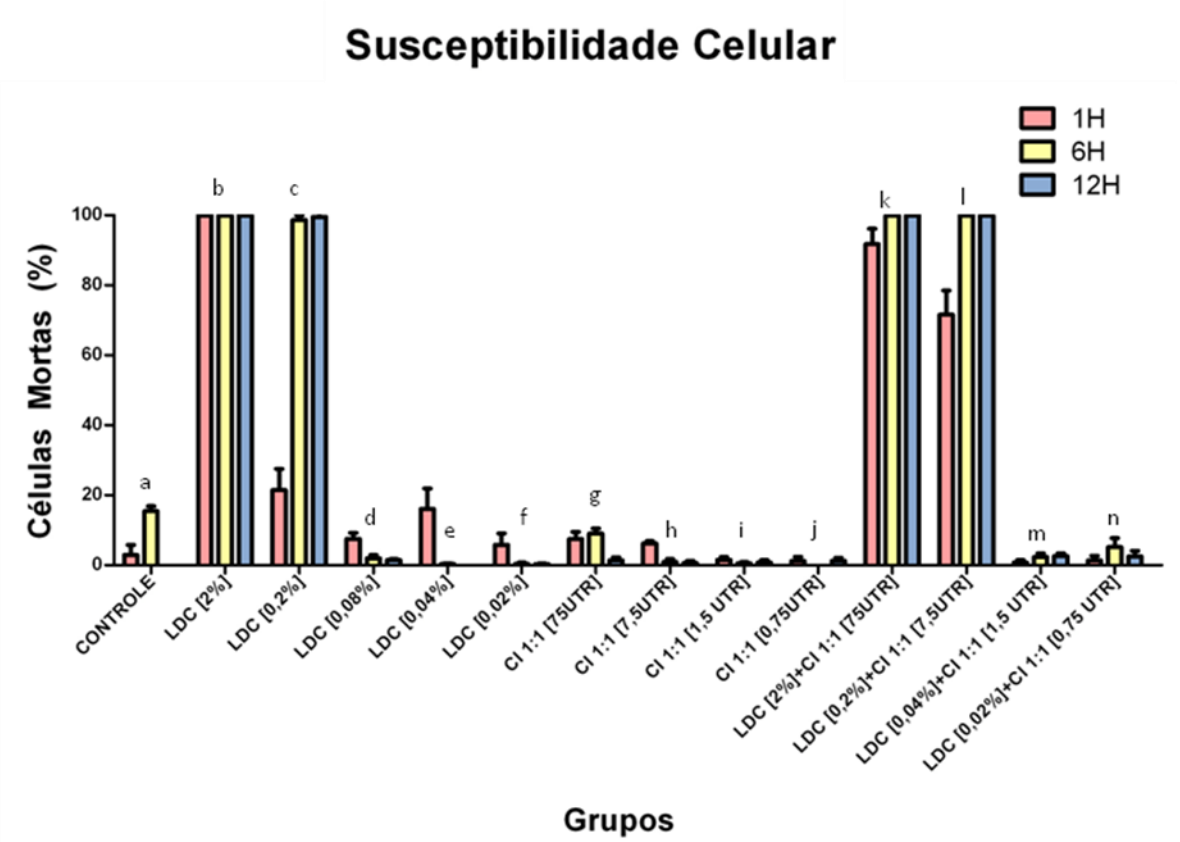


Gráfico 5.11 - Histograma indicando valores médios ± EP do percentual de células mortas através da análise da viabilidade celular de contagem por Azul de Tripan nos tempos de 1, 6, e 12 h para os grupos estudados e análise estatística. Houve diferença significativa entre os seguintes grupos: ^{b_a,c,d,e,f,i,j,k,l,m} (p<0,001); $^{b-g,h}$ somente em 1 h (p<0,001); ^{c_a,d,e,f,g,h,i,j,m,n} (p<0,001); ^{c_k,l} em 6 e 12 h (p<0,001); ^{e_a} somente em 6 a 12 h (p<0,001); ^{e_f} em 1 h (p<0,01); ^{e_g,h,i,j} (p<0.05) em 1 h; ^{e_m,n} em 1 h (p<0,05); ^{g_e,f,h,i,j} em 6 h (p<0,05); ^{k_a,c,d,e,f,g,h,i,j,m,n} (p<0,001); e ^{l_a,c,d,e,f,g,h,i,j,m,n} (p<0,001) (Two-way, ANOVA – Bonferroni) . LDC= lidocaína; CI = complexo de inclusão Hialuronidase: HP-β-CD. Valores de HIA em UTR/ml.

5.2.2 Teste de hemólise

No gráfico 5.12, estão expostos os valores percentuais da hemólise ocorrida em cada grupo de fármaco e nos diferentes volumes analisados (80 µl, 70 µl, 60 µl, 50 µl, 40 µl, 30 µl, 20 µl e 10 µl), além do resultado estatístico.

Através do teste estatítistico paramétrico ANOVA two way e auxiliar de Bonferroni post-test, foi encontrada diferença significante (p<0,001) de hemólise entre o grupo controle hemólise total (C2) e todos os demais grupos, os quais não apresentaram diferença significativa entre si (p>0,05).

