

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO - USC

Rafael Vicente Ferino

Lyvia Faccim Lui

**INTERFERÊNCIA DE DROGAS ANTIINFLAMATÓRIAS NÃO-
ESTEROIDAIAS ESPECÍFICAS PARA COX-2 E APLICAÇÃO DE
LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO
EM TÍBIAS DE RATOS**

B A U R U

2 0 0 7

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO - USC

Aluno: Rafael Vicente Ferino

Lyvia Faccim Lui

**INTERFERÊNCIA DE DROGAS ANTIINFLAMATÓRIAS
NÃO-ESTEROIDAIAS ESPECÍFICAS PARA COX-2 E
APLICAÇÃO DE LASER DE BAIXA POTÊNCIA NO
PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM TÍBIAS DE
RATOS**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado ao centro de
ciências biológicas e profissões da saúde para obtenção do
grau em odontologia sob a orientação da Professora Doutora
Mariza Akemi Matsumoto.**

B A U R U

2 0 0 7

Resultado: _____

Bauru/USC: __/__/2007

Prof. Dra.: _____

Ass.: _____

Prof. Dr.: _____

Ass.: _____

Súmula Curricular

Nome: Lyvia Faccim Lui

Filiação: Mãe: Dircilene Faccim Lui

Pai: Jefferson José Lui

Formação Acadêmica:

Ensino Fundamental: E. E. P. G. Olavo Bilac

Ensino Médio: Prevê Objetivo

Ensino Superior: Universidade do Sagrado Coração (USC)

Nome: Rafael Vicente Ferino

Filiação: Mãe: Vitória Natalina Balivo Ferino

Pai: Paulo Afonso Ferino

Formação Acadêmica:

Ensino Fundamental: E. P. S. G. do Comercio

Ensino Médio: E. P. S. Graus Prof. Cenequista

Ensino Superior: Universidade do Sagrado Coração (USC)

Dedicamos nosso trabalho de conclusão de curso a Profª Drª Mariza e aos nossos pais pela paciência, cooperação e ajuda que nos deram .

RESUMO

Atualmente, as drogas antiinflamatórias não esteroidais seletivas para cicloxigenase-2 têm sido amplamente utilizadas na prática cirúrgica a fim de se reduzir o edema e a dor. No entanto, a associação entre estas drogas e a laserterapia não são bem conhecidas. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar a ação de drogas seletivas para COX-2 (celecoxibe) no reparo ósseo, associado à laserterapia. Para tanto, 64 ratos foram submetidos a cirurgias para confecção de defeitos ósseos em suas tíbias, e aleatoriamente distribuídos em quatro grupos: Grupo 1) controle negativo; Grupo 2) animais tratados com celecoxibe; Grupo 3) animais tratados com laser de baixa intensidade, e Grupo 4) animais tratados com celecoxibe e laser de baixa intensidade. Os animais foram sacrificados após 48 horas, 7, 14 e 21 dias. As tíbias foram removidas para análises morfológica, morfométrica e imunoistoquímica para COX-2. Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) foram observadas na qualidade do reparo ósseo e na quantidade de osso neoformado entre os grupos aos 14 dias nos Grupos 3 e 4. A imunomarcagem para COX-2 foi mais intensa nas células ósseas nos períodos intermediários avaliados nos animais expostos ao laser. Estes resultados sugerem que a laserterapia de baixa intensidade é capaz de melhorar o reparo ósseo em tíbias de ratos como resultado de uma regulação da expressão de COX-2 nas células ósseas, mesmo quando um antiinflamatório anti-COX-2 é administrado durante o procedimento cirúrgico.

Palavras chave: COX-2 , Laser, Osteoblasto.

ABSTRACT

Nowadays, selective cyclooxygenase-2 non-steroidal anti-inflammatory drugs have been largely used in surgical practice for reducing edema and pain. However, the association between these drugs and laser therapy are not known up to now. Herein, the aim of this study was to evaluate the action of anti-COX-2 selective drug (celecoxib) on bone repair associated with laser therapy. A total of 64 rats underwent surgical bone defects in their tibias, being randomly distributed into four groups: Group 1) negative control; Group 2) animals treated with celecoxib; Group 3) animals treated with low level power laser and Group 4) animals treated with celecoxib and low level power laser. The animals were killed after 48 hours, 7, 14, and 21 days. The tibias were removed for morphological, morphometric, and immunohistochemistry analysis for COX-2. Statistical significant differences ($p < 0.05$) were observed in the quality of bone repair and quantity of formed bone between groups at 14 days after surgery for groups 3 and 4. COX-2 immunoreactivity was more intense in bone cells for intermediate periods evaluated in the laser exposed groups. Taken together, such results suggest that low level laser therapy is able to improve bone repair in the tibia of rats as a result of an up-regulation for cyclooxygenase-2 expression in bone cells, even when anti-COX-2 is administrated during surgical procedure.

Keywords: COX-2 , Laser , Osteoblasto.

Súmario

| | |
|-------------------------------|------|
| Introdução..... | p.08 |
| Desenvolvimento..... | p.14 |
| Resultados..... | p.21 |
| Discussão..... | p.31 |
| Conclusão..... | p.36 |
| Referencia bibliográfica..... | p.37 |

1. Introdução

Os sinais clínicos e os sintomas decorrentes dos quadros inflamatórios agudos são motivos de desconforto, na qual atingem especialmente os indivíduos recém-operados, traumatizados ou portadores de doenças inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes. Para alívio desta condição, os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são largamente empregados. Estes medicamentos atuam modulando o metabolismo do ácido araquidônico, especialmente pela via cicloxigenase (COX), regulando, assim, a produção das prostaglandinas, principais eicosanóides associados aos mecanismos da dor e edema (Wannmacher & Ferreira, 1999).

Apesar da terapêutica estabelecida, são bem conhecidos os efeitos colaterais associados ao uso dos AINEs, tais como desconforto gástrico e sangramento (Wolfe et al. 1999). Estes efeitos se explicam pela existência da enzima cicloxigenase em duas isoformas distintas, denominadas de COX-1 (forma constitutiva) e COX-2 (forma indutível) (Lichtenstein & Wolfe, 2000, Halpin et al. 2000). A primeira encarrega-se da manutenção da homeostasia geral do nosso organismo, na produção fisiológica das prostaglandinas, especialmente relacionadas à integridade da mucosa gástrica (Kargman et al., 1996, Zhang et al. 2002). Já a COX-2 é ativada principalmente por citocinas e fatores de crescimento envolvidos em quadros inflamatórios (Needelman & Isakson, 1997).

O conhecimento acerca dessas duas enzimas possibilitou a formulação de drogas específicas para atuação sobre a COX-2, as denominadas “coxibs”, no intuito de se minimizar, ou até mesmo eliminar, o

efeitos deletérios proporcionados pela produção de prostaglandinas estimuladas pela mesma (Goldstein et al. 2000, Einhorn .2002). Assim, novos medicamentos foram lançados no mercado como o celecoxib, o valdecoxib e o lumiracoxib. Desse modo, a ação seletiva destes medicamentos faz com que sua indicação seja ampla, sendo atualmente indicados para uso crônico, como nas doenças reumáticas, dismenorréia primária, e também em condições pré e pós-operatórias, com utilização em curto prazo.

