

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE AINES EM TECIDO PULPAR DE RATOS

Anti-inflammatory evaluation of AINEs in rat's pulps

Cristiano **CASTILHO**¹, Lucélio Bernardes **COUTO**², Aline Evangelista **SOUZA-GABRIEL**³, Danyel Elias da Cruz **PEREZ**⁴, Fábio Daumas **NUNES**⁵, Antônio Miranda da **CRUZ-FILHO**⁶

¹ Pós-graduado pela Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

² Professor de Farmacologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

³ Professora de Dentística, Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto Ribeirão Preto, SP, Brasil

⁴ Professor de Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

⁵ Professor de Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

⁶ Professor de Endodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Correspondências para: Prof. Dr. Antonio Miranda da Cruz Filho - Universidade de Ribeirão Preto
Av. Costabile Romano, 2201- Riberania, CEP 14096-900 - Ribeirão Preto, SP, Brazil,
E-mail: acruz@unaerp.br
Fone: 55 16 3603-6780 Fax: 55 16 3603-6783

RELEVÂNCIA CLÍNICA

O controle da dor em pacientes portadores de inflamação pulpar representa um dos grandes objetivos da endodontia moderna. Assim, a utilização de antiinflamatórios não-esteroidais pode representar uma alternativa de tratamento em dentes que não haja grande comprometimento deste tecido. O estudo da atividade deste medicamentos torna-se de grande valia nestes casos de inflamação pulpar.

RESUMO

O presente estudo avaliou a atividade antiinflamatória de antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) em tecido pulpar de ratos, por meio de microscopia óptica. Preparos cavitários foram realizados nos incisivos superiores de 40 ratos para a indução de processo inflamatório pulpar. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos segundo a medicação administrada: G1 - celecoxib; G2 - rofecoxib; G3 - diclofenaco de sódio; G4 - ibuprofeno e G5 - solução fisiológica (controle). A terapia com AINEs foi iniciada após 24 horas da realização da exposição pulpar. Nos períodos de 1, 3, 5 e 7 dias após o início da terapia medicamentosa, 2 animais de cada grupo foram sacrificados e tiveram seus dentes extraídos para a análise histológica do tecido pulpar. Os índices utilizados para avaliação qualitativa variaram de 1 (tecido quase regenerado) até 6 (inflamação severa). Os dados foram analisados por meio de Análise de Variância e teste de Tukey. Verificou-se que todos os medicamentos testados foram capazes de reduzir a inflamação quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com celecoxib apresentou os melhores resultados na redução do quadro inflamatório ($p < 0,01$), seguido pelo rofecoxib e ibuprofeno, que se comportaram de maneira estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,01$) e superiores ao diclofenaco de sódio ($p < 0,01$).

Palavras Chave: Polpa dental; Inflamação, AINEs.

Abstract

This study evaluated the anti-inflammatory effect of non-steroids anti-inflammatory (AINEs) in rat's pulps, behind optic microscopy. Cavities were done in maxillary incisors of 40 rats to induce pulp inflammatory. The animals were divided in 5 groups according to medication: G1 - celecoxib; G2 - rofecoxib; G3 - diclofenaco de sódio; G4 - ibuprofeno and G5 - saline (control). The therapy was initialized 24 hours after the pulp exposition. In the periods of 1, 3, 5 and 7 days after the therapy, 2 animals of each group were sacrificed and had their teeth extracted to histological analysis of pulp tissue. The scores were 1 (healed tissue) to 6 (severe inflammation). The data were evaluated by Variance analysis and Tukey's test. It was verified that all medicaments were capable to reduce inflammation compared to control group. The celecoxib group presented the best results in reduction of inflammation ($p < 0,01$), followed by rofecoxib and ibuprofeno, which were statistically equal ($p > 0,01$) and better than diclofenaco de sódio ($p < 0,01$).

Keywords: Dental pulp, inflammation, AINEs.

INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta complexa desencadeada em tecidos vascularizados devido a agressões provocadas por agentes lesivos^{1,2}. Esta resposta leva ao acúmulo de fluidos e células nos tecidos extravasculares, promovendo a regeneração tecidual^{3,4}.