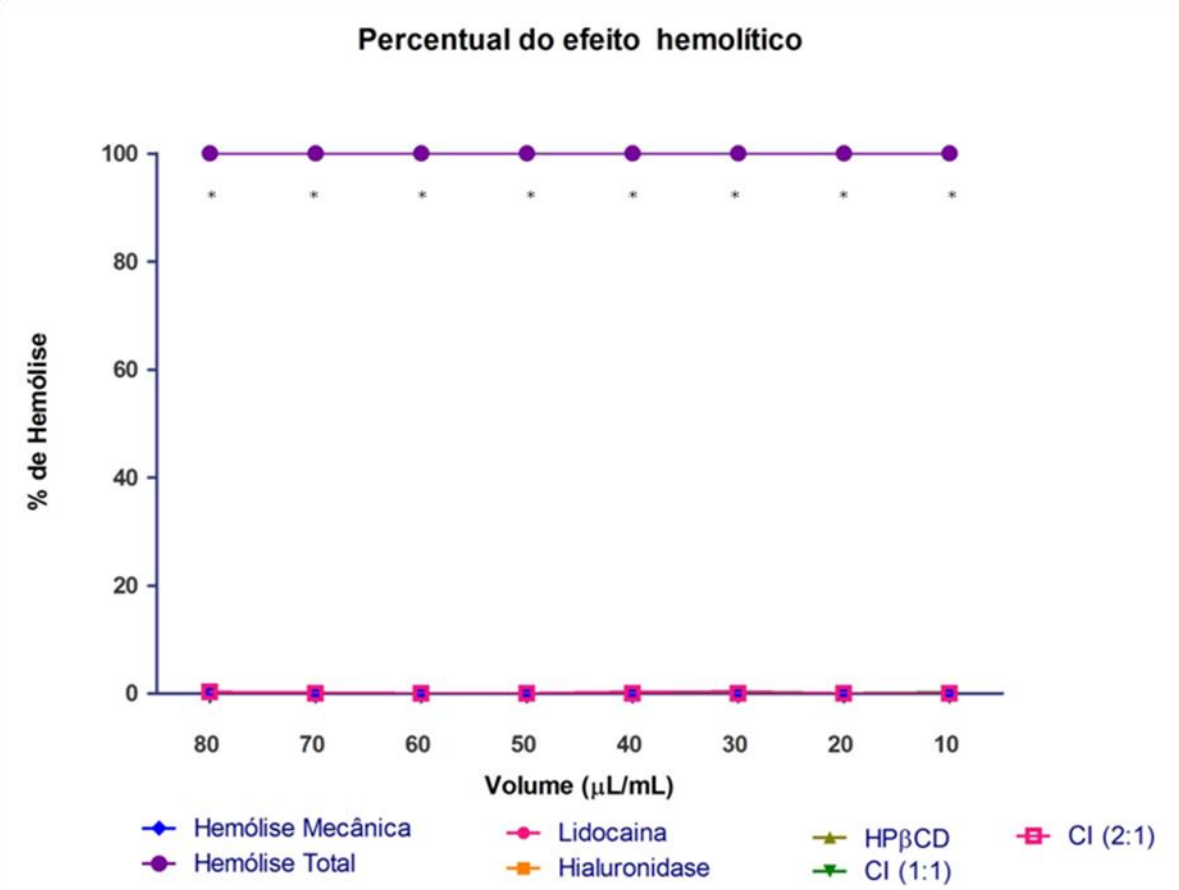


Gráfico 5.12 - Gráfico de linhas indicando o percentual de hemólise em eritrócitos de ratos, para cada volume dos fármacos, após exposição à lidocaína, hialuronidase (HIA), HP-β-CD (Hidroxipropil-β-ciclodextrina), CI 1:1 (complexo de inclusão HIA: HP-β-CD 1:1), CI 2:1 (complexo de inclusão HIA: HP-β-CD 2:1) comparado aos controles C1 (hemólise mecânica - PBS) e C2 (hemólise total - água destilada). (*p<0,001 entre: C2 x fármacos e C1 x C2).

Os resultados da média aritmética de absorbância das triplicatas para cada volume de cada fármaco e controles estão evidenciados na tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Média das absorbâncias de amostras contendo os fármacos nos diferentes volumes analisados: lidocaína 2%, hialuronidase, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) e complexo de inclusão HP-β-CD: Hialuronidase 1:1 (CI 1:1)

Volume (µl)	LDC (nm)	HIA (nm)	CI 1:1 (nm)	HP-β-CD (nm)
80	0,002	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]
70	0,002	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]
60	0,000	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]
50	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]
40	0,003[a]	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]
30	0,003	0,000[a]	0,001[a]	0,000[a]
20	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]	0,000[a]
10	0,000[a]	0,000[a]	0,002[a]	0,000[a]

[a] Os valores negativos de absorbância foram considerados como 0,000 (em concordância com o estudo de Levinson, 1981). Grupos controle: C1=0,000 nm; C2= 1,328 nm. LDC = lidocaína; HIA= hialuronidase; CI= complexo de inclusão HIA: HP-β-CD; HP-β-CD= 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

6 DISCUSSÃO

A eficácia da hialuronidase (HIA) em prolongar a ação anestésica quando injetada concomitantemente aos anestésicos locais tem sido abordada em diversos estudos anteriores (Mindel, 1978; Nicoll et al,, 1986; Thomson, 1988; Sarvela; Nikki, 1992; Dempsey et al., 1997; Kallio et al., 2000; Mantovani et. al, 2001; Hamada et al., 2005; Remy et al., 2008; Pacella et al., 2013) bem como a diminuição de efeitos adversos pós-anestesia (Hamada et al., 2005), sendo utilizada quase que exclusivamente com sucesso para anestesia oftalmológica. Os estudos mais recentes em oftalmologia testam anestésicos diversos, alcalinizados ou não, mas todos utilizam a HIA como padrão de comparação com novos fármacos ou técnicas (Islam et al, 2012; Gordazi et al, 2011; Pacella et al., 2010; Jaichandran et al., 2010). Contudo, estudos da utilização da enzima a 150 UTR/ml para fins odontológicos com metodologia apropriada datam somente de 2001, quando Ridenour et al., não obtendo resultados satisfatórios devido à ocorrência de reações adversas, contraindicam seu uso. Posteriormente, o estudo de Borsatti et al. (2004) levantou a hipótese de que se a HIA fosse injetada tardiamente poderia prolongar a duração de ação anestésica, e evitar efeitos adversos. Tempestini-Horliana et al. (2008) confirmaram que a hialuronidase 75 UTR/ ml injetada aos 30 minutos da anestesia, e, portanto, antes do término do bloqueio nervoso, prolongou o efeito anestésico sem induzir efeitos indesejáveis, tendo como único inconveniente a necessidade de uma nova puntura para a injeção da enzima em questão. Mais recentemente, Satish et al. (2013) repetiram o protocolo do uso da HIA injetada tardiamente e relataram sucesso, também, quanto ao aumento do tempo de duração da anestesia pulpar, mesmo em casos de pulpite, ou seja, quando o paciente apresenta sintomatologia dolorosa.

Atualmente há um apelo por pesquisas que buscam estender a duração do bloqueio nervoso de anestésicos locais de ação intermediária com diminuição dos efeitos tóxicos, o que pode ser alcançado com a utilização de adjuvantes como, por exemplo, sistemas de liberação controlada (Araújo et al., 2006; Cereda et al, 2012). A maioria dos estudos realiza a complexação do anestésico local em nanopartícula, diferentemente de nossa pesquisa que incorporou uma enzima (Fréville et al., 1996; Araújo et al., 2006; Ranjbar et al., 2012). Deste modo, testamos a utilização da HIA complexada com a HP-β-CD que é uma nanopartícula com uso já consagrado em

composições farmacológicas, principalmente, por sua capacidade de incorporar o fármaco e aumentar sua biodisponibilidade e modular e/ou vetorizar sua liberação, conforme descrito pela revisão de Saltão e Veiga (2001). Além da vantagem de ser utilizada pela via parenteral pela sua maior hidrofilia.

O modelo experimental de bloqueio de nervo ciático de rato tem sido muito utilizado para avaliação da eficácia de anestésicos locais, principalmente por ser um nervo misto, adequado para avaliação das funções nociceptiva, motora e proprioceptiva (Thalhammer et al., 1995). Quanto à metodologia para avaliação do bloqueio da função sensitiva, optamos pela utilização dos testes com o analgesímetro (que avalia reflexo de retirada da pata) (Araujo et al., 2006) e de pinçamento da pata (Thalhammer et al. 1995; Popitz-Bergez et al., 1995), que apresentam características subjetivas de avaliação, principalmente o teste de pinçamento (escala de escores). Até o momento, estes testes não tinham sido utilizados em associação, necessitando de análise de correlação estatística entre os dados. Observamos semelhança nos resultados dos testes que são complementares usados para confirmação do bloqueio nociceptivo (gráficos 5.3 e 5.4).

Os resultados do bloqueio nociceptivo pela lidocaína (tabela 5. 2; gráficos 5.2, 5.3 e 5.4) em nervo ciático obtidos neste estudo sugerem ter ocorrido liberação tardia da HIA quando em complexação com HP-β-CD para a razão molar 1:1, sendo o tempo médio de duração de ação anestésica de aproximadamente 164 minutos, para a razão molar de 2:1 de 107 minutos, e de 100 minutos para a HIA aplicada 30 minutos após o início do bloqueio anestésico, ambas com LDC com vasoconstritor. Isso demonstra para a solução contendo LDC com vasoconstritor e o CI 1:1, um bloqueio sensitivo 2,5 vezes maior que a lidocaína com epinefrina (1:100.000) (66 min), e de aproximadamente 5,9 vezes maior que a lidocaína sem vasoconstritor (28min). Já o bloqueio sensitivo da LDC vc + CI na razão 1:1 (164 min) também foi significativamente maior (0,5 vezes), que na razão 2:1 (107 min), cerca de uma hora a mais de duração. A HIA concomitante a LDC vc (72 min) também foi avaliada não diferindo significativamente da LDC vc (66 min), provavelmente pela dispersão das moléculas para os tecidos vizinhos logo no início da anestesia, não sendo possível avaliar a presença de efeitos adversos em modelo animal através desse método.