Entretanto, apesar dos benefícios proporcionados pelos antiinflamatórios inibidores seletivos da enzima COX-2, uma vez comparados àqueles de natureza não seletiva, recentes evidências têm sugerido alguns efeitos indesejáveis similares aos COX-1, estando especificamente relacionados ao processo de reparo ósseo, caracterizado pela drástica diminuição dos níveis de prostaglandinas diretamente envolvidas na formação óssea (Harder & Na, 2003; Kawaguchi et al. , 1995). Tais indícios têm levado vários pesquisadores a confirmarem os efeitos de diversos AINEs, específicos ou não, atualmente disponíveis no mercado.

Altman et al. , em 1995, estudaram a influência de dois AINEs não específicos amplamente utilizados, o ibuprofeno e a indometacina, no reparo de fraturas de fêmur de ratos. Após as fraturas, os antiinflamatórios foram administrados aos animais dos grupos experimentais nas doses de 2,1mg/dia de ibuprofeno e 70mg/dia de indometacina até os períodos de sacrifício determinados em 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas. Histologicamente confirmou-se um atraso no processo de reparo nos grupos dos animais tratados com antiinflamatórios, bem como menor resistência aos teste

mecânicos da região fraturada, especialmente nos períodos de 10 e 12 semanas.

O diclofenaco sódico apresenta-se também como uma droga anti-inflamatória não-esteroidal comumente indicada em condições pós-operatórias, sendo assim, motivo de estudo para Akman e colaboradores, em 2002, os quais observaram o processo de reparo de fraturas de tíbias de ratos medicados com o diclofenaco sódico a 1 e 2mg, comparados a um grupo controle. O sacrifício dos animais se deu após dois, quatro e seis semanas, sendo as áreas de reparo analisadas clínica, radiográfica, e microscopicamente. Após duas semanas, a superioridade do grupo controle, do ponto de vista clínico, foi evidente, muito embora, nos outros dois períodos finais, não foi possível observar quaisquer diferenças entre os grupos a partir dos métodos estabelecidos.

Os “coxibs” também vêm sendo avaliados com a mesma finalidade, como em estudo desenvolvido por Simon et al. (2002). Seus resultados sugeriram um processo de reparo inadequado nas fraturas ósseas promovidas de ratos tratados com dois antiinflamatórios seletivos, o celecoxib e o rofecoxib, confirmados histopatológica, mecânica e radiograficamente. As mesmas deficiências foram evidenciadas nos animais que apresentavam uma mutação no gene COX-2.

Recentemente, Brown et al. (2004) compararam os efeitos do celecoxib aos da indometacina no reparo de fêmures de rato. Cinquenta e sete animais foram divididos em três grupos distintos, sendo que em um deles nenhuma droga foi administrada, em outro, os animais foram medicados com 1mg/kg de indometacina ao dia, e no último grupo, os ra

medicados com 3mg/kg de celecoxib, ambos diariamente, iniciando no primeiro dia pós-operatório. Os períodos de avaliação estabelecidos foram de quatro, oito e doze semanas após a fratura. Foram realizadas análises radiográficas, microscópicas e de resistência. No período de quatro semanas, os animais do grupo da indometacina apresentaram imagem radiográfica e resistência mecânica inferiores aos demais. No entanto, após doze semanas, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

Para melhor esclarecimento dos achados clínicos, a pesquisa básica tem exercido papel relevante. Gerstenfeld et al., em 2003, verificando a expressão de RNAm COX-1 durante o processo de reparo de fraturas de fêmur em ratos, observaram que a mesma permaneceu constante por um período de até 21 dias após o traumatismo. Contudo, a expressão de RNAm COX-2 apresentou-se com picos de elevação durante os primeiros 14 dias do reparo, retornando a níveis basais por volta do 21º dia. Estes achados vieram comprovar a participação da enzima COX-2 no processo de reparo tecidual. No mesmo trabalho, os autores também demonstraram a influência de dois antiinflamatórios distintos, o ketorolac e o parecoxib no reparo de fraturas ósseas, em altas e baixas doses. As deficiências mecânicas e microscópicas mais evidentes foram observadas no grupo tratado com o ketorolac, uma vez comparadas ao grupo do parecoxib.

Ainda neste sentido, Zahng et al. demonstraram o papel da COX-2 na formação óssea endocondral e intramembranosa, comparando ratos COX-1^{-/-}, COX-2^{-/-} quando submetidos a fratura de tíbias. Neste estudo, observou-se a persistência de células mesenquimais indiferenciadas

redução acentuada na osteoblastogênese nas áreas de reparo dos animais COX-2^{-/-}. Subseqüentemente a este trabalho, Chen et al., demonstraram a redução na capacidade mecânica do osso de ratos COX-2^{-/-} após reparação de fratura no fêmur.

Essas evidências despertam preocupações na clínica, particularmente nas áreas de ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial, pela atuação direta no tecido ósseo nos tratamentos de patologias, fraturas e reconstruções, onde se utiliza uma variedade de drogas antiinflamatórias disponíveis no mercado.

Em contrapartida, a difusão do laser de alta e baixa potência na odontologia, tanto para fins cirúrgicos como terapêuticos, tem gerado inúmeros trabalhos. O laser de alta potência permite que o raio seja concentrado o suficiente para cortar, soldar, evaporar ou fundir os tecidos por efeitos puramente térmicos. Já o mecanismo de ação do laser de baixa potência (LLLT) só é possível por meios foto-biológicos, envolvendo efeitos correlatos à biologia celular e molecular (Freitas, 2001). Autores como Yaakobi, Maltz, Oron (1996), Osawa et al. (1998) e Pinheiro et al. (2003), avaliando a ação do LLLT em defeitos ósseos variados, verificaram uma melhora do processo de reparo quando associado à laserterapia, possivelmente devido à ação do laser na estimulação das células mesenquimais indiferenciadas e células osteoblásticas. Objetivos gerais com o desenvolvimento do presente estudo, tem-se como objetivo avaliar a atuação de drogas antiinflamatórias específicas para a enzima COX-2 no processo de reparo ósseo, bem como a influência do laser de baixa potência quando utilizado em associação. Objetivos específicos o prese

estudo propõe investigar o processo de reparo de defeitos ósseos, sob a interferência de drogas antiinflamatórias não-esteroidais específicas para COX-2 e a aplicação de laser de baixa potência. Para isto, realizar-se-ão defeitos ósseos mecanicamente induzidos em ratos. Serão utilizados como parâmetros de análise métodos morfológicos, morfométricos e imunoistoquímicos, conforme relacionados a seguir:

- Padrão histopatológico das lesões coradas em H.E;
- Quantificação do nível de reparação dos defeitos ósseos por meio de morfometria de área;
- Expressão de Cox-2 por imunoistoquímica.

2. Desenvolvimento

2.1 Material e métodos

2.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade e aproximadamente 200g, provenientes do Biotério da Universidade do Sagrado Coração (USC). Os animais foram colocados em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha branca de pinho autoclavada, trocada três vezes por semana. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram no biotério da Universidade do Sagrado Coração – USC - Bauru, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($55 \pm 10\%$), ciclo de luz de 12 horas claro/escuro e exaustão, e recebendo água e ração sem restrição.