Diversos estímulos, inespecíficos, podem estar envolvidos na ocorrência de lesões teciduais responsáveis pela resposta inflamatória. Na polpa dental, agentes biológicos⁵ ou químicos⁶ podem desencadear processos inflamatórios graves, com comprometimento do tecido pulpar. O processo inflamatório tem a participação de componentes celulares envolvidos na destruição de agentes patológicos⁷, razão pela qual, observa-se um maior aporte sanguíneo ocasionado pela vasodilatação decorrente da liberação local de mediadores inflamatórios^{8,9}. Dentre os mediadores da resposta inflamatória, destacam-se o óxido nítrico¹⁰, a bradicinina¹¹ e as prostaglandinas¹², sintetizadas por ação de enzimas de clivagem denominadas ciclooxigenases¹³ (COX).

Existem dois tipos de COX que se diferenciam por sua atuação e distribuição nos tecidos¹⁴⁻¹⁷. A COX-1 (constitutiva) é uma enzima constitucional encontrada em muitos tecidos. A COX-2 (indutiva) normalmente não se encontra presente nos tecidos, aparecendo nos processos inflamatórios em desenvolvimento¹⁸⁻²⁰.

A maioria dos fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) é inibidor de ambas as COXs, variando quanto ao grau de inibição de cada uma delas. A ação antiinflamatória destes fármacos está claramente relacionada com a COX-2 e os efeitos indesejáveis, como alterações gastrointestinais e hematológicas, estão associados em grande parte à inibição da COX-1^{21,22}.

Os AINEs tornaram-se referência no controle da dor aguda e inflamação da polpa dental²³⁻²⁴, onde atuam como terapêutica complementar com o objetivo de minimizar ou sanar por completo os sinais e sintomas da reação inflamatória. Assim, torna-se importante o estudo de fármacos comumente utilizados nos consultórios odontológicos sobre a eficácia no tecido pulpar, por meio de estudos experimentais. O presente trabalho propõe-se a avaliar, por meio de microscopia óptica, a atividade antiinflamatória dos AINEs ibuprofeno, diclofenaco de sódio, rofecoxib e celecoxib, em modelo experimental de pulpíte em ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério da Universidade de Ribeirão Preto, SP (UNAERP), pesando entre 250 e 350 gramas, distribuídos em 5 grupos de acordo com cada fármaco testado: Grupo 1 - Celecoxib (Pfizer, São Paulo, SP, Brasil) (80mg/kg); Grupo 2 - Rofecoxib (Merck & Co, Whitehouse Station, NJ, EUA) (20mg/kg); Grupo 3 - Diclofenaco de sódio (Novartis Pharmaceuticals Corp., East Hanover, NJ, EUA) (50mg/kg); Grupo 4 - (Ibuprofeno Wyeth Pharmaceuticals, Richmond, VA, EUA) (100mg/kg) e Grupo 5 - solução fisiológica (controle). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos, um para cada período a ser analisado: 1, 3, 5 e 7 dias. A indução de pulpíte experimental nos ratos foi obtida pela exposição do tecido pulpar por meio de cavidades realizadas da face distal (região cervical) dos incisivos superiores com ponta

esférica número ½ em baixa rotação sem refrigeração (Beltec, modelo lb-100, Araraquara – SP – Brasil). Para a realização deste procedimento, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/Kg). Vinte e quatro horas após a exposição pulpar iniciou-se a terapêutica medicamentosa, não sendo empregada nenhuma terapia complementar. Solução aquosa preparada a partir de cada medicamento, na dose pré-estabelecida, foi administrada via oral por meio da técnica de gavagem. A dose do

medicamento e a posologia podem ser observadas na Tabela 1. Transcorridos os tempos estabelecidos para a análise, dois animais de cada grupo foram sacrificados e tiveram seus incisivos extraídos. Os dentes foram imediatamente colocados em solução de formol a 10%, em frascos individuais e identificados, por 24 horas para fixação do tecido pulpar, e submetidos a processamento histológico com coloração por hematoxilina-eosina (HE).

