GISELE EBLING ARTES

**Estudo comparativo dos efeitos da dexametasona e do diclofenaco sódico
sobre o processo reparativo de feridas induzidas no ventre lingual de ratos**

São Paulo

2012

GISELE EBLING ARTES

**Estudo comparativo dos efeitos da dexametasona e do diclofenaco sódico
sobre o processo reparativo de feridas induzidas no ventre lingual de ratos**

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. José Leonardo Simone

São Paulo

2012

Artes GE. Estudo comparativo dos efeitos da dexametasona e do diclofenaco sódico sobre o processo reparativo de feridas induzidas no ventre lingual de ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Sou grata a meus familiares, colegas pós-graduandos, orientador, professores da disciplina, técnicos e secretárias, que me acompanharam e me auxiliaram de alguma forma no decorrer deste estudo.

Agradeço também à professora **Luciana Corrêa**, pelos ensinamentos, incentivo e estímulo durante este período. Muito obrigada pela sua dedicação.

Meu sincero carinho e respeito a todos.

RESUMO

Artes GE. Estudo comparativo dos efeitos da dexametasona e do diclofenaco sódico sobre o processo reparativo de feridas induzidas no ventre lingual de ratos. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

A inflamação é uma resposta protetora para livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e suas consequências, porém se excessiva e não modulada, pode provocar a destruição progressiva do tecido. Este estudo pretende contribuir para o esclarecimento da influência de dois anti-inflamatórios, a dexametasona e o diclofenaco sódico, sobre a fase inflamatória do processo reparativo tecidual, bem como sobre o número de mastócitos nas diferentes fases do reparo. Foram utilizadas 60 ratas Wistar, divididas em 3 grupos (1, 2 e 3), medicadas 30 minutos antes de uma intervenção cirúrgica (lesão de 3mm de diâmetro no ventre lingual), com injeção intramuscular de 0,235mg/kg de dexametasona; 4,45mg/kg de diclofenaco sódico ou solução salina estéril, respectivamente. Os 3 grupos foram subdivididos em a, b, c, d, de acordo com o tempo de sacrifício: 6, 24, 48 e 120 horas após a cirurgia. As lesões foram fotografadas logo no momento cirúrgico e no sacrifício e as fotos utilizadas para análise clínica do processo de reparo e morfometria. As línguas foram extirpadas e enviadas para processamento histológico, os cortes foram direcionados para coloração em hematoxilina-eosina e em Azul de Toluidina para evidenciar e contagem do número de mastócitos. As características do processo reparativo foram descritas por meio de avaliação qualitativa dos seguintes componentes: extensão de áreas necróticas; intensidade de edema intersticial; tipo e intensidade do infiltrado inflamatório; graus de reepitelização, tecido de granulação e neovascularização. Os cortes corados em HE também tiveram seus campos digitalizados e analisados morfometricamente, para quantificação da reepitelização, mensurações do tecido de granulação, celularidade e edema. Os resultados da análise histológica semiquantitativa evidenciaram que o diclofenaco e a dexametasona acarretaram menor infiltrado inflamatório em relação ao controle na fase inflamatória do reparo, porém na fase produtiva a dexametasona exibiu menor intensidade de reepitelização e de neovascularização em relação aos

demais grupos. Os resultados da análise histomorfométrica mostraram significativamente menor edema no grupo do diclofenaco em 6h ($p=0,0041$) e em 24h ($p=0,0429$), bem como menor porcentagem da celularidade em 6 horas no grupo da dexametasona ($p<0,0001$). O grupo diclofenaco ainda exibiu menor área de lesão em 120h do que os demais grupos ($p=0,0060$), indicando maior eficiência de reparo. Quanto à quantidade de mastócitos em 24, 48 e 120 horas, o grupo controle exibiu significativamente os maiores valores ($p<0,0001$). Com base nesses resultados, conclui-se que o grupo da dexametasona apresentou pior desempenho em relação à reparação; que o diclofenaco sódico apresentou um melhor efeito sobre o fechamento da ferida cirúrgica e redução mais intensa do infiltrado inflamatório, e que ambos provocam redução de mastócitos na área lesionada.

Palavras-chave: Inflamação. Reparação. Dexametasona. Diclofenaco sódico. Mastócitos.

ABSTRACT

Artes GE. Comparative study of the effects of dexamethasone and diclofenac sodium on the repair process of induced wounds in the ventral tongue of rats. [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Inflammation is a protective response to rid the body of the initial cause of cell damage and its consequences, but when excessive and unmodulated, may cause progressive destruction of tissue. The aim of this study is to clarify the influence of two anti-inflammatory, diclofenac sodium and dexamethasone on the inflammatory phase of tissue repair process, as well as on the number of mast cells in different stages of repair. It was used 60 Wistar rats, divided into 3 groups (1, 2 and 3), medicated 30 minutes before surgery (lesion 3 mm in diameter in the ventral tongue), with intramuscular injection of 0.235 mg / kg dexamethasone, 4, 45mg/Kg of diclofenac sodium or sterile saline, respectively. The 3 groups were subdivided into a, b, c, d, according to the time of sacrifice, 6, 24, 48 and 120 hours after surgery. The lesions were photographed immediately at surgical time and at sacrifice, the photos were used for clinical analysis of the repair process and morphometry. The tongues were excised and sent for histological processing, the slices were directed for staining with hematoxylin-eosin and toluidine blue, for disclosure and count of the number of mast cells. The characteristics of the repair process were described through qualitative evaluation of the following components: extension of necrotic areas; intensity of interstitial edema, type and intensity of inflammatory infiltrate; degrees of reepithelialization, granulation tissue and neovascularization. Slices stained with HE also had their fields scanned and analyzed morphometrically to quantify reepithelialization, measurements of the granulation tissue, cellularity and edema. The results of semiquantitative histological analysis showed that diclofenac and dexamethasone led to lower inflammatory infiltrate compared to control in the inflammatory phase of repair, although in the productive phase dexamethasone showed less intensity of reepithelialization and neovascularization compared to the other groups. The results of the histomorphometric analysis showed significantly less edema in the diclofenac group at 6h ($p = 0.0041$) and 24 ($p = 0.0429$), as well as a lower percentage of cellularity in 6 hours in the dexamethasone group ($p < 0.0001$).

The diclofenac group also exhibited lower lesion area at 120h than the other groups ($p = 0.0060$), indicating greater efficiency of repair. Regarding the quantity of mast cells 24, 48 and 120 hours, the control group exhibited significantly higher values ($p < 0.0001$). Based on these results, we conclude that the dexamethasone group showed the worst performance in relation to repair; that diclofenac sodium showed a better effect on surgical wound closure and greater reduction of inflammatory infiltration, and that both cause a reduction of mast cells in the injured area.