2.1.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de 16, com 4 diferentes tempos de sacrifício: a – 48 horas; b – 7 dias, c- 14 dias e d – 21 dias, conforme descrito a seguir:

- Grupo 1 a, b, c, d – controle negativo que recebeu água e ração;
- Grupo 2 a, b, c, d – tratado com LLLT
- Grupo 3 a, b, c, d – tratado com celecoxib (Celebra®) por gavagem;
- Grupo 4 a, b, c, d – tratado com celecoxib (Celebra®) por gavagem e LLLT.

Os animais do Grupo 3 receberam, por meio de gavagem, uma dose de celecoxib na proporção de 1mg/Kg, uma hora antes do procedimento cirúrgico, continuando com a mesma dosagem a cada doze horas por três dias pós operatórios, ou até o período de sacrifício (Figura 1). O mesmo procedimento foi instituído para os animais do Grupo 2, os quais também receberam sete aplicações de 16J/cm² do LLLT laser a cada 48 horas durante 15 dias, ou até o período do sacrifício (Figura 2). Os animais do grupo controle (Grupo 1) receberam gavagem de solução fisiológica salina (0.9%).



Figura 1 - Animal recebendo soro fisiológico a 0,9% por gavagem. Do mesmo modo foi administrado o antiinflamatório

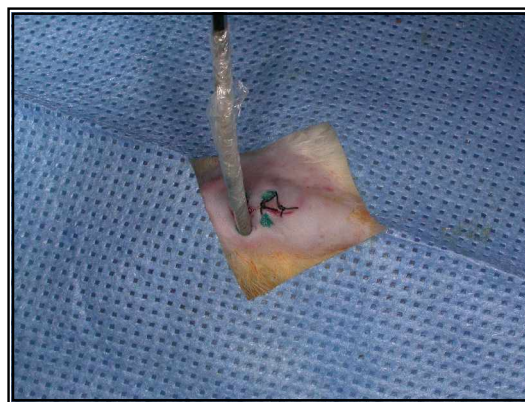


Figura 2 - Aplicação do laser de baixa potência em quatro pontos na área do defeito ósseo

Os pesos corpóreos dos animais foram aferidos semanalmente. Ao final dos períodos experimentais estabelecidos (48 horas, 7, 14 e 21 dias), todos os animais foram sacrificados para as avaliações patológicas. Para tanto, os animais foram anestesiados e sacrificados por meio de deslocamento cervical. As tíbias foram removidas com auxílio de brocas tipo carburundum em baixa rotação, fixadas em formalina (Merck) a 10% por 48 horas e colocadas em solução de EDTA a 4% para desmineralização dos espécimes, até que o mesmo apresentem consistência suficiente para a microtomia. As lâminas com cortes semi-seriados de 6µm de espessura foram coradas com H.E. (hematoxilina e eosina) e Tricrômico de Masson.

2.1.3 Cirurgia

Ao início do delineamento experimental, todos os animais foram submetidos à cirurgia para a indução do defeito ósseo. Foi administrado no animal antiinflamatório uma hora antes do procedimento cirúrgico, continuando a cada doze horas até o período de sacrifício de cada grupo. Assim, procedeu-se a anestesia geral por meio de injeção intramuscular do anestésico Quetamina a 1% (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) associado ao sedativo Cloridrato de Xilazina a 2% (Virbaxyl 2%, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil), na dosagem recomendada pelo fabricante. Após a anestesia, foi realizada tricotomia da superfície anterior dos membros posteriores. As áreas tricotomizadas foram submetidas à anti-sepsia com polivinilpirrolidona a 1% tópico, para que se procedessem as incisões com lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo nº 3, com 1cm de extensão, para deslocamento de retalho e

exposição da tíbia. Com uma broca de aço carbono esférica nº 8 (Maillefer Instrumentos, Ballaigüef, Suíça), montada em motor elétrico de baixa rotação (K9, Kavo, Joinvile, Brasil), foi preparada cavidade mantendo-se o diâmetro da broca, aprofundando-se 5 mm, expondo a medula óssea sob intensa irrigação com soro fisiológico a 0,9%. As brocas tiveram uso único, sendo descartadas após sua utilização. Na seqüência, em ambas as tíbias, os retalhos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos utilizando fio 4-0 de seda (Ethicon, Johnson & Johnson S.A., São José dos Campos, Brasil) (Figura 3).

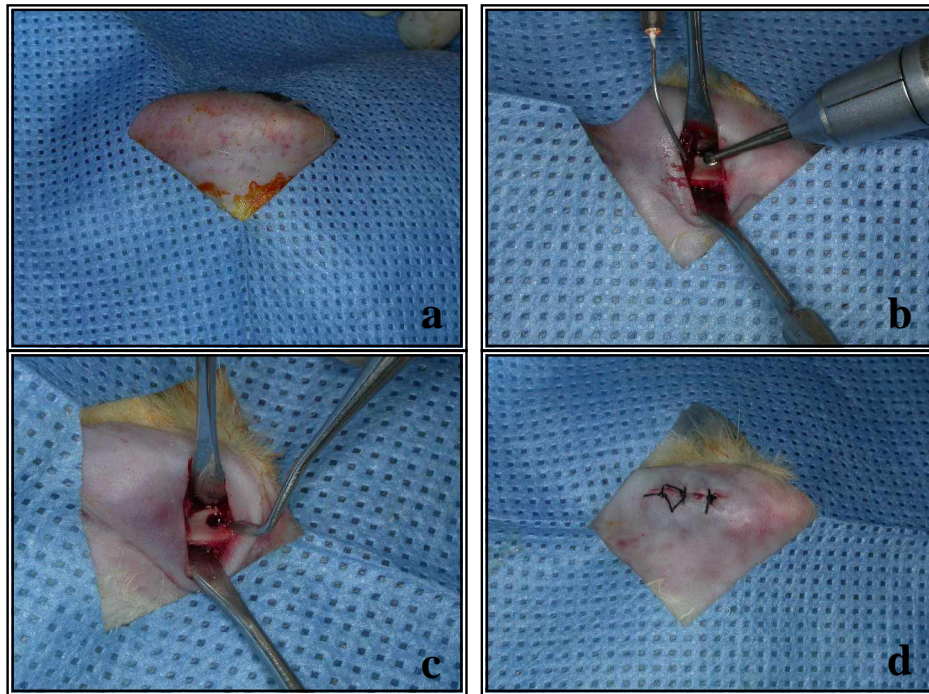


Figura 3 – a) Membro posterior direito após tricotomia e anti-sepsia com solução tópica de PVPI 1%; b) Tíbia exposta para realização da perfuração com broca esférica em baixa rotação; c) Defeito ósseo realizado; d) Sutura a pontos interrompidos

2.1.4 Descrição morfológica das lesões

A descrição morfológica das lesões foi feita em todos os espécimes considerando padrão das estruturas ósseas adjacentes, osso cortical, medular, presença de infiltrado inflamatório e reparo na região dos defeitos ósseos.