Ainda, obtivemos um tempo médio 78 minutos na duração anestésica utilizando LDC sem vasoconstritor complexada a HP- β -CD, na razão molar 1:1 (LDC:HP- β –CD). No trabalho de De Paula et al. (2004), utilizando lipossoma com

outro anestésico local de ação intermediária, a mepivacaína, também em bloqueio ciático, a mepivacaína mostrou um aumento de duração de ação de até 1,7 vezes para todas as concentrações testadas (0.5, 1 e 2%) quando utilizada neste sistema de liberação, comparada a mepivacaína isolada. Também em nosso estudo, o uso de nanopartícula HP-β-CD mostrou vantagem quando a lidocaína estava incorporada (um dos grupos controle), apresentando uma duração de ação 2,5 vezes maior ($p<0,01$) quando comparada com a lidocaína isolada (gráfico 5.2).

Estudos anteriores utilizando 1 ml lidocaína a 1% obtiveram bloqueio nociceptivo completo (bloqueio sensitivo) por somente 22,5 minutos, segundo Thalhammer et al. (1995) e de 37 minutos Popitz-Bergez et al. (1995). Este último estudo ainda avaliou a concentração intraneural de lidocaína durante todo bloqueio nervoso ciático, sendo observado declínio de dois terços do conteúdo de AL injetado (1,4 ml de LDC 1%, 1,4 mg), e antes do término do bloqueio completo havia ainda 1,6% (22,4 µg) dessa concentração. Esse dado fortalece a hipótese de que a injeção de HIA próxima ao término do bloqueio completo ainda encontraria moléculas suficientes para serem redirecionadas ao feixe nervoso, havendo a necessidade de confirmação com testes de avaliação da relação intraneural de LDC após a administração da HIA nesse momento.

Já que o bloqueio completo não depende apenas da concentração intraneural do anestésico, mas também da sua difusão longitudinal (Lesson; Strichartz, 2013), há a possibilidade de a HIA ter promovido também um espalhamento do AL ao longo do nervo. Esses autores ressaltam que o bloqueio nervoso periférico por AL não é tão eficiente devido ao índice de distribuição natural dos fármacos e pela impossibilidade de alteração da organização anatômica, no entanto, nossos resultados sugerem que a HIA promova alteração da organização do tecido conectivo ao redor do nervo possibilitando a maior distribuição do AL, alterando a farmacocinética.

Gerner et al. (2010) consideram que o fator mais relevante para o bloqueio funcional completo é a concentração de LDC junto ao nervo. Em seus experimentos, utilizaram uma matriz impregnada com a LDC em concentrações diversas e, com diferentes protocolos de liberação, para manter a taxa de liberação de AL constante a 5% ou a 16%, caracterizando, portanto, um sistema de liberação controlada. A matriz era colocada junto ao nervo através de um processo cirúrgico, concluem que

quando a taxa de liberação mantinha concentrações maiores (16%) o bloqueio tornava-se mais efetivo e perdurava por maior período de tempo.

Para o bloqueio motor, nossos resultados com a solução contendo LDC vc + CI 1:1 (149 min) foram significativamente maiores (2,4 vezes) que os valores para LDC vc (63 min), em relação à LDC (30 min) 4,9 vezes maior, e 1,9 vezes maior que para HIA aplicada após 30 minutos do início de ação anestésica. Obtivemos um tempo médio de bloqueio completo de 149 minutos (LDC vc + CI 1:1), sem estudos anteriores para comparação. Nossos resultados para a LDC foram similares aos obtidos por Thalhammer et al. (1995) de 30 minutos e, Popitz-Bergez et al. (1995) de 40 minutos, ambos avaliando a resposta ao reflexo extensor tibiotarsal.

Também no bloqueio proprioceptivo, a duração com a utilização da LDC vc + CI 1:1 (tempo médio de 189 min) foi 5,7 vezes maior que a LDC (33 min), 3 vezes maior que LDC vc (64 min) e 2,1 vezes maior do que quando da utilização da HIA após 30 minutos do início de ação anestésica (88 min). Em outro estudo com lidocaína 1% o tempo médio de bloqueio foi de 20 minutos (Thalhammer et al., 1995). Nenhum estudo utilizando o complexo de inclusão HIA:HP-β-CD foi encontrado para comparação.

Embora não seja característica de AL de ação intermediária, como a lidocaína, promover bloqueios motor e proprioceptivo, comum entre os anestésicos de longa duração (bupivacaína) (Beilin; Halpern, 2010; Covino; Vassalo, 1976), a associação entre a lidocaína e o complexo de inclusão HIA: HP-β-CD possibilitou melhora na eficácia desses parâmetros. Isso não significa que o complexo de inclusão altere as características físico-químicas do AL, mas provavelmente sua farmacocinética por alterar sua distribuição intraneural e ao longo do feixe. O estudo de Sudoh et al., 2004, avaliou pelos mesmos métodos o bloqueio funcional utilizando bupivacaína 0,5% e obteve uma duração média de bloqueio de 90 minutos (para os bloqueios sensitivo, motor, e proprioceptivo). Comparando nossos resultados com os valores de tempo de bloqueio da bupivacaína 0,5% sem vasoconstritor (90 min), obtivemos para a LDC vc + CI 1:1 um tempo médio de 164 minutos de bloqueio sensitivo, 149 minutos de bloqueio motor e 189 minutos de bloqueio proprioceptivo, sugerindo que a nova associação pode vir a ser uma alternativa futura aos anestésicos de longa duração.

Já a lidocaína sem vasoconstritor associada ao complexo de inclusão (LDC + CI 1:1) apresentou duração de bloqueio sensitivo 86 minutos, motor de 138

minutos e proprioceptivo de 116 minutos, poderia vir a ser uma futura alternativa a lidocaína com vasoconstritor que neste estudo teve duração de 66, 63 e 64 minutos, respectivamente (tabelas 5,2, 5.4 e 5.6).

Destaca-se o fato de que o volume e concentração dos anestésicos locais utilizados isolados ou associados ao complexo de inclusão foram os mesmos, o que deixa evidências de que o aumento no tempo de duração anestésica está associado à HIA, acentuada com a utilização do complexo de inclusão. As recomendações sobre dose máxima de utilização dos anestésicos locais encontradas na literatura são bastante divergentes (Roserberg et al., 2004), assim, nossos resultados levantam a possibilidade da diminuição da dose de anestésico local por sessão, quando da utilização dos AL associados aos sistema de liberação lenta da HIA, o que visa conferir diminuição dos riscos para o paciente sem prejuízo da eficácia, necessitando de confirmação futura em humanos.

Ainda, apesar da afirmação de Adams (2001) de que a presença de HIA promove alcalinização do meio, o que diminui o período de latência e facilita o bloqueio anestésico, não observamos diferença significativa para esse parâmetro entre os grupos com HIA e os com lidocaína isolada ou associada ao CI, sugerindo que o aumento do tempo de duração de ação anestésica não se deve à alcanização do meio, pois não foi suficiente para alterar nem mesmo a latência que é mais sensível à variação de pH do meio. No entanto, estudos sobre a influência do pH com a HIA complexada se fazem necessários, já que pesquisas que exploraram esse parâmetro encontraram menor período de tempo para o início de ação anestésica (Dempsey et al.,1997, Mantovani et al., 2001; Pacella et al., 2013) com o uso do AL + HIA isolada em anestesia oftalmológica.

Há a necessidade de novos estudos que contemplem a comparação da duração de ação anestésica entre anestésicos associados ao complexo de inclusão, variando volume e concentração do anestésico e da HIA complexada, e anestésicos de ação intermediária ou longa.