Keywords: Inflammation. Repair. Dexamethasone. Diclofenac sodium. Mast cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Administração do fármaco ou solução fisiológica na musculatura interna da coxa.	38
Figura 4.2 – Antissepsia com clorexidina à 0,12%....	39
Figura 4.3 - Intervenção cirúrgica.....	39
Figura 4.4 - Remoção do fragmento incisionado	39
Figura 4.5 - Aspecto imediato da lesão após a cirurgia.....	39
Figura 5.1 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 6h (HE, 100X).	54
Figura 5.2 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 24h (HE, 100X).	55
Figura 5.3 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 48h (HE, 100X).	56
Figura 5.4 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 120h (HE, 100X).	57
Figura 5.5 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 24h, com coloração para evidência de mastócitos (Azul de toluidina, 100X).	58
Figura 5.6 - Detalhe dos mastócitos, os quais exibem metacromasia e granulação intensa no citoplasma (Azul de toluidina, 400X).	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Gradação de necrose (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental.....	44
Tabela 5.2 - Gradação de edema (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental.....	45
Tabela 5.3 - Gradação de infiltrado inflamatório (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental.....	45
Tabela 5.4 - Gradação de reepitelização (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental.....	46
Tabela 5.5 - Gradação de tecido de neovascularização (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental.	47
Tabela 5.6 - Média ($\pm$ desvio-padrão) da distância entre as bordas da ferida (mm) medida no corte histológico, segundo os grupos e períodos experimentais I.....	50
Tabela 5.7 - Contagem dos mastócitos no corte histológico, segundo os grupos e períodos experimentais.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
AIE	anti-inflamatório esteroidal
AINE	anti-inflamatório não esteroidal
COX	cicloxygenase
dpi	pontos por polegada
EGF	fator de crescimento epidérmico
FAP	fator ativador de plaquetas
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
FNT	fator de necrose tumoral
FO-USP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
H	hora
HOX	hidroperoxidase
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
Ig-E	imunoglobulina-E
IL	interleucina
Kcal	quilocalorias
Kg	quilogramas
LT	leucotrienos
M	molar
mcg	microgramas
mg	miligramas
ml	mililitros
mm	milímetros
NGF	fator de crescimento neural
ON	óxido nítrico
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PG	prostaglandina
pH	potential hydrogen
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PM	Peso metabólico

RNA	ácido ribonucléico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
TGF	fator de transformação do crescimento
TMB	taxa metabólica basal
TME	taxa metabólica específica
VEGF	fator de crescimento do endotelia vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Inflamação	15
2.3 Mastócitos	25
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Grupos experimentais	34
4.2 Materiais	37
4.3 Métodos	38
4.3.1 Indução da lesão	38
4.3.2 Fixação e lavagem das peças	40
4.3.3 Processamento histológico	40
4.3.4 Análise histológica	41
4.3.5 Análise clínica do processo de reparo e morfometria	41
4.3.6 Análise morfométrica	42
4.3.7 Análise estatística	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Análise histológica semiquantitativa	44
5.2 Análise histomorfométrica	48
6 DISCUSSÃO	60
6.1 Necrose	60
6.2 Edema	61
6.3 Infiltrado Inflamatório	62
6.4 Reepitelização e bordas	64
6.5 Neovascularização	64
6.6 Tecido de granulação	66
6.7 Área da ferida	67
6.8 Mastócitos	68
7 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

A dor como sintoma da inflamação é uma alteração da normalidade que o cirurgião dentista freqüentemente se depara na prática clínica diária, sendo o domínio da terapêutica medicamentosa fundamental para o seu controle. Além dos processos patológicos passíveis de desencadear dor e inflamação, há diversos procedimentos odontológicos que contribuem significativamente para o alto índice de utilização de drogas analgésicas e anti-inflamatórias.

Neste âmbito, estudos têm demonstrado a eficiência clínica dos anti-inflamatórios esteróides e não esteróides no controle da resposta inflamatória e algica (Rang et al., 2001). Porém, a administração prévia à injúria e ao processo inflamatório, chamada de preemptiva, tem apresentado opiniões divergentes com relação a sua efetividade (Joshi et al., 2004) , principalmente pela falta de consistência nos ensaios clínicos.

A administração de fármacos antes da indução do processo inflamatório minimiza a sinalização celular induzida pela lesão, desta forma, todo o processo inflamatório pode ter sua duração alterada em virtude de intervenções farmacológicas.

A dexametasona é um dos anti-inflamatórios esteroidais (AIE) mais administrados, tendo sua eficácia para o alívio de dor e edema comprovados (Tsai et al., 2003).

Dentre os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) mais utilizados, destaca-se o diclofenaco sódico, principalmente por seu baixo custo, efetividade no alívio da dor e auxílio na reparação tecidual (Hasan et al., 2005) .

Considerando-se o potencial inflamatório de feridas em mucosa oral induzidas durante o procedimento cirúrgico, a análise da eficácia anti-inflamatória destes medicamentos é fundamental, principalmente quando procuramos controlar as fases do processo inflamatório agudo para minimizar alguns efeitos indesejáveis do decorrer desse processo, esperando uma boa e rápida reparação.

Diversas células participam e tem fundamental importância no processo inflamatório, liberando citocinas ou trabalhando na quimiotaxia ou ainda na limpeza da área da lesão, fagocitando restos celulares e auxiliando no processo de reparo. Um

exemplo de uma dessas células são os mastócitos. Eles exercem uma importante função na fase inflamatória, pois são responsáveis pela liberação de ampla gama de citocinas. Apesar de serem células diretamente ligadas a processos alérgicos, elas exercem grande influência sobre os fibroblastos, endoteliócitos e vasos sanguíneos (Puxeddu et al., 2003) .

Há diversos trabalhos que analisam os parâmetros de inflamação em lesões teciduais, todavia a análise tecidual detalhada, com a comparação do número de células específicas, como os mastócitos, em conjunto com a administração desses medicamentos é escassa na literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Inflamação

O desconforto pós-operatório é acentuado pelo processo inflamatório desencadeado pelo trauma cirúrgico. O organismo responde a injúria tecidual através de fenômenos celulares e vasculares organizados por uma série de mediadores químicos com o intuito de reparar o tecido lesionado (Cotran et al., 2006).

A lesão tecidual desencadeia uma série de eventos humorais e celulares aparentemente bem regulados, que levam à remoção dos agentes nocivos, reparo e restabelecimento da função do tecido lesado (Yagiela et al. 2011). A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e de suas consequências (Cotran et al., 2006). Nesse aspecto, a inflamação é claramente essencial para o nosso bem-estar, porém, se for excessiva ou se tornar crônica, poderá provocar a destruição progressiva do tecido em lugar de seu reparo. Nesse caso, se não modulada adequadamente, torna-se potencialmente nociva ao organismo.

A inflamação refere-se a uma progressão de eventos iniciados e controlados por mediadores químicos endógenos. A lesão tecidual causa a liberação de mediadores químicos, extra e intracelulares responsáveis pelo desencadeamento da resposta inflamatória. Essas substâncias químicas específicas são, em grande parte, responsáveis pelos dois eventos fundamentais da inflamação, que são o aumento da permeabilidade vascular, o acúmulo e a ativação dos leucócitos (Yagiela et al., 2011). Estas alterações produzem as manifestações clínicas clássicas da inflamação como calor, rubor, tumor (edema) e dor.