2.1.5 Análise morfométrica

Para a análise morfométrica, as regiões de reparo ósseo inseridas nos defeitos, identificadas previamente na análise histopatológica, por animal, foram mensuradas pelo programa *Image Pro-Plus* – versão 5.1 para Windows (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, E.U.A.) em microscópio óptico de luz (Eclipse 80i, Nikon, Japão) do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Sagrado Coração. Para tanto, foram utilizadas as lâminas coradas em Tricrômico de Masson, pela possibilidade de distinção entre o tecido medular e tecido ósseo pela coloração. Três áreas da região cortical do defeito foram selecionadas, sendo denominadas: C1 e C3, correspondentes às regiões adjacentes à parede do defeito ósseo, e C2, correspondente à região central do defeito. O tecido ósseo presente nessas regiões foi medido e sua área registrada em aumento de 20x. Após os registros, as áreas foram somadas, resultando na considerada Área óssea total do defeito. Os números obtidos foram submetidos ao teste estatístico análise de variância a um critério (ANOVA) e para individualização o teste de Tukey utilizando o programa Sigma Stat (Jadel Scientific, Chigaco, E.U.A.), versão 2.0 para Windows.

2.1.6 Análise imunoistoquímica

Para o preparo imunoistoquímico, os blocos cortados em espessuras de 4mm foram desparafinizados em xilol e reidratados em série descendente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante cinco minutos cada. Após lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação antigênica por meio de solução tampão citrato a 0,01M (pH= 6), em três ciclos de cinco minutos cada em forno de microondas (850 W). A cada ciclo foi completada a solução tampão, de modo que as lâminas ficassem sempre cobertas pela solução. Estes procedimentos visaram restabelecer os sítios antigênicos e romper as ligações cruzadas com o formol.

Após os 15 minutos, as lâminas foram deixadas no forno desligado durante 20 minutos. Depois, foram transferidas das cubas para as bandejas;

O material foi posteriormente pré-incubado numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS (solução tampão fosfato) durante cinco minutos para inativação da peroxidase endógena e, após, bloqueada com solução de albumina sérica à 5% em PBS durante dez minutos.

Em seguida, foi pingado PBS, seu excesso removido com bomba a vácuo e pingou-se os anticorpos primários policlonais anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) na concentração de 1:50. As bandejas foram vedadas com fita adesiva e colocadas na geladeira por uma noite à 4°C.

Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS, e, em seguida, tratadas com anticorpos secundários biotinizados tipo IgG (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.). Após os primeiros 30 minutos, foram preparadas as soluções de ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, E.U.A.) - (cálculo para quarenta lâminas): 5mL de PBS, avidina: 200mL e biotina: 200mL. Foi agitado e deixado descansar durante 30 minutos; as lâminas foram lavadas com PBS, e em seguida, pingada a solução de ABC (já preparada) por um período de 45 minutos; quando faltavam 5 minutos para findar o tempo do ABC, foi preparada a DAB (diaminobenzidina) - (cálculo para quarenta lâminas): 0,375g de DAB, 10mL de PBS e 0,2mL de H₂O₂ (30 %). As lâminas foram lavadas com PBS, removido o excesso, pingou-se a DAB deixando agir por 5 minutos; após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente, escorrido o excesso, pingou-se sobre os cortes a Hematoxilina de Harris, contra-corante, durante um minuto. Foram lavados em água corrente novamente, seguidos por banho de água amoniacal, antes da desidratação.

As lâminas foram retiradas da bandeja e colocadas em berços para desidratação (cinco cubas de álcool absoluto e três cubas de xilol) e foram montadas com resina sintética (Permount); a avaliação das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum, em aumento de 400 X, utilizando-se parâmetros qualitativos, ou seja, positividade ou não da marcação e sua respectiva localização, correlacionando-se com o diagnóstico histopatológico em HE.

2.1.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de testes não paramétricos sobre variáveis quantitativas de amostras independentes. Os

valores de cada grupo serão comparados entre si, pelo teste de Kruskal – Wallis. O nível de probabilidade de erro será fixado em 5% ($P < 0.05$).

2.2 Resultados

2.2.1 Descrição microscópica descritiva

Grupo 1 (Controle) – No período de 48 horas observou-se área de defeito preenchida por coágulo (Figura 4 a). Após sete dias, o defeito apresentava-se preenchido por tecido de granulação (Figura 4 b). Em um dos espécimes constatou-se pequeno foco de cartilagem hialina em calcificação. No período de 14 dias, notou-se a formação de tecido ósseo primário. Em muitos espécimes observou-se atividade osteogênica também na região medular, decorrente da presença de fragmentos ósseos da ostectomia (Figura 4 c). Após 21 dias, o tecido ósseo neoformado apresentava-se em fase de maturação, constatado pela presença das linhas de reversão. O osso formado mostrou espessura menor em comparação às paredes do defeito (Figura 4 d).

Grupo 2 (LLLT) – No período de 48 horas visualizou-se preenchimento do defeito ósseo por coágulo (Figura 5 a). Após sete dias, pôde-se observar discreta neoformação óssea a partir das paredes do defeito, estando ele preenchido por tecido de granulação (Figura 5 b). Em um dos espécimes verificou-se foco de cartilagem hialina. No período de 14 dias, notou-se a formação de uma ponte de tecido ósseo imaturo fechando o defeito (Figura

c). Aos 21 dias, o tecido ósseo ainda se apresentava imaturo, por vezes interposto por tecido conjuntivo fibroso (Figura 5 d). Em um dos espécimes notou-se foco de cartilagem hialina.

Grupo 3 (Celecoxibe) – Após 48 horas, observou-se formação de coágulo no interior do defeito ósseo (Figura 6 a). No sétimo dia, notou-se preenchimento do defeito ósseo ora por tecido de granulação com neoformação óssea a partir das paredes do defeito, ora por tecido ósseo primário (Figura 6 b). No período de 14 dias observou-se a maturação do tecido ósseo preenchendo a área de defeito (Figura 6 c). Aos 21 dias, notam-se trabéculas ósseas mais definidas, ainda em processo de remodelação, resultando em formação de ponte óssea com espessura mais delgada em comparação às paredes do defeito (Figura 6 d).

Grupo 4 (Celecoxibe e LLLT) – No período de 48 horas observou-se presença de coágulo no interior do defeito (Figura 7 a). No período de sete dias, o defeito ósseo apresentou-se preenchido por tecido de granulação, evidenciando-se discreta atividade osteogênica nas paredes do defeito (Figura 7 b). Após 14 dias, notou-se a formação de tecido ósseo primário fechando o defeito (Figura 7 c) Após 21 dias, as trabéculas ósseas se apresentavam mais organizadas, indicando processo de maturação (Figura 7 d).