Estudos sobre o perfil de liberação da HIA do CI e sua relação com a duração do bloqueio nervoso são necessários, entretanto, nossos resultados obtidos até o momento com os parâmetros já avaliados, deixam indícios de que a biodisponibilidade da enzima ocorre mais lentamente quando nanoagregada, possivelmente tendo sua ação de difusão antes da regressão da anestesia, permitindo a entrada do anestésico remanescente ao redor do feixe nervoso para a

instalação do bloqueio. Inicialmente esperava-se que com a inclusão da HIA e injeção concomitante desse CI ao AL teríamos resultados semelhantes aos do grupo de HIA injetada aos 30 minutos do início de ação anestésica, coincidindo com os resultados apresentados por Tempestini-Horliana et al. (2008) para o último grupo. Contudo, nossos resultados foram ainda mais promissores apresentando aumento significativo no tempo de duração de ação anestésica para os grupos que utilizaram o CI (1:1 e 2:1) em comparação ao da HIA injetada aos 30 minutos. Ainda não se sabe se o complexo de inclusão já estava liberando a HIA desde o início de sua injeção concomitante ao AL, e, se esse fato influenciou os resultados.

As soluções de complexo de inclusão HIA: HP-β-CD, HIA e HP-β-CD, isoladas não induziram déficit funcional em nervo ciático de rato nas concentrações utilizadas neste estudo (tabelas 5.1 a 5.6). Nenhum efeito adverso ou alteração de comportamento foi observada nos animais após a reversão completa do bloqueio nervoso ciático, com resposta similar à pata contralateral.

Com o objetivo de verificar o efeito citotóxico do complexo de inclusão da HIA nanoagregada à HP-β-CD administrado em associação ao anestésico local LDC, sobre as células fibroblásticas e eritrócitos, foram feitos testes *in vitro* de viabilidade celular e de hemólise, respectivamente, comparando diversos grupos com os fármacos isolados e variando a razão molar do complexo.

Esperava-se um resultado favorável com a utilização de diluições, com base em indícios já conhecidos na literatura de que a citotoxicidade dos anestésicos locais são tempo e dose dependentes (Perez-Castro et al., 2009; Yang et al., 2011) e acentuado pelo uso de nanotecnologia que possibilita a utilização de quantidades menores de anestésicos (Okamoto et al., 1999). Ademais, as CD apresentam, ainda, a vantagem de alterar a duração e intensidade do efeito dos fármacos devido à baixa absorção sistêmica dos complexos (Araújo et al., 2003) e por possibilitar que o fármaco permaneça por mais tempo restrito ao sítio de injeção (De Paula et al., 2010).

Sendo a meia-vida da LDC de aproximadamente 3 horas (Moore et al, 2008), e a HIA totalmente eliminada em 4 horas (Menzel; Faar, 1998), o tempo de exposição das células aos fármacos no teste de contagem (exclusão) por Azul de Tripan foi de 1, 6 e 12 horas, pois esse tempo talvez seria suficiente para que aos fármacos testados fossem distribuídos ou eliminados pelo processo metabólico. Deste modo, numa tentativa de simular o processo difusor ou metabólico, também,

foram testados os fármacos nas mesmas concentrações injetadas clinicamente em humanos, lidocaína 2% e HIA 75 UTR/ml (Satish et a., 2013; Tempestini-Horliana et al., 2008).

Nossos resultados em fibroblastos embrionários de ratos confirmam que a citotoxicidade da lidocaína 2% é tempo e concentração dependente, coincidindo com os do estudo de Yang et al. (2011), utilizando células de Schwan, e com os resultados de Perez-Castro et al. (2009), em células de neuroblastoma.

A concentração citotóxica encontrada para a lidocaína foi acima de 0,08% (25 vezes diluída da concentração utilizada clinicamente - 0,8 mg/0,04 ml), em células fibroblásticas de rato, nestas condições experimentais (gráfico 5.11). No entanto, há a necessidade de avaliar outras concentrações da lidocaína no intervalo 0,04-0,08%.

Devido ao fato do complexo de inclusão não ter interferido na citotoxicidade da lidocaína, sustenta-se a hipótese de que não houve troca de posição entre a o anestésico e a HIA dentro da nanopartícula, ou seja, não houve competição pelo sítio de ligação na ciclodextrina. Segundo Stella e He (2008) não há relatos de competição dos fármacos coadministrados com o complexo de inclusão pelo sítio de ligação na ciclodextrina.

De acordo com nossos resultados, foi constatado que para os grupos LDC + HIA:HP-β-CD 1:1 e LDC: HP-β-CD, a presença da HP-β-CD não interferiu na citotoxicidade da LDC (gráfico 5.11), ou seja, quando complexada ou associada a HIA: HP-β-CD, concentrações maiores de LDC, apresentaram a mesma toxicidade de quando estavam isoladas, mais acentuada em 6 e 12 horas.

Quanto à HP-β-CD isolada, se mostrou segura em todas as concentrações utilizadas (0,18-18 mg) (gráfico 5.11), o que condiz com o estudo de Nimbalkar et al. (2001) que avaliaram a citotoxicidade de diferentes concentrações da HP-β-CD (0.1, 0.5 e 1% ou seja, 1 mg, 5 mg e 10 mg) através da contagem por Azul de Tripan em células pulmonares, e conclui que não houve redução significativa no número de células mesmo após 72 horas, comparando-se ao controle (meio de cultura).

A avaliação da integridade da membrana do eritrócito (teste de hemólise) apresenta-se como um modelo de estudo satisfatório para análise da relação e/ou interação de fármacos com membranas biológicas (Malheiros et al., 2004), servindo, assim, como parâmetro para a detecção de lise devido a danos diversos na membrana celular (Watts; Hand, 2007), sendo, portanto, um método amplamente

utilizado para avaliar a toxicidade de nanopartículas e de complexos de inclusão (Dobrovolskaia et al., 2008). De acordo com Malheiros et al. (2004), adicionalmente, também analisa o dano às proteínas celulares liberadas (desnaturação), observados com acuidade de acordo com as mudanças na absorbância da oxihemoglobina, quantificadas por espectrofotometria. Segundo, Helenius e Simons (1975) o processo de lise se divide nas seguintes fases: (1) adsorção dos fármacos na membrana; (2) penetração na bicamada lipídica; (3) alteração da permeabilidade de membrana (4) modificações no equilíbrio osmótico; (5) extravasamento do conteúdo intracelular.

Em relação à hemólise induzida pelos fármacos analisados, LDC, HIA, HP-β-CD, CI 1:1, CI 2:1 e o controle C1 (hemólise mecânica - PBS) diferiram significativamente ($p<0,001$) do controle C2 (hemólise total - água destilada), para os diferentes volumes, indicando que houve preservação da membrana eritrocitária. Excetuando-se o grupo C2 (hemólise total), os demais grupos não diferiram entre si nos diferentes volumes. Em nossos resultados, a HP-β-CD isolada não induziu hemólise em eritócitos de rato, o mesmo observado por Volobuef et al. (2012) em eritrócitos humanos.

Enfatizamos que, ao contrário dos resultados obtidos com o teste de viabilidade celular por Azul de Tripan, quanto ao efeito hemolítico, a LDC apresentou menor toxicidade nas concentrações utilizadas, onde nossa maior concentração foi 0,0055 mM/80 µl, correspondendo à concentração de 2% de lidocaína que é utilizada clinicamente. Essa concentração é muito menor que a descrita por Malheiros et al. (2004) onde a C_{50} (concentração que induz 50% de hemólise) para a lidocaína foi >140 mM.

Segundo Seeman (1966), baixas concentrações de anestésicos locais apresentam efeito protetor aos eritrócitos, enquanto altas concentrações induzem hemólise dependente da osmolaridade. Ainda, Malheiros et al. (2004) demonstraram que a concentração protetora (C_{prot}) da LDC é até 16,1 mM, muito maior que a utilizada em nosso estudo, indicando que a concentração que utilizamos está dentro desta faixa protetora.