Tabela 1 – Volume e posologia dos medicamentos administrados em cada grupo

Medicamentos	Volume	Posologia
G1 – Rofecoxib	20 mg/Kg	1 vez ao dia
G2 – Celecoxib	80 mg/Kg	1 vez ao dia
G3 – Ibuprofeno	100 mg/Kg	3 vezes ao dia
G4 – Diclofenaco de Sódio	50 mg/Kg	3 vezes ao dia
G5 – Solução Salina	1 ml/Kg	3 vezes ao dia

A análise do grau de inflamação pulpar baseou-se no índice de inflamação pulpar (IIP): 1= Tecido quase regenerado, 2= Inflamação branda, 3= Inflamação de branda a moderada, 4= Inflamação moderada, 5= Inflamação de moderada a severa e 6= Inflamação severa. Além disso, procurou-se identificar a predominância de células inflamatórias, edema, congestão vascular, necrose e áreas de fibrose.

A análise dos resultados foi realizada de maneira “duplo-cega”, ou seja, tanto o avaliador das lâminas, quanto o pesquisador que realizou a estatística desconheciam o grupo de medicamento que estava sendo analisado. A área definida para a análise foi a mais próxima da exposição pulpar. Para cada dente, foram analisados 5 cortes para se estabelecer um diagnóstico correspondente a um índice de inflamação pulpar. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio de Análise de Variância e teste de Tukey ($p < 0,01$).

RESULTADOS

A análise estatística demonstrou que todos

os AINEs diminuíram a reação inflamatória da polpa quando comparados ao grupo controle tratado apenas com solução salina ($p < 0,01$). O teste de Tukey referente aos dias estudados mostrou haver diferença estatística entre os períodos ($p < 0,01$), evidenciando melhora constante dos níveis de inflamação no decorrer dos tempos analisados.

Dentre os AINEs avaliados neste estudo, o celecoxib teve a atividade antiinflamatória mais efetiva no 1° e 3° dias (inflamação leve a moderada) e diferiu estatisticamente dos outros fármacos ($p < 0,01$). Nestes intervalos, o grupo de celecoxib apresentou menos áreas de congestão vascular e edema que os demais grupos.

Em contraste, o grupo tratado com diclofenaco de sódio apresentou extensas áreas de congestão vascular, edema e várias células inflamatórias crônicas como linfócitos e macrófagos (Figura 1). O grupo controle evidenciou os maiores índices de inflamação sendo estatisticamente diferente dos demais grupos ($p < 0,01$).

O ibuprofeno e rofecoxib reduziram o quadro inflamatório de modo semelhante entre si, ocupando uma posição intermediária entre os grupos do celecoxib e diclofenaco.

No 5° dia, os grupos tratados com celecoxib, rofecoxib, diclofenaco de sódio e ibuprofeno demonstraram poucas áreas de congestão vascular, edema mínimo e dispersas células inflamatórias crônicas (principalmente linfócitos), sendo classificado como inflamação moderada (Figura 2). Após 7 dias de

tratamento com AINEs, o grupo de celecoxib apresentou tecido pulpar quase regenerado, com áreas extensas de fibrose e células inflamatórias escassas. Esses mesmos achados foram obtidos com o ibuprofeno e rofecoxib no mesmo período.