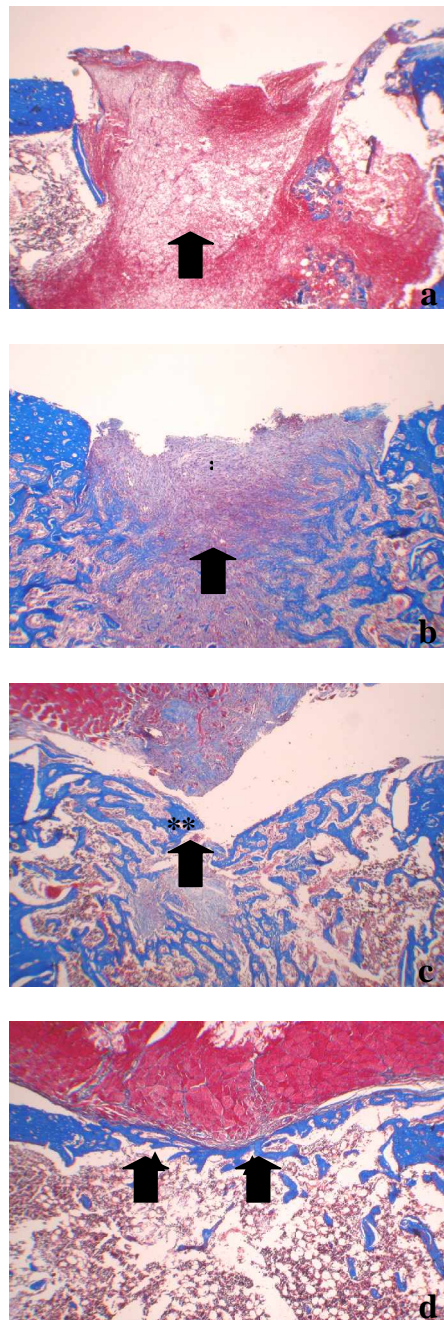


Figura 4 – *Grupo Controle* – a) 48 horas – coágulo preenchendo o defeito ósseo na cortical da tíbia; b) 7 dias – defeito preenchido por tecido de granulação (*); c) 14 dias - presença de trabéculas ósseas imaturas (**); d) 21 dias - tecido ósseo em maturação preenchendo o defeito ósseo (setas) (a, b, c, d – aumento original 20x, Tricrômico de Masson)

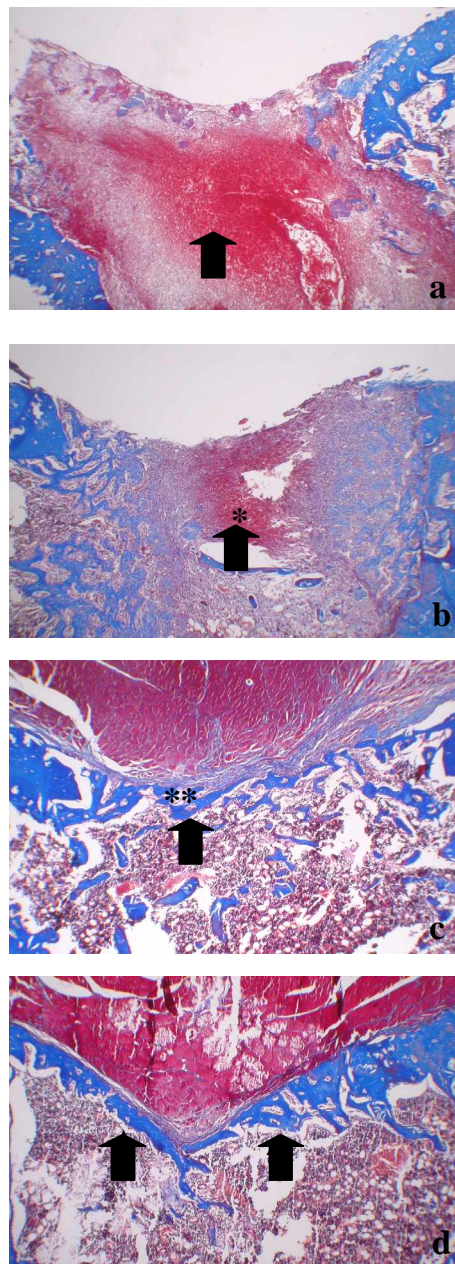


Figura 5 – Grupo LLLT – a) 48 horas – defeito preenchido por coágulo; b) 7 dias – defeito preenchido por tecido de granulação (*); c) 14 dias - trabéculas ósseas imaturas conectando a parede cortical original (**); d) 21 dias - tecido ósseo em maturação preenchendo o defeito ósseo (setas) (a, b, c, d – aumento original 20x, Tricrômico de Masson)

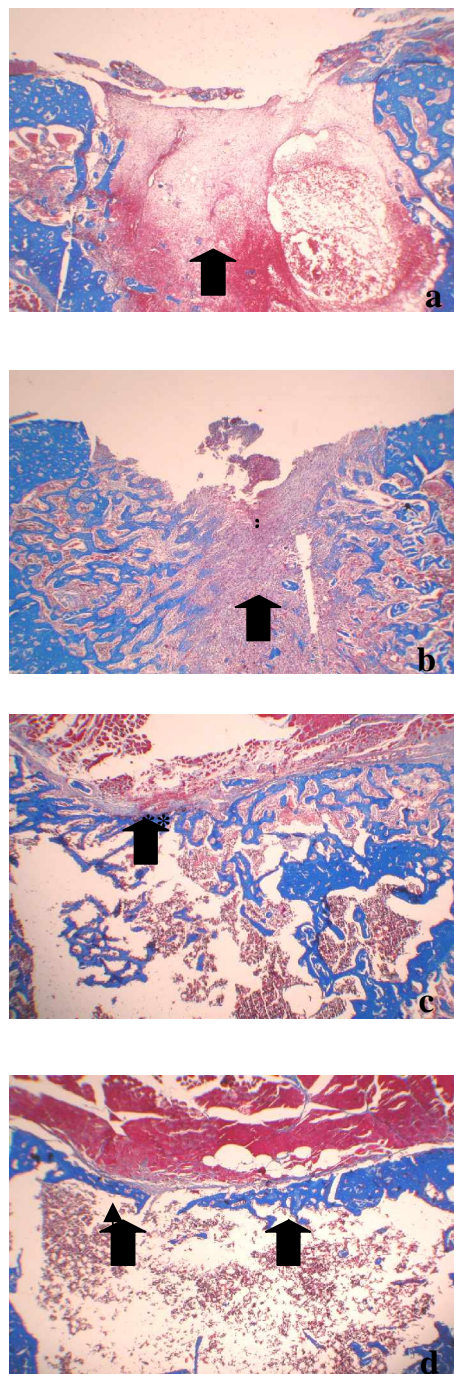


Figura 6 – *Grupo Celecoxibe* - a) 48 horas – defeito ósseo cortical preenchido por coágulo; b) 7 dias – defeito preenchido por tecido de granulação (*); c) 14 dias- trabéculas ósseas neoformadas (**); d) 21 dias - defeito preenchido por tecido ósseo em maturação (setas) (a, b, c, d – aumento original 20x, Tricrômico de Masson)