O potencial de induzir hemólise varia entre os anestésicos locais, onde, de acordo com Covino e Vassalo (1976), à procaína é atribuída potência com índice 1, 2 para a mepivacaína, 3 da prilocaína , 4 para a lidocaína e 16 para a bupivacaína para pH de 7,4 à 22°C.

Tanto a HIA isolada quanto aquela nanoagregada no CI 1:1 não apresentou efeito hemolítico significante nas concentrações estudadas, sendo a maior concentração utilizada de 7,5 mg/80 µl ou 0,013 mM/80 µl, correspondente a 75 UTR utilizada no bloqueio funcional desta pesquisa. Neste estudo, não foi possível confirmar o observado por Loftsson e Masson (2001) e por Kurkov e Loftsson (2013) de que a presença de ciclodextrina reduziria a taxa de hemólise do fármaco incorporado, porque no grupo HIA isolada também não houve efeito hemolítico (Gráfico 5.12). Entretanto, esse fato foi confirmado no experimento de Araújo et al. (2008) com outro anestésico local, a ropivacaína. Quando a ropivacaína estava isolada, apresentou efeito hemolítico, mas quando incorporada no complexo de inclusão formado entre a ropivacaína e a HP-β-CD, houve significativa redução na taxa de hemólise.

Para as soluções que continham HIA foi utilizado o veículo da mesma (solução disponível comercialmente – Apsen) que contém o cloreto de benzalcônio e a água destilada. O cloreto de benzalcônio por si só, que é um tensoativo catiônico, é capaz de induzir hemólise conforme afirmado por Abreu (2008), bem como a água destilada no grupo controle (C2) de hemólise total que induz lise hiposmótica. Porém, em nenhum dos grupos que apresentavam HIA, e, portanto, utilizaram o veículo (cloreto de benzalcônio e água destilada), foi observado aumento significativo da taxa hemolítica, porque provavelmente ambos os componentes encontravam-se em baixíssima proporção na formulação e/ou houve alteração da osmolaridade pela HIA, necessitando de investigação posterior.

Quanto ao teste de hemólise, o único grupo que não foi realizado neste trabalho, foi o grupo lidocaína associada ao complexo de inclusão HIA: HP-β-CD, no entanto, a partir da observação dos resultados, para os fármacos isolados (gráfico 5.12), sugere-se que esta mistura não seria capaz de induzir efeito hemolítico.

Uma das limitações dos testes de citotoxicidade, contagem por Azul de Tripan e hemólise, foi a não utilização de concentrações maiores para obtenção da CI_{50} (concentração que induz 50% de morte celular) bem como da C_{50} (concentração que levasse a 50% de hemólise) de cada grupo, assim como a utilização do complexo de inclusão em outras razões molares.

Concluindo, quando a nanopartícula carreadora atrasa a disponibilidade da enzima, mantém os mesmos benefícios do protocolo de injetar a hialuronidase antes do final da anestesia para prolongar a duração anestésica, porém, sem o

inconveniente de ter que dar nova puntura no paciente. Além disso, esse novo protocolo, evitaria a necessidade de complementação anestésica, diminuindo o risco de toxicidade sistêmica pelo anestésico local com a vantagem de poder ser utilizado para todos os pacientes e, principalmente, para aqueles com restrição de dose máxima por consulta, contraindicação absoluta ao uso de vasoconstritor adrenérgico ou mesmo anestésicos locais de longa duração, uma vez que os resultados da utilização de anestésicos locais sem vasoconstritor em associação ao complexo de inclusão HIA:HP-β-CD se mostraram promissores.

Ressaltamos a necessidade de estudos com métodos de citotoxicidade mais sensíveis e menos subjetivos para quantificar e qualificar os tipos de morte celular induzidas pelas substâncias aqui testadas e, imunoensaios de citocinas inflamatórias, visando resultados mais efetivos quanto à segurança da utilização do complexo antes de ensaios clínicos em humanos.

7 CONCLUSÕES

Nestas condições experimentais:

O complexo de inclusão HIA:HP-β-CD nas razões molares 1:1 e 2:1 foi capaz de prolongar a duração do bloqueio nervoso ciático da lidocaína com vasoconstritor, possivelmente devido ao sistema de liberação lenta alterar a disponibilidade da hialuronidase.

A duração do bloqueio funcional da lidocaína com vasoconstritor associada ao complexo de inclusão HIA:HP-β-CD 1:1 foi maior do que quando associada ao complexo a 2:1.

O complexo de inclusão HIA:HP-β-CD associado à lidocaína sem vasoconstritor apresenta vantagem com relação à lidocaína com vasoconstritor (LDC vc) e principalmente em relação à lidocaína isolada (LDC).

Os grupos que utilizaram lidocaína com vasoconstritor associada ao complexo de inclusão HIA:HP-β-CD, 1:1 e 2:1, apresentaram aumento de duração de ação quando comparadas com o grupo que utilizou hialuronidase injetada aos 30 minutos do início da anestesia.

Quanto à citotoxicidade em células fibroblásticas de rato, nestas condições experimentais:

A concentração citotóxica encontrada para a lidocaína foi acima de 0,08% (25 vezes diluída da concentração utilizada clinicamente - 0,8 mg).

O complexo de inclusão HIA: HP-β-CD não se apresentou citotóxico, mas quando associado à lidocaína, manteve a citotoxicidade desta.

Nenhum efeito hemolítico sobre eritrócitos de rato foi observado nas concentrações utilizadas para a hialuronidase, HP-β-CD (2-hidroxipropil-β-ciclodextrina), complexos de inclusão HIA: HP-β-CD 1:1 e 2:1, e lidocaína.

REFERÊNCIAS

Abreu CLC. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de codificação de proteinas totais em células 3T3. [dissertação] Rio de Janeiro : Fundação Oswaldo Cruz; 2008. 104 p.

Adams L. Adjuvants to local anesthesia in ophthalmic surgery. Br J Ophthalmol. 2011; 95: 1345-9.

Albers E, Müller BW. Cyclodextrin derivates in pharmaceutics. Crit Rev Therap Drug Carr Syst. 1995;12(4)311-7.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4ª ed. New York: Garland Publishing; 2004.

Arantes LM, Scarelli C, Marsaioli AJ, de Paula E, Fernandes SA. Proparacaine complexation with beta-cyclodextrin and p-sulfonic acid calix[6]arene, as evaluated by varied (1)H-NMR approaches. Magn Reson Chem. 2009 Sep;47(9):757-63.

Araújo DR, Pinto LMA, Braga AFA, De Paula E. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. Rev Bras Anestesiol. 2003;53(5): 663–71.

Araujo DR, Braga AFA, Moraes CM, Fraceto LF, De Paula E. Complexation of 50% enantiomeric excess (S75-R25) bupivacaine with cyclodextrins and spinal block anesthesia in rats. Rev Bras Anest. 2006;56(5):495-506.

Araujo DR, Cereda CMS, Brunetto GB, Pinto LMA, Santana MHA, De Paula E. Encapsulation of mepivacaine prolongs the analgesia provided by sciatic nerve blockade in mice. Can J Anesth. 2004; 51(6): 566-72.

Araujo DR, Tsuneda SS, Cereda CMS, Carvalho FDGF, Preté PSC, Fernandes SA, Yokaichiya F, Franco MKKD, Mazzaroc I, Fraceto LF, Braga AFA, De Paula E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex. Eur J Pharm Sci. 2008;33:60-71.

Barr J, Kirkpatrick N, Dick A, Leonard L, Hawksworth G, Noble DW. Effects of adrenaline and hyaluronidase on plasma concentrations of lignocaine and bupivacaine after peribulbar anaesthesia. Br J Anaesth. 1995 Dec;75(6):692-7.