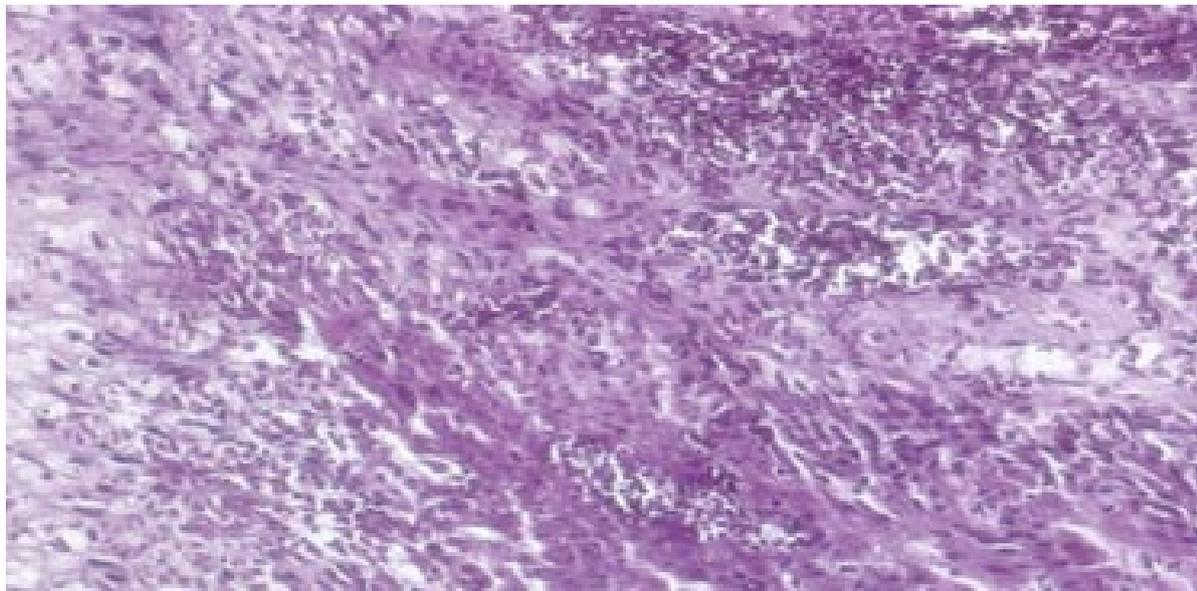


Figura 1 - Um dia após a administração do diclofenaco de sódio. Tecido pulpar com intensa reação inflamatória, extensa congestão vascular e edema (coloração hematoxilina-eosina), aumento de 100 vezes.

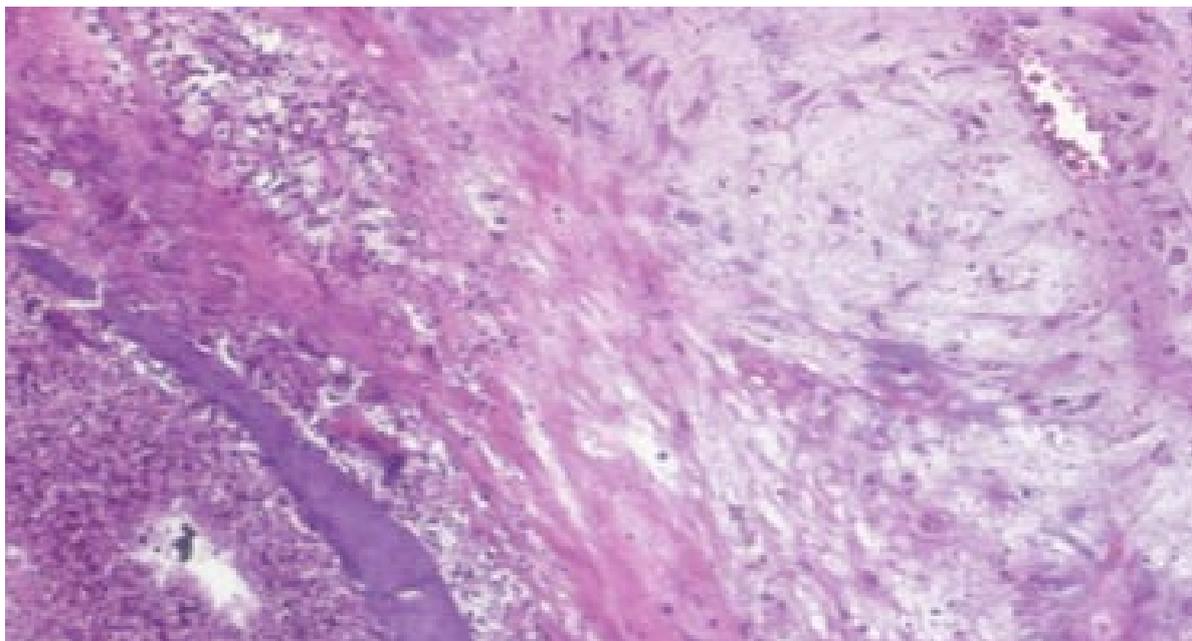


Figura 2 - Cinco dias após a administração do celecoxib - Tecido pulpar com reação inflamatória moderada e poucos vasos sanguíneos congestionados (coloração hematoxilina-eosina), aumento de 100 vezes.