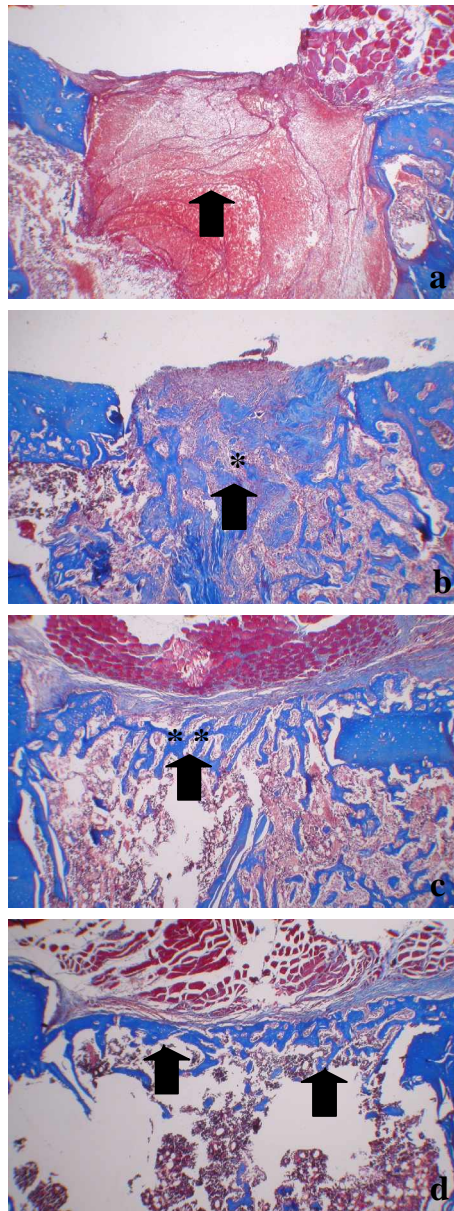


Figura 7 – Grupo Celecoxibe e LLLT - a) 48 horas – presença de coágulo no interior do defeito; b) 7 dias – tecido de granulação preenchendo a cavidade óssea, onde se observa discreta atividade osteogênica (*); c) 14 dias- trabéculas ósseas neoformadas conectam as paredes ósseas originais (**); d) 21 dias - tecido ósseo em maturação reparando o defeito ósseo (setas) (a, b, c, d – aumento original 20x, Tricrômico de Masson)

2.2.2 Análise histomorfométrica

A área de tecido ósseo neoformado foi utilizada utilizando-se os cortes corados em Tricrômico de Masson. Os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos após 14 dias, tanto o grupo tratado com o LLLT ou simultaneamente exposto à droga anti-COX-2. Tais resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Média \pm S.D. da morfometria de área (em μm) de defeito ósseo seguindo o tratamento com antiinflamatórios e laser terapia durante 21 dias

| Grupos | Período (dias) | | |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 7 | 14 | 21 |
| Controle | 56.12 \pm 12.4 ^a | 140.81 \pm 25.5 ^b | 158.37 \pm 41.2 ^d |
| Celecoxibe | 29.9 \pm 23 ^a | 103.53 \pm 35.9 ^b | 135.5 \pm 54.8 ^d |
| Laser | 54.22 \pm 15.0 ^a | 184.53 \pm 17.2 ^c | 217.0 \pm 34.4 ^d |
| Celecoxib e Laser | 56.95 \pm 9.60 ^a | 192.61 \pm 9.64 ^c | 210.8 \pm 31.0 ^d |

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em $p < 0,05$

2.2.3 Análise Imunoistoquímica

A expressão de COX-2 foi detectada predominantemente no citoplasma. Os cortes corados com a imunoistoquímica foram analisados por porcentagens de células imunopositivas, sob microscópio óptico. Dez campos foram avaliados por cortes, 40 campos para cada animal, em aumento de 400x, por casualização sistemática.

Seguindo 48 horas pós-cirúrgico, pôde-se observar imunoexpressividade da COX-2 no tecido ósseo circunjacente à lesão (Figura 8 a). Nos animais tratados com Celebra, somente um animal expressou COX-2 no tecido ósseo circunjacente, visto que o restante demonstrou um padrão de marcação negativo (Figura 8 b). Entretanto, no grupo tratado com laser e Celebra, um padrão exuberante de marcação pôde ser constatado (Figura 8 c). Após 7 dias, observou-se expressão de COX-2 no tecido de granulação e no tecido ósseo circunjacente no grupo controle (Figuras 8 d). No grupo tratado com Celebra, pôde-se observar que somente um animal expressou COX-2 no tecido de granulação e dois animais a expressaram no tecido ósseo circunjacente (Figura 8 e). Já no grupo combinado de laser e Celebra, um padrão intenso pôde ser constatado (Figura 8 f). Seguindo 14 dias de pós-operatório, pôde-se observar imunoexpressividade da COX-2 somente em algumas células no tecido ósseo medular no grupo controle (Figura 8 g). No grupo tratado com Celebra, a expressão de COX-2 foi negativa em todos os espécimes analisados. No grupo exposto ao laser e Celebra, pôdemos observar um padrão de marcação difuso, tanto no tecido ósseo medular quanto no tecido ósseo primário (Figura 8 h). Em 21 dias de pós-operatório, o grupo controle observou-se expressão de COX-2 em algumas células

tecido ósseo medular (Figura 8 i). No grupo tratado com Celebra, no entanto, houve ausência de expressividade para esse imunomarcador. Não obstante, o grupo tratado com laser e Celebra, um padrão homogêneo de marcação pôde ser constatado (Figura 8 j).