Bawa R. Nanoparticle-based therapeutics in humans: a survey. Nanotechnology Law & Business. 2008; 2 (2):135-55.

Beilin Y, Halpern S. Focused review: ropivacaine versus bupivacaine for epidural labor analgesia. Anesth Analg. 2010 Aug;111(2):482-7.

Belém-Gonçalves S, Tsan P, Lancelin JM, Alves TLM, Salim V, Besson F. Interfacial behavior of bovine testis hyaluronidase. Biochem J. 2006;398:569-76.

Bellringer ME, Smith TG, Read R, Gopinath C, Olivier Ph. β-cyclodextrin: 52-week toxicity studies in rat and dog. Food Chem Toxicol. 1995; 33(5):367-76.

Biwer A, Antranikian G, Heinzle E. Enzymatic production of cyclodextrins. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;59:609-17.

Borgbjerg F. Local anaesthetic preparation. PCT DK94/00307; 1994.

Borghi B, Aurini L, White PF, Mordenti A, Lolli F, Borghi R, Martignani M, Greggi T. Long-lasting beneficial effects of periradicular injection of meloxicam for treating chronic low back pain and sciatica. Minerva Anestesiol. 2013 Apr;79(4):370-8.

Borsatti MA, Santos MF, Segura MEC, Murakami VO, Gomes ADM, Lamers ML, Carvalho C, Kawakita CF, Millán RDS. Composições farmacêuticas á base de anestésicos locais e hialuronidade associada e/ou incluída em ciclodextrinas e seus usos. P.I. 1105045-4 A2. RPI. 2011; 2231:58.

Borsatti MA, Simonetti MPB, Rocha RG, Penha SS. Hyaluronidase induce long-term analgesia of the EMB S75:S25: a study in sciatic nerve of the rat in vivo [abstract Hatton 10]. Braz Oral Res. 2004;18Suppl:18.

Brewster ME, Estes KS, Bodor N. An intravenous study of 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, a usedul drug solubilizer, in rats and monkeys. Pharm. 1990;59:231-43.

Carnaval TG, Sampaio RM, Lanfredi CB, Borsatti MA, Adde CA. Effects of opioids on local anesthesia in the rat: a codeine and tramadol study. Braz Oral Res. 2013 Nov-Dec;27(6):455-62

Cereda, MP. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberoses amiláceas latino americanas. Capítulo 17, Ciclodextrinas: características e aplicações; p. 475-98. Campinas: Fundação Cargil; 1997.

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

Chen JWY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. Wound Repair Regeneration. 1999; 7:79-89.

Cooper GM , Hausman RE.The cell : a molecular approach. 5.ed. Washington: ASM Press; 2009.

Covino BG, Vassalo HG. Local anesthetics: Mechanisms of action and clinical use. New York: Grune & Stratton; 1976.

Cortes ME. Estudo dos compostos de inclusão tipo hospedeiro convidado entre a clorexidina e a β-ciclodextrina: avaliação in vitro [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1999.

Parirokh M, Yosefi MH, Nakhaee N, Manochehrifar H, Abbott PV, Reza Forghani F. Effect of bupivacaine on postoperative pain for inferior alveolar nerve block anesthesia after single-visit root canal treatment in teeth with irreversible pulpitis. J Endod. 2012 Aug;38(8):1035-9.

Csoka AB, Stern R. Hypotheses on the evolution of hyaluronan: a highly ironic acid. Glycobiology. 2013;4:398-411.

Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. Nature. 2004;5:1023-35.

Day DR, Jabaiah S, Jacobs RS, Little RD. Cyclodextrin formulation of the marine natural product pseudopterosin A uncovers optimal pharmacodynamics in proliferation studies of human umbilical vein endothelial cells. Mar Drugs. 2013;11:3258-71.

De Paula E, Cereda CMS, Tofoli GR, Franz-Montan M, Fraceto LF, Araújo DR. Drug delivery systems for local anesthetics. Recent Pat Drug Delivery Formulation. 2010 Jan; 4(1): 23-34.

Dempsey GA, Barrett PJ, Kirby IJ. Hyaluronidase and peribulbar block. Br J Anaesth. 1997;78(6):671-4.

Dobrovolskaia MA, Clogston JD, Neun BW, Hall JB, Patri AK, McNeil SE. Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. Nano Lett. 2008;8(8):2180-7.

Dunn AL, Heavner JE, Racz G, Day M. Hyaluronidase: a review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. Expert Opin Biol Ther. 2010 Jan;10(1):127-31. doi: 10.1517/14712590903490382.

Farr C, Menzel J, Seeberger J, Schweigle B. Clinical pharmacology and possible applications of hyaluronidase with reference to Hylase “Dessau”. Wien Med Wochenschr. 1997;147(15):347-55.

Franco de Lima RA, de Jesus MB, Saia Cereda CM, Tofoli GR, Cabeça LF, Mazzaro I, Fraceto LF, de Paula E. Improvement of tetracaine antinociceptive effect by inclusion in cyclodextrins. J Drug Target. 2012 Jan;20(1):85-96.

Fréville JC, Dollo G, Le Corre P, Chevanne F, Le Verge R. Controlled systemic absorption and increased anesthetic effect of bupivacaína following epidural administration of bupivacaine hydroxipropyl-beta-cyclodextrin complex. Pharm Res. 1996;13(10):1576-80.

Gerner P, Wang CF, Lee BS, Suzuki S, Degirolami U, Gandhi A, Kanaack DM, Strichartz G. The relationship between functional sciatic nerve block duration and the rate of release of lidocaine from a controlled-release matrix. Anesth Analg. 2010 Jul; 111(1):221-9.

Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. Life Sci. 2007;80:1921-43.

Gould S, Scott R. 2-Hydroxypropyl – β- cyclodextrin (HP-β- CD): a toxicology review. Food Chem Toxicol. 2005;43(10):1451-9.

Godarzi M, Beyranvand S, Arbabi S, Sharoughi M, Mohtaram R, Soltani AE. Comparing the effect of using atracourium and cis-atracourium as adjuvant agents to the local anesthetic substance on peribulbar-induced akinesia. Acta Med Iran. 2011;49(8):509-12.

Groban L, Dolinski SY. Differences in cardiac toxicity among ropivacaine, levobupivacaine, bupivacaine, and lidocaine. Tech Reg Anest Pain Manag. 2001;5(1): 48-55.

Hamada S, Devys JM, Xuan TH, Ganem S, Sahel JA, Héran F. Role of hyaluronidase in diplopia after peribulbar anesthesia for cataract surgery. Ophthalmology. 2005;112:879-82.

Heldin P. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. Braz J of Med Biol Res. 2003;36:967-73.

Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochem Biophys Acta. 1975;415:29-79.

Hirayama F, Uekama K, Kamda M, Udo K, Yano H, Arima H. β-ciclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. J Control Release. 2002;82:407-16.

Hofinger ES, Spickenreither M, Oschmann J, Bernhardt G, Rudolph R, Buschauer A. Recombinant human hyaluronidase Hyal-1: insect cells versus Escherichia coli as expression system and identification of low molecular weight inhibitors. Glycobiology. 2007;17(4):444-53.

Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. Nanomedicine: Nanotechnol Biol Med. 2005;(1):22-30.

Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2000;183:201-7.

INVITTOX n° 37 Red blood cell (RBC) test system. 1992 http://ecvamdbalm.jrc.ec.europa.eu/ 13p – última atualização em dezembro/ 2010.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins III: toxicological issues and safety evaluation. J Pharm Sci. 1997;86(2):147-62.