A liberação dessas substâncias endógenas ocorre de acordo com um padrão cronológico. No primeiro estágio da inflamação, caracterizado como agudo, temos a liberação de mediadores pré-formados, como a histamina, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar. O principal local de armazenamento da histamina na maior parte dos tecidos é o mastócito e no sangue é o basófilo. Essas células

sintetizam histamina e a armazenam nos seus grânulos secretórios (Goodman e Gilman 2007). O segundo estágio, ou estágio subagudo, é caracterizado pela infiltração de leucócitos e células fagocitárias, dentre outras células inflamatórias que migram para o local da injúria. As moléculas de adesão são importantes nesse processo (Walsh et al., 1991; Granger; Kubes, 1994). As prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LT), o fator de ativação das plaquetas (FAP) e as citocinas também desempenham um importante papel. As prostaglandinas e os leucotrienos são chamados de eicosanoides e são produzidos pela maioria das células. Nas reações inflamatórias agudas, as PGs aparecem nos líquidos e exsudatos mais tarde (seis a 12 horas após a lesão) do que outros mediadores, como a histamina, causando dentre outros efeitos, aumento da permeabilidade vascular. (Yagiela et al., 2011). Os leucotrienos produzem uma contração lenta e prolongada da musculatura lisa e aumentam a permeabilidade vascular, desempenhando papel importante na formação do edema. Já o FAP é formado por um número menor de tipos celulares, principalmente leucócitos, células endoteliais e plaquetas (Goodman e Gilman, 2007), e desempenham, dentre outras ações, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia dos neutrófilos (Yagiela et al., 2011).

O terceiro estágio da inflamação, ou estágio crônico, envolve a fase linfocítica da lesão, relacionada ao processo de limpeza e reparo, na qual ocorrem degeneração tissular e fibrose. As citocinas, em particular as interleucinas, [em especial a interleucina 1 (IL-1)], e o fator de necrose tumoral α (FNT- α), são proeminentes nesse estágio e desempenham papéis essenciais na orquestração do processo inflamatório (Dempsey et al., 2003). A IL-1 e o TNF são secretados por monócitos, macrófagos e outras células. Trabalhando em combinação entre si e com várias outras citocinas e fatores de crescimento, induzem a expressão de genes e a síntese de proteínas em uma variedade de células, para mediar e promover a inflamação (Goodman e Gilman, 2007).

Os eicosanoides, metabólitos do ácido araquidônico (AA), incluindo as PGs, a prostaciclina, o tromboxano A_2 , os LT, as lipoxinas e hepoxilinas, ao contrário de outros mediadores como a histamina, não são armazenados, mas sim produzidos pela maioria das células quando uma variedade de estímulos físicos, químicos e hormonais ativam as acil-hidrolases, mais notavelmente a fosfolipase A_2 (PLA $_2$), que tornam disponível o

AA. Esse é o mais abundante precursor dos eicosanoides em seres humanos, e é derivado do ácido linoleico da dieta. A biossíntese dos eicosanoides depende primariamente da liberação, pela PLA₂, de AA dos fosfolipídeos ou de outros lipídeos complexos da membrana celular, para que esses AA possam sofrer a ação das enzimas sintetizadoras de eicosanoides. Estímulos físicos e químicos ativam a translocação dependente de Ca²⁺ da PLA₂ presente no citosol, que tem alta afinidade por AA, para a membrana, onde ela hidrolisa uma ligação éster nos fosfolipídeos da membrana, liberando o araquidonato. Um vez liberado, parte do AA é rapidamente metabolizado a produtos oxigenados, por meio de vários sistemas enzimáticos distintos, incluindo as cicloxigenases (COX), as lipoxigenases e as enzimas do citocromo P450. (Goodman e Gilman, 2007). O AA é metabolizado à PGs pelas atividades de cicloxigenase e hidroperoxidase (HOX) das prostaglandinas G e H sintase e metabolizado à leucotrienos pela lipoxigenase.

Há duas isoformas distintas de cicloxigenases, a COX-1 e a COX-2. A primeira é responsável pela formação de substâncias fisiológicas protetoras, como a citoprotetora do epitélio gástrico. Já a COX-2, é a principal fonte de prostanóides formados na inflamação.

A intensidade da resposta inflamatória está diretamente relacionada à natureza e intensidade da lesão, ao local e tecido afetado e pela responsividade do hospedeiro. O uso de medicamentos para modular este processo, muitas vezes se faz necessário, uma vez que respostas teciduais intensas podem retardar a reparação.

A reparação e reestruturação tecidual constituem mecanismo complexo e dinâmico, em que vários fatores contribuem para diversos tipos de cicatrização, como hipertrofia, atrofia ou normotrofia, da área lesionada. Esses processos compreendem três fases: inflamação, proliferação celular (fase de granulação) e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como colágeno, elastina e fibras reticulares (Cotran et al., 2006). O processo de reparo é constantemente focalizado nos fibroblastos, na colagenização, nos miofibroblastos e na angiogênese; contudo é composto pela fase inicial inflamatória, como já citada, crucial para o controle e eliminação de bactérias no local afetado e para a liberação de citocinas recrutadoras de fibroblastos, queratinócitos e macrófago.

Na maioria dos tipos de inflamação aguda, os neutrófilos predominam durante as primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídas pelos monócitos depois de 24 a 48 horas. Algumas das principais razões para essa sequência são que os neutrófilos encontram-se mais numerosos no sangue, respondem mais rapidamente às quimiocinas e podem se ligar mais firmemente às moléculas de adesão que são induzidas nas células endoteliais desde o início. Após a migração, os neutrófilos têm uma sobrevivência curta; pois sofrem apoptose depois de 24 a 48 horas, enquanto os monócitos sobrevivem por mais tempo (Pinheiro, 2006).

Como os múltiplos eventos do processo inflamatório parecem ser iniciados e integrados por mediadores químicos produzidos no local, acredita-se que as drogas anti-inflamatórias inibem a produção ou a atividade de um ou mais desses mediadores (Yagiela et al., 2011). Contudo, modular essa fase inicial da reparação por intermédio de anti-inflamatórios, pode ser benéfico, acelerando a reepitelização, ou até mesmo prejudicial, quando há uma super estimulação do tecido cicatricial (Martin; Leibovich, 2005; Wilgus, 2008)

Os anti-inflamatórios atuam na inibição da biossíntese de eicosanóides, importantes mediadores pró-inflamatórios, como já visto. Dois grupos de medicamentos com ação anti-inflamatória muito utilizados em Odontologia são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) (Bamgbose et al., 2005; Aoki et al., 2006; Buyukkurt et al., 2006) e os glicocorticoides (Bamgbose et al., 2005; Buyukkurt et al., 2006; Markovic; Todorovic, 2007; Laureano et al., 2008).

Ambos os grupos de anti-inflamatórios reduzem os níveis de prostaglandina, sendo assim considerados analgésicos eficazes e redutores da inflamação (Mengle-Gaw; Schwartz, 2002; Park et al., 2006).