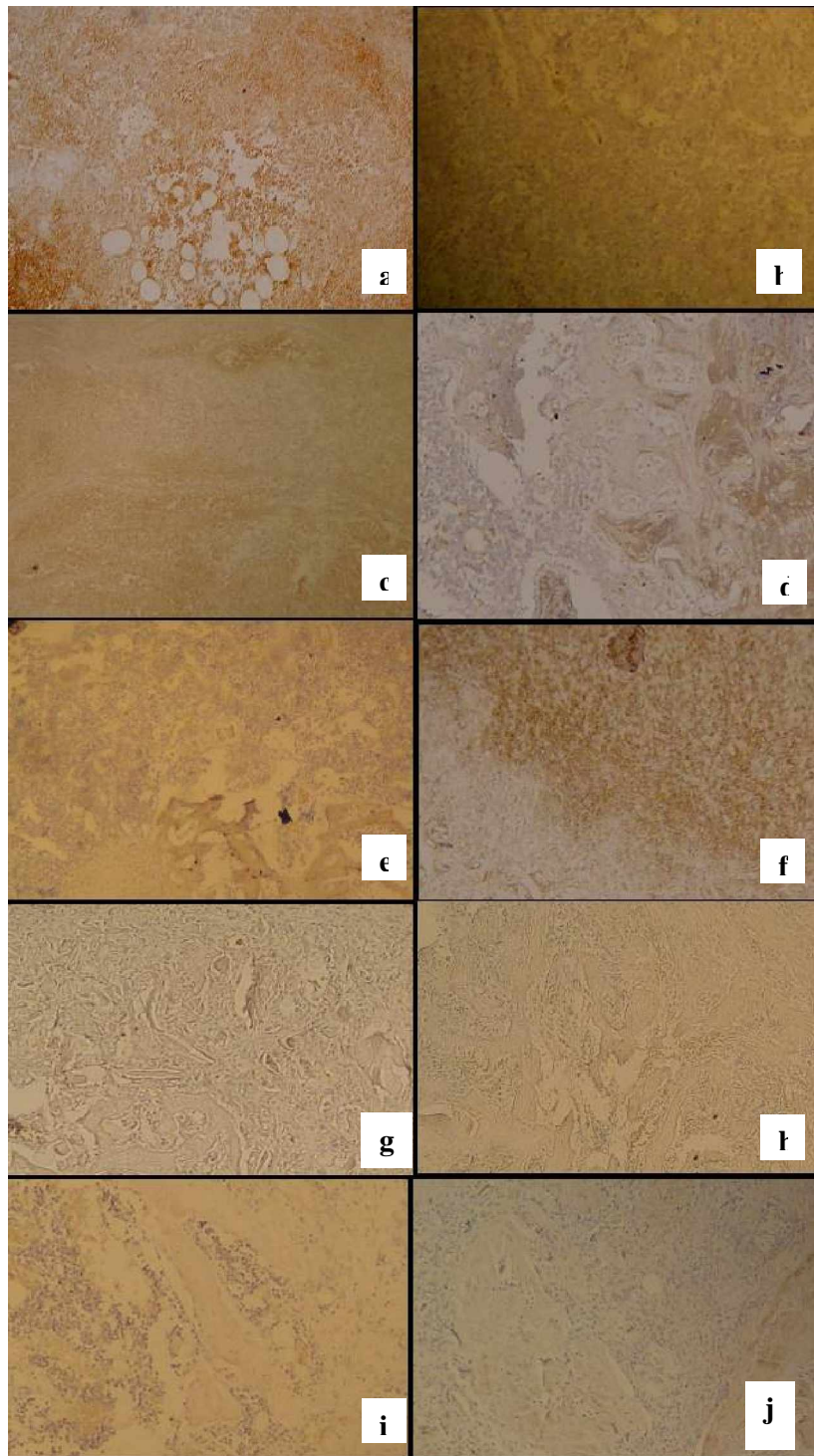


Figura 8 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j - Expressão de COX-2 em ratos expostos ao laser e tratados com Celebra (Imunoistoquímica, x40).

3. Discussão

A inflamação representa importante papel na reparação do tecido conjuntivo. No entanto, dependendo da sua intensidade, pode causar dor e desconforto ao paciente, tornando-se agressiva aos tecidos circunjacentes devido à liberação dos mediadores químicos, especialmente dos derivados do metabolismo do ácido araquidônico via COX-2. A fim de se minimizar seus efeitos, a administração de drogas antiinflamatórias usualmente se faz necessária.

Classicamente, os AINEs inibem mais efetivamente a atividade da enzima COX-1 do que a COX-2. Entretanto, após a identificação e o estabelecimento do papel da COX-2 nos processos inflamatórios, a Organização Mundial de Saúde classificou as drogas seletivas para COX-2 como uma nova subclasse de AINEs, os “coxibes”, objetivando a manutenção da sua atividade antiinflamatória preservando a biossíntese de prostaglandinas derivadas da COX-1, evitando, deste modo, sua atividade fisiológica, que causaria importantes injúrias à mucosa gastrointestinal. Apesar deste benefício específico, muitos trabalhos têm mostrado a influência negativa dessas drogas sobre o reparo ósseo em modelos animais e administração a longo prazo, quando o uso continuado da droga se faz necessário.

Nos procedimentos cirúrgicos odontológicos, a indicação das drogas antiinflamatórias é feita a fim de se reduzir a dor e o edema, causados pela fase aguda da inflamação no pós-operatório, a qual não deveria exceder 72 horas. Deste modo, o presente estudo foi desenvolvido, empregando-se administração de AINE seletivo para COX-2 em curto prazo, utilizado

rotineiramente na clínica odontológica, o celecoxibe, e analisando-se sua influência no reparo ósseo de ratos associados à laserterapia. Nossa experiência clínica confirma os benefícios das drogas no controle do edema e da dor pós-operatório. Torna-se importante enfatizar que a administração das drogas seguiu a mesma utilizada para procedimentos cirúrgicos odontológicos de pequeno e médio nível de dificuldade, a fim de se tentar simular as condições clínicas reais, como enfatizado por Einhorn , o qual chamou a atenção para a deficiência de estudos que simulem o manejo da dor aguda. A maioria dos artigos na literatura apresentam administração a longo prazo, própria para patologias crônicas persistentes, porém, falha na administração pré-operatória, a qual reproduziria adequadamente a situação proposta. Parece que o tempo de injeção dos AINEs e, conseqüentemente, os níveis plasmáticos da droga interfere com a geração de PGs necessárias ao reparo ósseo, principalmente nos períodos iniciais da inflamação. O'Keefe et al. observou a redução de 45% na formação óssea durante a incorporação de aloenxertos congelados associados com a administração de celecoxibe após 2 semanas. Após 5 semanas, a redução foi de 60%. Nossos resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e tratado com anti-COX-2, em relação à quantidade de tecido ósseo formado nos quatro períodos analisados, a despeito da observação morfológica, confirmada pela morfometria. Sugere-se, deste modo, que a posologia instituída para as drogas seletivas para COX-2 não foi suficiente para inibir a produção da enzima durante a fase aguda da inflamação, e, conseqüentemente, não exerceu papel significativo sobre a diferenciação

osteoblástica e neoformação óssea, o que mostra-se inteiramente de acordo com outros autores .

No período de 48 horas, a imunistoquímica para COX-2 confirmou a maior atividade da enzima na região central do defeito nos grupos experimentais não tratados com o antiinflamatório e também no grupo controle. Nos períodos seguintes, 14 e 21 dias, a imunexpressão da COX-2 não foi observada na medula óssea do grupo celecoxibe. Apesar destes resultados, a falta de imunoreatividade da enzima COX-2, especialmente no 14º dia pós-operatório não interferiu negativamente no reparo ósseo, como observado em microscopia óptica. Aparentemente, a presença da enzima nas fases iniciais da inflamação foi suficiente para que a atividade das PGs fosse eficaz em mobilizar as células envolvidas no reparo ósseo, relacionadas à administração inicial da droga apenas uma hora antes da realização do defeito. Gerstenfeld et al. iniciou a administração das drogas avaliadas, ketorolac e paracoxibe, 24 horas antes das cirurgias, seguido por 21 e 35 dias.

Para melhor elucidar as possíveis interações do celecoxibe e o laser, realizamos experimentos adicionais a este. Após 48 horas e sete dias, nossos resultados demonstraram que a terapia com laser de baixa intensidade por si só, falhou ao excercer qualquer atividade evidenciado pelo padrão histopatológico similar entre as tíbias expostas e não expostas ao laser. O mesmo panorama ocorreu com os animais expostos ao laser e ao celecoxibe. De um modo geral, no entanto, afirmamos que a laserterapia não foi capaz de acelerar o reparo ósseo imediatamente após o trauma mecânico, ou de modular a atividade da terapia anti-COX-2 neste experimento.