DISCUSSÃO

A forma mais comum de dor orofacial é a odontalgia, afetando aproximadamente 15% da população²³. Embora esta seja uma condição clínica importante, o antiinflamatório mais efetivo para esta condição ainda é motivo de debate. A literatura, escassa de estudos avaliam, por meio de exame histológico, a atividade antiinflamatória de fármacos em dentes com inflamação pulpar. Dessa forma, um modelo experimental baseado em pulpite artificialmente induzida foi projetado para este estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que todos os fármacos analisados foram capazes de reduzir o processo inflamatório quando comparados ao grupo controle (tratado apenas com solução salina). O celecoxib propiciou o melhor efeito antiinflamatório, ao passo que o grupo do diclofenaco de sódio diminuiu a reação de maneira menos intensa. Os fármacos ibuprofeno e rofecoxib ocuparam uma posição intermediária e apresentaram comportamento semelhante. Clinicamente, este achado pode ser importante, pois desde os primeiros dias depois da exposição da polpa, o celecoxib diminuiu a reação inflamatória, sugerindo que este seria o fármaco de primeira escolha para o tratamento da pulpite sintomática.

Os antiinflamatórios seletivos da COX-2 avaliados neste experimento apresentaram bons resultados no controle da inflamação pulpar, o que se soma ao fato de pertencerem ao grupo que proporciona menor índice de reações colaterais quando comparados aos AINEs tradicionais²⁵⁻²⁸.

A diferença observada na atividade antiinflamatória entre dois fármacos do mesmo subgrupo (rofecoxib e celecoxib) pode estar relacionada às suas características farmacocinéticas. Estudos mostram que o rofecoxib é rapidamente absorvido no organismo, sendo evidenciado em tecidos como a pele, fígado e próstata, logo após a administração. A eliminação ocorre em maior quantidade pela urina. Sua meia vida plasmática, em ratos, é de 3,3 horas^{20,29}. O celecoxib, ao contrário, distribui-se bem pelo organismo e é encontrado em altas concentrações em diferentes regiões do organismo como sangue, glândula adrenal, ossos, cérebro, olhos, rins, intestino, nódulo linfático e tireóide. Sua excreção ocorre em maior parte pelas fezes, ocorrendo a eliminação total da droga no organismo após 120 horas da administração. Em ratos, a sua meia vida plasmática é de 3,73 horas³⁰.

Os resultados obtidos neste estudo levamos a considerar a necessidade de investigar até que ponto a administração do antiinflamatório pode auxiliar na prevenção de alterações pulpares após procedimentos mais invasivos na clínica odontoló-

gica. Embora em outro modelo de estudo, autores utilizaram a expressão de Fos como índice de sinal nociceptivo para o núcleo de trigeminal espinhal depois de exposição do tecido pulpar de molares, e observaram que o tratamento com morfina por 30 min antes exposição pulpar reduziram expressão de Fos em subnucleos caudais, sugerindo que este fármaco pode diminuir dor pós-operatória. Em contraste, o ibuprofeno não foi capaz de alterar a expressão de Fos.

Conclusões

De acordo com a metodologia proposta e resultados deste estudo foi possível concluir que:

- Os medicamentos testados foram efetivos no controle da inflamação pulpar em ratos, uma vez que, todos apresentaram resultados superiores ao grupo controle tratados apenas com solução salina.
- O celecoxib apresentou melhor desempenho na redução do quadro inflamatório, enquanto rofecoxib e ibuprofeno, embora não diferiram um do outro, demonstraram atividade antiinflamatória melhor que o diclofenaco de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol.* 1996; 118 (4): 829-38.
2. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Itharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. *J Ethnopharmacol.* 2003; 85 (2-3): 207-15.
3. Groneberg DA, Quarcoo D, Frossard N, Fischer A. Neurogenic mechanisms in bronchial inflammatory diseases. *Allergy.* 2004; 59 (11): 1139-52.
4. Stamp LK, Cleland LG, James MJ. Upregulation of synoviocyte COX-2 through interactions with T lymphocytes: role of interleukin 17 and tumor necrosis factor-alpha. *J Rheumatol.* 2004; 31 (7): 1246-54.
5. Paterson RC, Watts A. Pulp response to, and cariogenicity of, a strain of *Streptococcus mutans*. *Int Endod J.* 1989; 22 (1): 1-8.