Para redução de sintomatologia dolorosa e de inflamação pós-operatória, os AINEs têm sido administrados de forma preventiva (pré-cirúrgica ou preemptiva), (Joshi et al., 2004; Simone, 2009) ou de forma terapêutica, após o término do efeito anestésico (Buyukkurt et al., 2006), com o objetivo de bloquear a liberação de substâncias que modificam o limiar de excitabilidade dos nociceptores periféricos e com isso obter analgesia.

Os AINEs tradicionais agem inibindo as prostaglandinas sintases, enzimas coloquialmente conhecidas como cicloxigenases, que convertem o AA em prostaglandinas, porém, não inibem as vias da lipoxigenase no metabolismo do AA e por isso não suprimem a formação de leucotrienos. As cicloxigenases 1 e 2 são enzimas associadas à membrana, e cada uma delas consiste em um longo canal que termina com um formato de curva, sendo mais largo o canal da cicloxigenase 2. O ácido araquidônico penetra no canal, é enrolado na curvatura e tem dois oxigênios inseridos e um radical livre extraído, restando um anel de 5 carbonos, característico das prostaglandinas. Os AINEs agem entrando nesses canais e bloqueando a entrada do AA. A seletividade pela COX-2, pode ser explicada pelo aspecto estrutural dos anti-inflamatórios seletivos, sendo volumosos demais para encaixar-se no canal da COX-1.

Supõe-se que a inibição da COX-2 medeia em grande parte as ações antipiréticas, analgésicas e anti-inflamatórias dos AINEs, ao passo que a inibição simultânea da COX-1 responde em grande parte, mas não exclusivamente, pelos efeitos adversos indesejáveis sobre o trato gastrointestinal. (Rang et al., 2001; Bogliolo, 2006; Goodman e Gilman, 2007).

A maioria dos AINEs tradicionais, diferentemente dos AINEs seletivos para COX-2, tem pouca seletividade e inibe igualmente a COX-1 e a COX-2, embora alguns, como o diclofenaco, o meloxicam e a nimesulida, mesmo tidos convencionalmente como AINEs tradicionais, exibam uma seletividade para COX-2 que se aproxima dos AINEs seletivos (Goodman e Gilman, 2007).

O diclofenaco é um dos AINEs mais utilizados na Odontologia, frequentemente empregados após traumatismos diversos ou no pós-operatório. Esse fármaco, possui atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória. O diclofenaco, além de possuir uma potência contra a COX-2 maior que outros AINEs tradicionais, parecem reduzir as concentrações intracelulares de AA livre nos leucócitos, talvez por alterar sua liberação e captação (Brooks e Day, 1991). O diclofenaco tem rápida absorção, com concentração plasmática de pico atingida entre 2 e 3 horas, após administração oral, ampla ligação às proteínas (99%) e meia vida curta, de 1 a 2 horas. É metabolizado no fígado e os metabólitos secretados na urina (65%) e na bile (35%) (Goodman e Gilman, 2007). Após a administração de 75 mg de diclofenaco por injeção intramuscular, a

absorção é imediata e o pico médio das concentrações plasmáticas de 2,5 mcg/ml são atingidos após aproximadamente 20 minutos.

Schweitzer et al. (2009), realizou um estudo em ratos, onde um grupo de animais foi submetido a uma intervenção na pata e no dorso para induzir uma reação inflamatória aguda. Os animais receberam dose única de 2 mg/Kg de diclofenaco sódico, via oral, logo após o trauma. O diclofenaco foi misturado à uma solução radioativa e os animais foram congelado e seccionados. A concentração e a localização deste fármaco pôde ser analisada em 1, 4, 8 e 24 horas após sua administração, por autoradioluminografia. A concentração máxima do diclofenaco foi alcançada dentro de 4 a 8 horas nas áreas inflamadas, enquanto nos tecidos saudáveis, foi de aproximadamente 1 hora. A meia-vida do fármaco nos animais sem o trauma foi de aproximadamente 2 horas, enquanto os animais que sofreram o trauma exibiram uma meia-vida de aproximadamente 6 horas. Os autores concluíram que o medicamento apresentou afinidade aos tecidos inflamados, por ter sido predominantemente encontrado nas regiões que sofreram o trauma.

Outro estudo, direcionado a elucidar mecanismos imunológicos da alergia demonstra que o diclofenaco provoca estimulação da degranulação de mastócitos (Grönneberg; Dahlén, 1990). Os AINEs tradicionais em geral podem causar desgranulação de mastócitos, de modo que em pacientes com mastocitose sistêmica (uma condição em que há mastócitos em excesso na medula óssea), deve-se ter o cuidado de realizar o bloqueio com antagonistas de receptores de histamina antes que a administração desses anti-inflamatórios seja iniciada (Goodman e Gilman, 2007).

Também é encontrada na literatura, a influência do diclofenaco sódico na angiogênese, como no estudo de Mayorek et al. (2010). Esses autores estudaram o potencial de inibição do diclofenaco sódico no crescimento de tumores de pâncreas em ratos. Utilizaram uma dose de 30mg/kg/dia do medicamento e observaram uma redução de 60% no tamanho dos tumores, relacionando esses resultados à acentuada diminuição da vascularização do tumor, encontrando baixos níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) no grupo experimental.

Já o estudo de Uslu et al. (2010), comparou o edema na pata de ratos após o trauma, realizado com o auxílio de um dispositivo cilíndrico metálico, pesando 150g,

que caía sobre o membro do animal de uma altura de 40cm, causando danos apenas em tecido mole. Os animais foram divididos em 4 grupos de 8. Um grupo controle, que recebeu injeção de solução fisiológica; um grupo que foi medicado topicamente com diclofenaco sódico em gel; outro grupo administrado com iloprost, um análogo da prostaciclina e o quarto grupo que recebeu diclofenaco sódico injetável 25mg/kg/dia. Todas as injeções foram aplicadas por via intraperitoneal e os animais foram medicados à cada 12h durante os três dias de estudo. Os pesquisadores tiveram o cuidado de medir as patas antes do trauma e 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, 48 e 72h após, mergulhando-as em um pequeno frasco com água graduado. Observaram como resultados, nas primeiras 4h, um maior aumento de volume para o grupo controle e iloprost. Após 4h todos os grupos mostraram decréscimo no edema. O grupo iloprost mostrou mais rápida resolução do edema em 72 horas, seguido do grupo do diclofenaco sódico injetável, do gel e do grupo controle. A porcentagem do aumento de volume após o trauma para o grupo que recebeu diclofenaco sódico intraperitoneal foi de 26,5% em 1 hora, 35% em 2 horas, 42% em 4 horas, 36% em 8 horas, 21% em 24 horas, 14% em 48 horas, e 0,003% em 72 horas. Nesse último período, podemos comparar esse grupo, que praticamente não apresentou mais edema, ao grupo controle, com uma taxa de 20% no aumento do edema e ao grupo que utilizou diclofenaco sódico em gel, com 13% de aumento de edema.