Inversamente, a exposição ao laser de baixa intensidade resultou em significativa indução de formação óssea 14 dias após o início da terapia. O mesmo foi verificado quando o laser foi combinado com o celecoxibe, evidenciado pela histopatologia e análise morfométrica subsequente. Entretanto, o laser parece ter estimulado uma melhora no reparo ósseo quando comparado ao reparo observado nas tíbias controle, e tratadas somente com celecoxibe. Nossos dados estão de acordo com outros autores que igualmente investigaram este mecanismo (Khadra et al., 2004; Gerbi et al., 2005). Na verdade, vários autores têm postulado que o laser de baixa intensidade pode estimular a proliferação celular óssea e atividade ALP, a qual reflete a atividade osteoblástica (Coombe et al., 2001). Contudo, em estudo conduzido por Ozawa et al. (Ozawa et al., 1998), a radiação após 14 dias falhou em causar estimulação. Os autores concluíram que a ação estimulante da radiação com laser ocorre durante a fase proliferativa e períodos iniciais da diferenciação dos precursores imaturos, porém, não ocorre durante os estágios mais avançados. Faz-se importante ter em mente que algumas vezes torna-se difícil comparar estudos sobre a ação do laser de baixa intensidade no tecido ósseo devido aos parâmetros dosimétricos, modelos experimentais e duração do tratamento serem muito distintos. Outros estudos são necessários para elucidar esta questão.

Ainda, nossos resultados revelaram que a terapia com o laser promove uma regulação da expressão de COX-2, mesmo quando combinado com o celecoxibe. No período de 48 horas, a imunohistoquímica para COX-2 confirmou a atividade principal da enzima na região central do defeito no grupo controle, porém, fraca nos animais tratados com o celecoxibe. Esta situação

não foi mantida após sete dias, quando a imunorreatividade foi mais intensa nas células do osso neoformado deste grupo experimental quando comparado ao controle. Nos períodos seguintes, 14 e 21 dias, a imunoexpressão de COX-2 foi positiva nas células ósseas. Uma vez que a laserterapia de baixa intensidade é capaz de aumentar a formação de novos capilares pela liberação de fatores de crescimento como, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Shibata et al., 2005), estimular a síntese de DNA e RNA no núcleo celular, e conseqüentemente, aumentar a proliferação e diferenciação celular (Wang et al., 2007), acreditamos que a imunoexpressão da COX-2 encontrada no tecido ósseo também poderia auxiliar no reparo ósseo. Em 1997, Sato et al. sugeriram que a COX-2 poderia estar envolvida nos estágios iniciais de osteogênese, provavelmente associado com a maturação dos osteoblastos. Além disso, Zhang et al. afirmaram que a enzima COX-2 atua na osteoblastogênese regulando os genes de diferenciação osteoblástica como Cbfa-1 e osterix. Mais recentemente, postulou-se que as células ósseas são capazes de produzir COX-2 após trauma mecânico (Li et al., 2002), sendo deste modo, importante para a formação óssea (Forwood, 1996). Nossos resultados estão em concordância com estes estudos prévios.

4. Conclusão

Nossos resultados sustentam a noção de que a terapia com laser de baixa intensidade é capaz de melhorar o reparo ósseo em tibia de ratos como resultado de uma regulação para a expressão de COX-2 nas células ósseas, mesmo quando associados com a administração de drogas anti-COX-2. Tais achados devem ser cuidadosamente direcionados a pacientes apresentando trauma da tibia, especialmente em casos onde se faz necessário administrar drogas antiinflamatórias em curto período de tempo, a fim de se minimizar a dor e o edema, como por exemplo, após procedimentos cirúrgicos.

Referências bibliográficas

AKMAN, S. et al. Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. *Adv Ther.*, v.19, n.3, p.119-125, 2002.

ALTMAN, R.D. et al. Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. *J Orthopaedic Trauma*, v.9, n.5, p.392-400, 1995.

BROWN, K.M. et al. Effect of COX-2 specific inhibition on fracture healing in the rat femur. *J Bone Joint Surg Am.*, v.86-A, n.1, p.116-123, 2004.

CHEN, Q. et al. Congenital lack of COX-2 affects mechanical and geometric properties of bone in mice. *Calcif Tissue Int.*, v.73, n.4, p.387-392, 2003.

COOMBE, AR. Et al. (2001) The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res* 4:3-14

EINHORN, T.A. Do inhibitors of cyclooxygenase-2 impair bone healing? *J Bone Mineral Res*, v.17, n.6, p.977-978, 2002.

FORWOOD MR (1996) Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res* 11:1688-93

FREITAS, I.G.F. Ação do laser de HeNe na osteogênese. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Elétrica e Computação – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2001.

GERBI, ME. Et al.(2005) Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. *Photomed Laser Surg* 23: 382-8

GERSTENFELD, L.C. et al. Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Orthop Res*, v.21, n.4, p.670-675, 2003.

GOLDSTEIN, J.L. et al. Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor. *Am J Gastroenterology* v.95, n.7, p.1681-1690, 2000.

HALPIN, R.A. et al. The absorption, distribution, metabolism and excretion of rofecoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in rats and dogs. *Drugs Metabolism and Disposition*, v.28, n.10, p.1244-1254, 2000.

HARDER, A.T., AN, Y.H. The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review. *J Clin Pharmacol*, v.43, n.8, p.807-815, Aug. 2003.

KARGMAN, S. et al. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*, v.111, n.2, p.445-454, 1996.

KAWAGUCHI, H. et al. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. *Clin Orthop* v.313, p.36-46, 1995.

KHADRA, M. et al.(2004) Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97: 693-700

Li J, BURR DB, TURNER CH (2002) Suppression of prostaglandin synthesis with NS-398 has different effects on endocortical and periosteal bone formation induced by mechanical loading. *Calcif Tissue Int* 70:320-9

LICHTENSTEIN, D.R., WOLFE, M.M. COX-2 selective NSAIDs. New and improved? *J Am Med Assoc.*, v.284, n.10, p.1297-1299, 2000.

NEEDELMAN, P., ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatol*, v.24, Supl. 49, p.6-8, 1997.

O'KEEFE, R.J. et al.(2006) COX-2 has a critical role during incorporation of structural bone allografts. *Ann N Y Acad Sci* 1068:532-542.

OSAWA, Y. et al. Low-energy laser irradiation stimulates bone nod formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, v.22, n.4, p.347-354, 1998.

OZAMA Y, SHIMIZU N, KARIYA G, ABIKO Y (1998) Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 22:347-54

PINHEIRO, A.L.B., et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. *J Clin Laser Med & Surg*, v.21, n.6, p.383-388, 2003.

SHIBATA, M. et al.(2005) Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol* 41:304-12

SIMON, A.M., MANIGRASSO, M.B., O'CONNOR, J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res*, v.17, n.6, p.963-976, 2002.

WANG W, BERGH A, DAMBER JE (2007) Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Relation with the expression of COX-2, the androgen receptor, and presence of focal chronic inflammation. *Prostate* 67:1238-46

WANNMACHER, L., FERREIRA, M.B.C. *Farmacologia clínica para dentistas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

WOLFE, M., LICHTENSTEIN, D., SINGH, G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med.*, v.340, n.7, p.1888-1899, 1999.

YAAKOBI, T., MALTZ, L., ORON, U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (HeNe) irradiation. *Calcif Tissue Int*, v.59, n.4, p.297-300, 1996.

ZHANG, X. et al. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest.*, v.109, n.11, p.1405-1415. 2002