6. Kamal AM, Okiji T, Suda H. Response of Class II molecule-expressing cells and macrophages to cavity preparation and restoration with 4-META/MMA-TBB resin. *Int Endod J.* 2000; 33 (4): 367-73.
7. Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 1978; 30 (3): 293-331.
8. Lam FY, Wong MC. Characterization of tachykinin receptors mediating plasma extravasation and vasodilatation in normal and acutely inflamed knee joints of the rat. *Br J Pharmacol.* 1996; 118 (8): 2107-14.
9. Fernandez N, Jancar S, Sanchez Crespo M. Blood and endothelium in immune complex-mediated tissue injury. *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25 (10): 512-7.
10. Hsu YY, Jou YT, Wong R, Karabucak B, Simchon S, Kim S. Effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on substance P-induced vasodilatation in the dental pulp. *Int Endod J.* 2003; 36 (12): 840-7.
11. Sunakawa M, Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW. Jaw electromyographic activity induced by the application of alginate chemicals to the rat tooth pulp. *Pain.* 1999; 80 (3): 493-501.
12. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9 (4): 498-521.
13. Tsai CH, Huang FM, Yang LC, Chou MY, Chang YC. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-2 in radicular cysts. *Int Endod J.* 2002; 35 (10): 854-8.
14. Merlie JP, Fagan D, Mudd J, Needleman P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem.* 1988; 15 (8): 3550-3.
15. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem.* 1990; 265 (28): 1637-40.
16. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem.* 1991; 266 (20): 12866-72.
17. Rane MJ, Carrithers SL, Arthur JM, Klein JB, McLeish KR. Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol.* 1997; 159 (10): 5070-8.
18. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol.* 1997; 24 (49): 15-9.
19. Chang YC, Huang FM, Yang SF, Liu CM, Lai CC, Chan Y, Hsieh YS. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human pulp cells stimulated with black-pigmented bacteroides. *J Endod.* 2003; 29 (4): 240-3.
20. Desjardins PJ, Black PM, Daniels SE, Bird SR, Petruschke RA, Chang DJ, Smugar SS, Tershakovec AM. A double-blind randomized controlled trial of rofecoxib and multidose oxycodone/acetaminophen in dental impaction pain. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65 (8): 1624-32.
21. Meade EA, Smith WL, DeWitt DL. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 1993; 256 (9): 6610-4.
22. Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev.* 1996; 16 (2): 181-206.

23. Keiser K. Strategies for managing the endodontic pain patient. *Tex Dent J.* 2003 ; 120 (3) : 250-7.
24. Pajarola G, Riva C, Good M, Gratz KW. Pain management after third molar extraction. Observations of the use of mefenamic acid and rofecoxib in the treatment of postoperative pain in the dental office. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003; 113 (8): 887-96.
25. Moore PA, Elliot VH. Celecoxib and Rofecoxib, the role of cox-2 inhibitors in dental practice. *J Am Dent Assoc.* 2001; 132 (4): 451-6.
26. Mardini IA, Fitzgerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of antiinflammatory drugs. *Mol Interv.* 2001; 1 (1): 30-8.
27. Chang DJ, Desjardins PJ, Chen E, Polis AB, McAvoy M, Mockoviak BS, Geba GP. Comparison of the analgesic efficacy of rofecoxib and enteric-coated diclofenac sodium in the treatment of postoperative dental pain : a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Clin Ther.* 2002; 24 (4): 490-503.
28. Cochrane DJ, Jarvis B, Keating GM. Etoricoxib. *Drugs.* 2002; 62 (18): 2652-3.
29. Halpin RA, Geer LA, Zhang KE, Marks TM, Dean DC, Jones AN, Melillo D, Doss G, Vyas KP. The absorption, distribution, metabolism and excretion of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28 (10): 1244-54.
30. PAULSON SK, ZHANG JY, BREAU AP, HRIBAR JD, LIU NW, JESSEN SM, LAWAL YM, COGBURN JN, GRESK CJ, MARKOS CS, MAZIASZ TJ, SCHOENHARD GL, BURTON EG. PHARMACOKINETICS, TISSUE DISTRIBUTION, METABOLISM, AND EXCRETION OF CELECOXIB IN RATS. *DRUG METAB DISPÓS.* 2000; 28 (5): 514-21.