O outro grupo de anti-inflamatórios muito utilizados na prática odontológica é dos corticosteroides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIE). Esses fármacos atuam através do controle da velocidade de síntese das proteínas. Os corticosteroides reagem com proteínas receptoras no citoplasma das células sensíveis de muitos tecidos, formando um complexo esteroide-receptor. Esse complexo sofre uma modificação e a seguir move-se para o núcleo, onde se liga á cromatina e regula a transcrição de genes específicos. Verifica-se com isso, um aumento da transcrição, indicada pela ativação da síntese de RNA mensageiro, culminando na produção de proteínas corticoides induzidas, como a vasocortina e a anexina. A vasocortina auxilia na inibição do edema e a anexina inibe a formação da enzima Fosfolipase A₂. (Goodman; Gilman, 2007; Wannmacher; Ferreira, 2008).

Os corticosteroides inibem não apenas os fenômenos iniciais do processo inflamatório (edema, deposição de fibrina, vasodilatação, migração de leucócitos para a área inflamada e atividade fagocítica), mas também suas manifestações mais tardias (neovascularização e proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e, posteriormente, a cicatrização) (Goodman e Gilman, 2007).

Os glicocorticoides são imunossuppressores, principalmente pela sua capacidade de restringir a proliferação clonal de células T, através da redução da transcrição do gene da IL-2. Diminuem também a transcrição de muitos outros genes de citocinas, incluindo os genes do TNF- α da IL-1 e de muitas outras interleucinas (Rang et al., 2001). Como atuam ao modificar a expressão gênica, o tempo de seu efeito apresenta pouca correspondência com suas concentrações plasmáticas (Goodman e Gilman, 2007).

Dentre os corticosteroides, a dexametasona apresenta uma das maiores potências anti-inflamatórias, maior afinidade pelos receptores de glicocorticoides e menor retenção de sódio (Rang et al., 2001). A meia-vida plasmática da dexametasona é de aproximadamente 4 horas e a meia-vida tecidual de aproximadamente dois dias. É metabolizada no fígado e a excreção é pela urina, com 65% desse fármaco excretado dentro de 24 horas. (Goodman e Gilman 2007).

Simone (2009), realizou um estudo com 54 pacientes, com indicação de remoção do terceiro molar não erupcionado ou semi-erupcionado. Todos receberam aleatoriamente e de modo duplo-cego uma hora antes da cirurgia, doses únicas de diclofenaco sódico 50mg ou dexametasona 8mg ou placebo por via oral. A intensidade de dor foi registrada através da escala analógica visual nos períodos pós-operatórios de 1, 2, 3, 6, 8, 12, 24 e 48 horas. O edema foi avaliado através de uma escala no 1º, 2º, 4º e 7º dias. O autor concluiu que a dexametasona e o diclofenaco sódico foram clinicamente eficazes no controle da dor e do edema quando administrados preemptivamente, mas a dexametasona apresentou resultados significativamente superiores no controle da dor e do edema pós-operatório.

Kara e Gokalan (1999), mostraram que o uso preemptivo de dose única de 10mg de dexametasona, reduziu a intensidade de edema palpebral em rinoplastias, quando comparado aos pacientes que receberam somente soro fisiológico. Isso ocorreu apenas

até 48 horas, e após esse período esse efeito foi perdido e o edema instalado igualmente ao grupo controle.

Grossi et al. (2007), medicaram pacientes com necessidade de exodontia de terceiro molar impactado com dexametasona de 4 ou 8 mg através de injeção submucosa na região a ser operada. Utilizaram outro grupo de pacientes sem medicação, como grupo controle. Verificaram que no segundo dia pós-operatório, os grupos que receberam a dexametasona mostraram uma redução significativa do edema facial, quando comparados ao grupo controle, porém não apresentaram uma diferença significativa entre si.

Talas et al., 2002, mostraram que os corticosteróides suprimem a fase inflamatória da cicatrização e que o seu uso continuado atrasa o processo de cicatrização, podendo prejudicar o reparo, o que não acontece com seu uso em dose única no pós-operatório. Outros autores também afirmam que o atraso e a influência negativa da dexametasona sobre o processo de reparo estão ligados ao uso crônico desse fármaco (Gupta et al., 1999), podendo atrasar esse processo de cicatrização, influenciando negativamente também na reepitelização.

Durmus et al. (2003), avaliaram os efeitos de dose única preemptiva de dexametasona na cicatrização de feridas em dorso de ratos. Formaram dois grupos de 8 animais cada, onde um grupo recebeu 1mg/kg de dexametasona e o outro grupo apenas solução salina, permanecendo como grupo controle. Realizaram uma incisão de 4 cm na linha média dorsal de cada animal com profundidade limitada pela fáscia muscular e a suturaram com fio-de-sutura não reabsorvível. Após 14 dias removeram parte da ferida para análise. Verificaram no grupo de ratos tratados com dexametasona, um menor índice de reepitelização, de colagenização e de fibroblastos no tecido analisado, quando comparado ao grupo controle. Já o infiltrado inflamatório e o grau de neovascularização, mostraram-se maiores no grupo tratado com o corticoide. Concluíram que a dexametasona a 1 mg / kg pode ter efeitos negativos sobre o processo reparativo e que para comparar os efeitos relacionados à dose, novas experiências com dexametasona em diferentes doses serão necessárias.

Reis et al. (2008), analisaram histologicamente lâminas de pele de ratos tratados com dose única de 2mg/kg de dexametasona, 1 hora antes da remoção com punch de

um fragmento de 6 mm de pele da região dorsal. Esse grupo foi comparado à um grupo submetido à laserterapia e um grupo controle, que não recebeu tratamento. Foi observada após 3 dias da cirurgia, redução da inflamação aguda em comparação ao grupo controle. No 5º dia pós-operatório, a proliferação celular não foi tão intensa, caracterizada essencialmente por tecido de granulação. Houve uma escassez de leucócitos e de fibroblastos no tecido em reparação. Os autores concluíram que a dexametasona interfere negativamente no processo de reparo e que sua utilização simultânea à laserterapia pode ser benéfica à reparação.

Nguyen et al. (1998) estudaram o efeito dos glicocorticoides sobre o processo inflamatório em ratos. Utilizaram dose única de 0,3mg/kg de dexametasona, betametasona ou soro, no momento cirúrgico, onde foi realizada uma incisão abdominal de 1,5cm com profundidade até o músculo reto, e imediatamente suturada. No pós-operatório de 1, 3 e 5 dias, removeram 0,1ml de fluido da ferida de cada grupo e após análise por citometria de fluxo, realizaram a contagem de leucócitos totais. Obtiveram como resultados, em comparação ao grupo controle, uma redução de 57% no total de leucócitos circulantes no 1º dia pós-operatório para o grupo da dexametasona, com 10% de redução no 3º e 5º dias pós-operatórios. Já no grupo da betametasona houve uma redução de 60%, 39% e 33% nos 1º, 3º e 5º dias pós-operatórios, respectivamente. Os autores concluíram que a administrações em dose única de glicocorticóides localmente em feridas cirúrgicas, causa pelo menos 50% de redução no total de leucócitos no 1º dia pós-operatório, e que a dexametasona apresenta menor tempo de duração na inibição dessas células.