Islam MN, Chakroborty S, Bandopadhay R, Mondal A. Sodium bicarbonate versus sodium hyaluronidase in ocular regional anaesthesia-a comparative study. J Indian Med Assoc. 2012 Jan;110(1):29-30, 39.

Jaichandran V, Vijaya L, George RJ, InderMohan B. Peribulbar anesthesia for cataract surgery: effect of lidocaine warming and alkalinization on injection pain, motor and sensory nerve blockade. Indian J Ophthalmol. 2010 Mar-Apr;58(2):105-8

Kallio H, Paloheimo M, Maunuksela EL. Hyaluronidase as an adjuvant in bupivacaine-lidocaine mixture for retrobulbar/peribulbar block. Anesth Analg. 2000; 91:934–7.

Kim JE, Cho HJ, Kim DD. Budesonide/cyclodextrin complex-loaded lyophilized microparticles for intranasal application. Drug Dev Ind Pharm. 2013 Apr 3. [Epub ahead of print]

Khorlin AY, Vikha IV, Milishnikov AN. Subunit structure of testicular hyaluronidase. FEBS Lett. 1973;31:107-10.

Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. Intern J Pharm. 2013;453:167– 80.

Langer R. New methods of drugs delivery. Science 1990; 249:1527-33.

Lee A, Grummer SE, Kriegel D, Marmur E. Hyaluronidase. Dermatol Surg. 2010;36:1071-7.

Leeson S, Strichartz G. Kinetics of uptake and washout of lidocaine in rat sciatic nerve in vitro. Anesth Analg. 2013;116(3):694-702.

Levinson SS. Rapid Immunochemical identification of Enterococci with use of a centrifugal analyzer after a brief antigen-extraction step. Biophys Chem. 1981;27(2):293-6.

Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. J Pharm Sci. 1996 Oct; 85(10):1017-25.

Loftsson T, Masson MM. Cyclodextrins in topical drug formulations: Theory and practice. Int J Pharmaceutics. 2001;225:15-30.

Malheiros SVP, Pinto LMA, Gottardo L, Yokaichiya DK, Fraceto LF, Meirelles NC, de Paula E. A new look at the hemolytic effect of local anesthetic, considering their real membrane/water partitioning at pH 7.4. Biophysical Chem. 2004;110:213-21.

Mantovani C, Bryant AE, Nicholson G. Efficacy of varying concentrations of hyaluronidase in peribulbar anaesthesia. Br J Anaesth. 2001;86:876-8.

Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. Cancer Lett. 1998 Sep 11;131(1):3-11.

Meyer K. Hyaluronidases. In: Boyer PD, editor. The Enzymes. 3rd ed. New York: Academic Press; 1971. vol. 5, p. 307-320.

Mindel JS. Value of hyaluronidase in ocular surgical akinesia. Am J Ophthalmol. 1978;85(5):643-6.

Misal R, Waghmarel A, Aqueeh S, Hattiambirel K. Matrix tablet: a promising technique for controlled drug delivery. Indo American Journal of Pharm Research 2013;3(4):3791:805.

Moore PA, Hersh EV, Papas AS, Goodson JM, Yagiela JA, Rutherford B, Rogy S, Navalta L. Pharmacokinetics of lidocaine with epinephrine following local anesthesia reversal with phentolamine mesylate. Anesth Prog. 2008; 55(2):40-8.

Moraes CM, Lima R, Rosa AH, De Paula E, Fraceto LF. Encapsulation of local anesthetic bupivacaine in biodegradable poly(dl-lactide-co-glycolide) nanospheres: factorial design, characterization and cytotoxicity studies. Macromol. Symp. 2009;281:106-12.

Mosher GL, Thompson DO. Complexation and cyclodextrins. In: Swarbrick J, Boylan JC (editors.). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 531-58.

Muckenschnabel I, Bernhardt G, Spruss T, Dietl B, Buschauer A. Quantitation of hyaluronidase by Morgan-Elson reaction: comparison of the enzyme activities in the plasma of tumor patients and healthy volunteers. Cancer lett. 1998;131:13-20.

Munro IC, Newberne PM, Young VR, Bärd A. Safety assessment of γ-cyclodextrin. Reg Toxicol Pharm. 2004;39:S3-13.

Murakami VO. Desenvolvimento e caracterização físico-química de um sistema de liberação controlada da hialuronidase incluída em hidroxipropil-β-ciclodextrina [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.

Nakamura T, Popitz-Bergez F, Birknes J, Strichartz GR. The critical role of concentration for lidocaine block of peripheral nerve in vivo. Anesthesiology. 2003;99:1189-97.

NDA number:50-163. Mitomycin C with cyclodextrin. Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nd/2002/50-763_mitozytrex_pharm.pdf

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Veterin Med. 2008;53(8):397-411.

Nicoll JM, Treuren B, Acharya PA, Ahlen K, James M. Retrobulbar anaesthesia: the role of hyaluronidase. Anaesth Analg. 1986;(12):1324-8.

Ogle OE, Mahjoubi G. Local anesthesia: agents, techniques, and complications. Dent Clin N Am. 2012;56:133-48.

Nimbalkar D, Birudaraj R, Jonest PR, Smith TJ. Activation of diacetyldapsone and a preliminary evaluation or a cyclodextrin- diacetyldapsone complex in cultured lung cells. Biotechnol Appl Biochem. 2001;33:123-5.

Noble PW, Liang J, Jiang D. Hialuronan as an immune regulator in human diseases. Physiol Rev. 2011;91(1):221-64.

Okamoto Y, Ohkoshi K, Itagaki H, Ttsuda T, Kakishima H, Ogawa T, Kasai Y, Ohuchi J, Kojima H, Kurishita A, Kaneko T, Matsushima Y, Iwabuchi Y, Ohno Y. Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) evaluation of the haemolysis test. Toxicol in vitro. 1999;13:115-24.

Olsson C, Westman G. Direct Dissolution of Cellulose: Background, Means and Applications, Cellulose - Fundamental Aspects. Dr. Theo G.M Van De Ven. 2013 ISBN: 978-953-51-1183-2. InTech, DOI: 10.5772/52144. Available from: http://www.intechopen.com/books/cellulose-fundamental-aspects/direct-dissolution-of-cellulose-background-means-and-applications

Paavola A, Yliruusi J, Kajimoto Y, Kalso E, Wahlström T, Rosenberd P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. Pharmac Res. 1995; 12(12):1997-2002.

Pacella E, Collini S, Pacella F, Piraino DC, Santamaria V, De Blasi RA. Levobupivacaine vs. racemic bupivacaine in peribulbar anaesthesia: a randomized double blind study in ophthalmic surgery. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2010 Jun;14(6):539-44.

Pacella E, Pacella F, Troisi F, Dell'edera D, Tuchetti P, Lenzi T, Collini S. Efficacy and safety of 0.5% levobupivacaine versus 0.5% bupivacaine for peribulbar anesthesia. Clin Ophthalmol. 2013;7:927-32.

Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhang J, Blanck TJJ, Xu F. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. Anesth & Analg. 2009;108(3):997-1007.

Pérusse R, Goulet JP, Turcotte JY. Contraindications to vasoconstrictors in dentistry: Part II. Hyperthyroidism, diabetes, sulfite sensitivity, cortico-dependent asthma, and pheochromocytoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992 Nov; 74(5):687-91.

Pitha J, Gerloczy A, Olivi A. Parenteral hydroxypropyl cyclodextrins: intravenous and intracerebral administration of lipophiles. Pharm Sci. 1994 Jun;83(6):833-7.

Popitz-Bergez FA, Leeson S, Strichartz GR, Thalhammer JG. Relation between functional deficit and intraneural local anesthetic during peripheral nerve block. A study in the rat sciatic nerve. Anesth. 1995;83(3):583-92.