Tenius et al. (2007) investigaram o uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Durante 30 dias, 30 animais receberam injeções subcutâneas de 0,1mg/kg/dia de dexametasona e outros 30, de solução fisiológica. Após esse período, realizaram uma incisão de 4cm de comprimento na região dorsal de cada animal, que se estendeu em profundidade até a fáscia muscular. Suturaram a lesão com fio de nylon, e no pós-operatório mantiveram-se as medicações em iguais dosagens e via de administração. Sacrificaram os animais após 3, 7 e 14 dias. Um fragmento de pele da região da lesão foi submetido à análise histológica, onde foi observada significativa redução no infiltrado de células inflamatórias no terceiro 60,31%

e sétimo 34,7% dias pós-cirúrgicos, para o grupo tratado com a dexametasona, em relação ao grupo controle. No 14^o dia todos os animais apresentaram menor porcentagem de células inflamatórias, porém sem significância estatística.

2.3 Mastócitos

Os mastócitos cumprem um importante papel na inflamação, na resposta imunitária e no reparo tecidual. Na presença de um estímulo, essas células são capazes de secretar entre 80 e 300 grânulos ricos em histamina, mediadores derivados dos lipídeos (ácido araquidônico e fosfolipídeos acetilados), proteinases (triptase e quimase), proteoglicanos (heparina) e citocinas (Walsh et al., 1995; Duarte et al., 1999; Walsh, 2003). Como já vimos, a histamina influencia na vasodilatação e na permeabilidade vascular, tendo sido relacionada às mudanças vasculares observadas na resposta inflamatória. As proteases correspondem a 20% do conteúdo dos grânulos dos mastócitos humanos. Após a degranulação, estes mediadores são depositados em grande quantidade no meio extracelular, onde exercem efeitos sobre as células endoteliais; participam das reações de hipersensibilidade e contribuem para o desenvolvimento e amplificação de respostas inflamatórias específicas e inespecíficas (Rodini et al., 2004).

Apesar de serem células diretamente ligadas a processos alérgicos, elas exercem grande influência sobre os fibroblastos, endoteliócitos e vasos sanguíneos (Puxeddu et al., 2003).

Quanto à sua distribuição, os mastócitos estão presentes na mucosa e no tecido conjuntivo, sendo que na mucosa bucal e na pele localizam-se próximos aos vasos sanguíneos. Definidas como células móveis são capazes de migrar entre os tecidos. Consequentemente, os mastócitos apresentam também o potencial de influenciar, através do conteúdo de seus grânulos, as células vizinhas, resultando em efeito inibitório, tóxico ou estimulador (Walsh et al., 1995).

Os mastócitos tem sido encontrados tanto nos tecidos gengivais saudáveis quanto nas áreas de inflamação (Walsh et al., 1995; Walsh, 2003; Batista et al., 2005). Sabe-se que este tipo celular apresenta importantes funções regulatórias e efectoras contra patógenos, sendo que estas variam de acordo com a heterogeneidade morfológica e funcional dos mastócitos. Uma vez liberados na circulação sanguínea, os precursores indiferenciados completam sua maturação e diferenciação no tecido para onde são recrutados, devido à influência de fatores ambientais, fatores de origem celular e citocinas. Uma vez diferenciados, os mastócitos distribuem-se por todo o tecido, localizando-se preferencialmente adjacentes aos vasos sanguíneos, aos vasos linfáticos e próximos ao epitélio. Em seu interior, apresentam-se grânulos citoplasmáticos ricos em mediadores químicos capazes de controlar ou exacerbar a lesão tecidual, a angiogênese, a fibrose, a inflamação e a resposta imunitária (Batista et al., 2005).

Quanto à localização, os mastócitos dos tecidos bucais humanos e de animais, apresentam algumas variações morfológicas. Nos tecidos bucais foram diferenciadas as populações de mastócitos de acordo com seus fenótipos, sendo identificado como fenótipo de tecido conjuntivo, quando seus grânulos apresentam as proteases quimase e triptase, ou fenótipo de mucosa, expressando apenas triptase (Walsh et al., 1995). Esta variação no conteúdo dos grânulos, foi responsável pelas variações na atuação dos mediadores dos mastócitos (maior ou menor intensidade), promovendo alterações teciduais.

Os mastócitos são capazes de influenciar nos acontecimentos mais importantes do processo de reparação: durante a resposta inflamatória, na revascularização do tecido lesionado, na reepitelização, na deposição de tecido de granulação e consequentemente na remodelação do tecido conjuntivo (Noli; Miolo, 2001).

São células que contribuem diretamente para a limpeza microbiológica da ferida, onde quaisquer componentes bacterianos podem desencadear seu mecanismo de degranulação. Os macrófagos, por sua vez, agem em resposta à estimulação dos mastócitos, trabalhando no processo de fagocitose. (Malaviya et al., 1996).

À medida que o processo inflamatório se desenvolve, um evento crucial é representado pelo recrutamento de leucócitos circulantes para a área da injúria,

juntamente com a população de macrófagos residentes, para executarem a fagocitose, uma específica função de defesa. O recrutamento de leucócitos, como os neutrófilos, é um fenômeno complexo, que vai desde o contato inicial entre o leucócito circulante e a parede do vaso, para sua migração, marginalização transendotelial por diapedese e seu grande afluxo para os tecidos. Tudo isso ocorre, pelo fenômeno da quimiotaxia no qual os mastócitos desempenham um papel direto, com a utilização de seus grânulos contendo mediadores específicos. As moléculas originadas pelos mastócitos, como TNF e histamina, favorecem a adesão dos leucócitos nos vasos, aumentando a expressão das moléculas de adesão endoteliais, selectina e integrina. (Walsh et al., 1991; Granger; Kubes, 1994).

Noli e Miolo (2001) analisaram a literatura através de uma vasta revisão de trabalhos, oferecendo uma visão geral do conhecimento sobre o envolvimento dos mastócitos no processo de reparação da pele. A maioria dos dados foi obtida a partir de estudos experimentais que utilizaram animais ou seres humanos, caracterizando-se como uma revisão do papel dos mastócitos na fisiopatologia da cicatrização da pele. Os trabalhos consideraram o envolvimento dos mastócitos nas diferentes fases da reparação e mostraram que com a ajuda de uma gama de mediadores degranulados, essas células podem controlar eventos importantes nas fases do reparo, como o início e a modulação da fase inflamatória e a proliferação de células, a fim de auxiliar na remodelação do tecido conjuntivo. A importância dos mastócitos em regular o processo de reparo foi também demonstrada pelo fato de que um excesso ou déficit de seus mediadores biológicos desgranulados, podem causar um prejuízo na reparação, com a formação de um tecido de granulação exuberante, como por exemplo, quelóides e cicatrizes hipertróficas, ou ainda, resultando no fechamento tardio da lesão.

A formação do tecido de granulação, que está presente na fase proliferativa do reparo, também sofre influência dos mastócitos, através de mediadores responsáveis por estimular o crescimento, migração e proliferação das células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e terminações nervosas. (Noli; Miolo, 2001).

Segundo Wilgus (2008), vários autores têm estudado os mastócitos durante a fase proliferativa da cicatrização, apresentando resultados inconsistentes, sugerindo

que a função dos mastócitos pode ser bastante complexa e que mais estudos devem ser feitos para esclarecer o papel dessas células na fase proliferativa da cicatrização.

Os mastócitos produzem diversos mediadores angiogênicos (proteases, FGF-2, VEGF, TNF-, IL-8, heparina e histamina). Muitos tipos celulares (células tumorais, macrófagos, linfócitos e mastócitos) estão relacionados à indução da angiogênese, sendo maior o enfoque sobre os mastócitos por se localizarem próximo aos pequenos vasos e apresentarem mediadores que influenciam a proliferação das células endoteliais (Pinheiro, 2006).

Resende e Mill (2002) estudaram as vias alternativas de produção da angiotensina II. Este peptídeo possui ação complementar ao clássico sistema renina-angiotensina-aldosterona. Estes sistemas renina-angiotensina locais exercem efeitos diretos sobre os mecanismos regulatórios locais, como o crescimento celular, formação da matriz dos tecidos, proliferação vascular, modulação da função do endotélio e controle do processo de apoptose. Observou-se que várias proteinases (tripsina, quimase) presentes nos tecidos são capazes de gerar angiotensina II, a partir da angiotensina I ou do próprio angiotensinogênio.

Dentre as proteinases, a quimase identificada nos mastócitos foi uma via alternativa de formação de angiotensina II nos vasos sanguíneos. Desta forma, a quimase presente nos grânulos dos mastócitos parece contribuir significativamente nos processos de proliferação vascular. Portanto, sugeriu-se que o aumento da atividade da quimase em determinados tecidos estaria associado à densidade local de mastócitos (Resende; Mill, 2002).

Ribatti et al. (2005) avaliaram a relação entre a densidade de mastócitos e a angiogênese em adenocarcinomas endometriais. Foram obtidas biópsias de 10 pacientes com hiperplasia endometrial e de 20 pacientes com adenocarcinoma. Estes tecidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica com anticorpos anti-triptase e anti-CD31. Os resultados mostraram maior densidade de mastócitos nos pacientes com adenocarcinoma, quando comparados aos pacientes com hiperplasia. A densidade de vasos foi maior também nos adenocarcinomas, quando comparados à hiperplasia. Estes resultados sugeriram que a angiogênese em adenocarcinomas estava correlacionada com uma maior densidade de mastócitos.

Tuna et al. (2006) investigaram a associação entre a densidade de mastócitos e a angiogênese, em carcinomas celulares renais. Nesse estudo, foram obtidas biópsias de 71 pacientes portadores de carcinoma renal para a realização dos estudos da densidade dos mastócitos (técnica imunoistoquímica e azul de toluidina) e da densidade dos vasos sanguíneos (técnica imunoistoquímica com anticorpo anti-CD31). Como controles, foram utilizadas biópsias de rins normais. Os resultados mostraram maior densidade de mastócitos no grupo com carcinoma, quando comparado ao grupo controle. Os mastócitos localizaram-se preferencialmente próximo à área tumoral e inflamatória peritumoral. Observou-se uma tendência no aumento da densidade dos mastócitos com a evolução tumoral e relação estatisticamente significativa entre a densidade dessas células e o subtipo histológico e a densidade dos vasos. Estes resultados sugeriram que os mastócitos teriam um importante papel na angiogênese tumoral.

Ribatti et al. (2007) relacionaram a angiogênese com a densidade de mastócitos em mioma uterino. Foram obtidas amostras de 14 pacientes com mioma, 10 pacientes com prolapso genital (controle) e 4 pacientes com cisto ovariano (controle). Os tecidos foram submetidos à técnica de imunofluorescência e imunoistoquímica. Os resultados mostraram maior densidade de mastócitos em miomas, quando comparados aos controles, e maior densidade de vasos em miomas em relação aos controles. As densidades de mastócitos foram significativamente maiores no grupo mioma em relação aos controles. Estes resultados sugeriram que a angiogênese em miomas uterinos está relacionada à maior densidade de mastócitos, mostrando uma forte relação entre a densidade dessas células e a neovascularização, sendo que a predominância dos mastócitos nos tecidos hiperplásicos indicaria, segundo (Ribatti et al., 2005), uma importante atuação na progressão dos eventos angiogênicos.

Os mastócitos também influenciam, diretamente na deposição de matriz e na produção de colágeno pelos fibroblastos, através da liberação de seus mediadores químicos, consideradas potentes armas biológicas, necessárias para estimular a quimiotaxia, migração, diferenciação e atividade de biossíntese dos fibroblastos. Os mastócitos são capazes de ativar os fibroblastos, promover a síntese de colágeno e a

ativação da gelatinase A, uma enzima envolvida na remodelação da matriz (Berton et al., 2000).

Há uma profunda sinergia entre esses dois tipos celulares, segundo (Vliagofts et al., 1999), pois além da quimiotaxia, os mastócitos podem influenciar os fibroblastos diretamente, por uma interconexão física, permitida através de junções entre as membranas dessas células.

Trautmann et al. (1998) avaliaram a influência dos mastócitos, através da Interleucina-4 (IL-4), na proliferação dos fibroblastos. Para o estudo foi feita cultura de mastócitos e de fibroblastos da pele de crianças e adultos. Foram determinadas a proliferação dos fibroblastos, a expressão do receptor de IL-4 nos fibroblastos e a liberação de IL-4 pelos mastócitos. Os resultados mostraram que os mastócitos da pele aumentaram significativamente a proliferação dos fibroblastos. Houve aumento significativo da proliferação dos fibroblastos quando incubados com IL-4, PDGF A/B e FGF-. Os resultados mostraram que a liberação da IL-4 pelos mastócitos foi induzida pelo contato dessas células com os fibroblastos. Todas as linhagens celulares de fibroblastos tiveram alta expressão do receptor para IL-4. Estes resultados sugeriram que os mastócitos influenciariam diversas funções dos fibroblastos, particularmente a proliferação e a produção de componentes da matriz extracelular, contribuindo para os eventos fibróticos.

Pinheiro (2006), citou possíveis mecanismos de ação dos mediadores produzidos pelos mastócitos na colagenização. A histamina possui um papel estimulador sobre o crescimento de fibroblastos e no aumento da síntese de colágeno in vitro e in vivo. Paralelamente, a heparina também influencia o crescimento dos fibroblastos e o aumento na síntese de colágeno. A triptase dos mastócitos induz a proliferação de fibroblastos in vitro, além de ser um fator fibrogênico capaz de estimular a síntese de RNA mensageiro e a quimiotaxia. Finalmente, os mastócitos podem atuar diretamente sobre a fibrose através da produção de glicoproteínas da matriz extracelular. A literatura sugeriu que os mastócitos poderiam regular a função e a expressão dos mediadores químicos, afetando os fibroblastos e os componentes da matriz extracelular e contribuindo para o desenvolvimento da fibrose (Duarte et al., 1999; Walsh, 2003).