Rajewski RA, Stella VJ. Pharmaceutical Application of cyclodextrins. In vivo drug delivery. J Pharm Sciences 1996; 85(11):1142-69.

Randall LO, Sellito JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1957:111:409-19

Ranjbar AAS, Rajabi O, Salari R, Ashraf H. Lidocaine cyclodextrin complex ophthalmic drop, a new topical anesthetic choice. Iran Red Crescent Med J. 2012; 14(9):569-573.

Rasheed A, Kumar ACK, Sravanthi VVNSS. Cyclodentrins as drug carrier molecule: a review. Sci Pharm. 2008;76:567-98.

Remy M, Pinter F, Nentwich M, Kampik A, Schönfeld CL. Efficacy and safety of Hyaluronidase 75 IU as an adjuvant to mepivacaine for retrobulbar anesthesia in cataract surgery. J Cataract Refract Surg 2008;34:1966–9.

Ridenour S, Reader A, Beck M, Weaver J. Anesthetic efficacy of a combination of hialuronidase and lidocaine with epinephrine in alveolar nerve blocks. Anesth Prog. 2001;48(9):9-15.

Roserberg PH, Veering BTh, Urmey W. Maximum recommended doses of local anesthetics: a multifactorial concept. Reg Anesth Pain Med. 2004;29(6):564-75.

Saarinen-Savolainen P, Järvinem T, Araki-Sasaki K, Watanabe H, Urtti A. Evaluation of citotoxicity of various ophthalmic drugs, eye drop excipients and cyclodextrins in na immortalized human corneal epithelial cell line. Pharmaceutical Res. 1998;15(8):1275-80.

Salmen S. Inhibitors of bacterial and mammalian hyaluronidase: synthesis and structure-activity relationships. [internet] Regensburg: University of Regensburg; 2003. Doctoral Thesis. [cited 2013 20 nov]. 338p. Available from: http://epub.uni-regensburg.de/10693/1/Spickenreither_diss.pdf.

Saltão R, Veiga F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. Rev Bras Cien Farm. 2001;37(1):1-17.

Sampaio RM, Carnaval TG, Lanfredi CB, Horliana AC, Rocha RG, Tortamano IP. Comparison of the anesthetic efficacy between bupivacaine and lidocaine in patients with irreversible pulpitis of mandibular molar. J Endod. 2012 May;38(5):594-7.

Sarvela J, Nikki P. Hyaluronidase improves regional ophthalmic anaesthesia with etidocaine. Can J Anaesth. 1992;39(9):920-4.

Satish SV, Shetty KP, Kilaru K, Bhargavi P, Reddy ES, Bellutgi A. Comparative evaluation of the efficacy of 2% lidocaine containing 1:200,000 epinephrine with and without hialuronidase (75 IU) in patients with irreversible pulpitis. J Endod. 2013; 39:1116-8.

Seeman P. Erythrocyte membrane stabilization by steroids and alcohols; a possible model for anesthesia. Biochem Pharmacol. 1966 Oct;15(10):1632-7.

Shipton EA. New formulations of local anaesthetics-part I. Anesthesiol Res Pract. 2012;2012:546409.doi:10.1155/2012/546409. Epud 2011 Dec. 5.

Siiskonen H, Kärnä R, Hyttinen JM, Tammi RH, Tammi MI,Rilla K. Hyaluronan synthase 1 (HAS1) produces a cytokine-and-glucose-inducible, CD44-dependent cell surface coat. Experimental Cell Research. 2013. Dec 14. [Epud ahead of print].

Simonetti MP. Comparative study between 0.125% racemic bupivacaine (S50-R50) and 0.125% and 0.25% of 50% enantiomeric excess bupivacaine in epidural block for labor analgesia. Rev Bras Anestesiol. 2008 Sep-Oct;58(5):55.

Soares da Silva LF, do Carmo FA, de Almeida Borges VR, Monteiro LM, Rodrigues CR, Cabral LM, de Sousa VP. Preparation and evaluation of lidocaine hydrochloride in cyclodextrin inclusion complexes for development of stable gel in association with chlorhexidine gluconate for urogenital use. Int J Nanomedicine. 2011;6:1143-54.

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. Toxicol Pathol. 2008;36:30-42.

Sudoh Y, Cahoon EE, De Girolami U, Wang GK. Local anesthetic properties of a novel derivative, N-methyl doxepin, versus doxepin and bupivacaine. Anesth Analg. 2004 Mar;98(3):672-6.

Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. Chem Rev. 1998;98(5):1743-53.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. The J Biol Chem. 2002 Feb;15(7):4582-4.

Taupitz T, Dressman JB, Buchanan CM, Klein S. Cyclodextrin-water soluble polymer ternary complexes enhance the solubility and dissolution behaviour of poorly soluble drugs. Case example: Itraconazole. Eur J Pharm Biopharm. 2013;83:378–8.

Tempestini-Horliana ACR, Brito MAD, Perez FEG, Simonetti MPB, Rocha RG, Borsatti MA. Hyaluronidase increases the duration of mepivacaine in inferior alveolar nerve blocks. J Oral Maxillofacial Surg. 2008;66:286-90.

Thalhammer JG, Valdimirova M, Bershadsky B, Strichartz GR. Neurologic evaluation of the rat sciatic nerve during block with lidocaine. Anesthesiology. 1995;82(4):1013-25.

Thomson I. Addition of hyaluronidase to lignocaine with adrenaline for retrobulbar anaesthesia in the surgery of senile cataract. Br J Ophthalmol. 1988;72:700-702.

Truant AP. Studies on the pharmacology of meprylcaine (oracaine), a local anesthetic. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1958;115(4):483-97.

Varca GHC, Andréo-Filho N, Fraceto LF, Kaneko TM, Ferraz HG, Esteves N, Issa MG, Mathor MB, Lopes PS. Thermal characterization and cytotoxicity of complexes formed by papain and cyclodextrin. J Biol Phys. 2007;33:463-75.

Volobuef C, Moraes CM, Nunes LS, Cereda CMS, Yokaichiya F, Franco MKKD, Braga A, De Paula E, Tófoli GR, Fraceto LF, Araújo D. Sufentanil-2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion complex for pain treatment: physicochemical, cytotoxicity, na pharmacological evaluation. J Pharm Sci. 2012;101:3698-707.

Wang CF, Pancaro C, Gerner P, Strichartz G. Prolonged suppression of postincisional pain by a slow-release formulation of lidocaine. Anesth. 2011;114(1):135-49.

Watson D. Hyaluronidase. Br J Anaesth 1993;71(3):422-5.

Watts TJ, Handy RD. The haemolytic effect of verapamil on erythricytes exposed to varying osmolatiry. Toxicol in Vitro. 2007;21(5):835-9.

Weinberg G. Local anesthetic toxicity: different mechanisms for different end points. Anesth Analg. 2002 Feb;94(2):479-80.

Wohlrab J, Finke R, Franke WG, Wohlrab A. clinical trial for safety evaluation of hyaluronidase as diffusion enhancing adjuvant for infiltration analgesia of skin with lidocaine. Dermatol Surg. 2012;38:91–6.

Yang S, Abrahams MS, Hum PD, Grafe MR, Kirsch JR. Local anesthetic Schwann cell toxicity is time and concentration dependent. Reg Anesth Pain Med. 2011; 36(5):444-51.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7853

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **026/2013** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Maria Aparecida Borsatti** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Análise funcional do bloqueio ciático em ratos com lidocaína associada à hialuronidase em complexação com hidroxipropil-beta-ciclodextrina e citotoxiddade**" do qual participam o(s) pesquisador(es) Rodney Garcia Rocha, Marinilce Fagundes dos Santos, Carolina de Carvalho e Gaoriella Malheiros Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19/11/2013**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 19 de novembro de 2013.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente do CEUA-FOUSP