Os mediadores dos mastócitos, mais especificamente os fatores de crescimento epitelial (EGF, TGF e NGF), influenciam no processo de reepitelização, através da influência direta sobre a migração e proliferação dos queratinócitos, resultando na neoformação das bordas da ferida, para formação de um novo epitélio (Gailit et al., 1994).

Estudos têm demonstrado que a diferenciação e a maturação dos mastócitos em nível de medula óssea hematopoiética, depende da sinalização de fatores de crescimento derivados de linfócitos T, como o TGF- β 1, e de outros fatores diretamente ligados ao microambiente medular, e que a liberação de prostaglandina D2, também é quimioatrativa para os mastócitos (Jamur; Oliver, 2011).

Há relatos de redução do número de mastócitos na pele a partir da administração tópica prolongada (acima de 3 meses) de corticoides (Lavker; Schechter, 1985). Uma vez que os corticoides inibem a síntese e a liberação de histamina, que boa parte dos grânulos dos mastócitos contêm histamina e que a visualização histoquímica ou por microscopia eletrônica de transmissão dessa célula é feita a partir da identificação desses grânulos, os autores inferiram que a diminuição foi atribuída a pouca visualização desses grânulos. Observaram existir algumas células próximas aos vasos sanguíneos similares a mastócitos degranulados, mas essas células desapareceram após 6 meses de aplicação tópica de corticoide.

Soda et al. (1991) demonstraram que injeção única de dexametasona (1 mg) acarretou significativa redução do número de mastócitos na mucosa intestinal de ratos previamente infectados com *Nippostrongylus brasiliensis*. Essa redução se iniciou a partir de 24h após a administração da dexametasona e foi observada também em animais que não foram infectados, mas receberam a injeção do mesmo corticoide. Foi observado também que os macrófagos realizaram fagocitose dessas células. Os autores concluíram que a dexametasona acarreta redução da população de mastócitos, independentemente da instalação de estímulos inflamatórios prévios.

DePaulis et al (1997) demonstrou a ação de vários anti-inflamatórios e imunossupressores sobre a liberação de histamina e de triptase pelos mastócitos sinoviais. Foram utilizados nimesulida, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, piroxicam, metotrexato, ciclosporina A e H, e FK-506 (um imunossupressor utilizado no controle da

artrite reumatoide). Os autores verificaram grande heterogeneidade de respostas do mastócitos a essas drogas. Os anti-inflamatórios não acarretaram inibição da liberação de histamina e de triptase, mas provocaram redução da liberação de prostaglandina D2 de maneira dose-dependente. Somente a nimesulida acarretou inibição de leucotrienos. Quanto aos imunossupressores, somente a ciclosporina A e FK-506 inibiram a liberação de mediadores químicos pelos mastócitos. Ainda, os mastócitos receberam estímulo imunológico (a partir de anti-IgE) e não imunológico (a partir da substância P), e as inibições foram mais acentuadas diante de estímulos imunológicos. Os autores concluíram que a ação de imunossupressores e de anti-inflamatórios sobre os mastócitos é diversa e complexa, sendo dependente da dose, do tipo de estímulo e do tipo de droga.

O efeito do diclofenaco sódico e da dexametasona sobre a população de mastócitos não foi muito abordado em estudos relacionados à reparação tecidual. Portanto, torna-se interessante verificar os efeitos desses anti-inflamatórios aplicados em dose única preemptiva, sobre a resposta inflamatória e no processo reparativo de feridas induzidas no ventre lingual de ratos, tendo como foco principal a população desse tipo celular.

Interessante também verificar, morfológicamente, se houve atraso ou não no processo de reparo dessas feridas quando da administração dessas drogas, por intermédio da análise quantitativa de reepitelização, formação de tecido de granulação e contração da ferida, bem como se houve aumento ou redução da quantidade de mastócitos em relação à população de leucócitos em quatro períodos experimentais que caracterizam as diferentes fases do reparo.

3 PROPOSIÇÃO

- Verificar se a dexametasona e o diclofenaco sódico interferem positiva ou negativamente no processo reparativo após trauma cirúrgico.
- Verificar se há interferência desses fármacos sobre a população de mastócitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), tendo como número de protocolo registrado 048, na folha 86 do livro 02 (Anexo A).

Foram utilizadas 60 ratas Wistar, provenientes do Biotério de Fisiologia do ICB-USP, pesando entre 200 e 270 gramas e com aproximadamente 12 semanas, mantidas em grupos de 5 animais, em gaiolas grandes com maravalha de pinus, no Biotério do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP). Alimentadas com ração balanceada granulada (Purina) e água ad libitum, 15 dias antes e durante o experimento, permaneceram em condições controladas de iluminação (ciclos de claro e escuro alternados à cada 12 horas), aclimatadas à uma temperatura de 20-25°C e com ventilação artificial filtrada individual para cada gaiola.

Os animais foram divididos randomicamente em 3 grupos de 20 indivíduos cada, da seguinte forma:

Grupo 1: medicados com injeção intramuscular de 0,235mg/kg de dexametasona (2mg/ml) 30 minutos antes da intervenção cirúrgica.

Grupo 2: medicados com injeção intramuscular de 4,45mg/kg de diclofenaco sódico (25mg/ml) 30 minutos antes da intervenção cirúrgica.

Grupo 3: controle, com injeção intramuscular de solução salina estéril.

O volume injetado foi equalizado com soro fisiológico para que todos os animais recebessem a mesma quantidade. A dose dos anti-inflamatórios foi calculada através

do Cálculo de Dosagem por Taxa Metabólica do Animal também conhecido como Sistema Alométrico. O princípio alométrico usa uma escala de parâmetros fisiológicos comparando animais de vários tamanhos, sendo esta mesma escala usada para parâmetros farmacocinéticos. A absorção, distribuição e eliminação das drogas administradas aos animais envolvem processos fisiológicos, compatíveis com a escala alométrica. A alometria permite calcular, por extrapolação, as necessidades energéticas e a variação da atuação das drogas no organismo, bem como a frequência de administração dos medicamentos.

Para o cálculo da dose dos medicamentos, são necessárias algumas medidas:

- O Peso metabólico, que é o peso total do animal expresso em quilogramas (Kg).
- A Taxa metabólica basal (TMB), expressa em quilocalorias (Kcal) , que é o peso metabólico elevado a 0,75 e multiplicado por uma constante, que difere para cada espécie animal (70 para os ratos).
- Taxa metabólica específica (TME), que é o peso metabólico elevado a - 0,25 e multiplicado pela mesma constante da TMB. É expresso em quilocalorias/Kg/dia. Indica a energia mínima produzida por um animal num dia para cada quilograma de seu peso.

A média de peso dos animais estava em 250g:

- Peso Metabólico (PM) = 0,250Kg
- Taxa Metabólica Basal (TMB) = 25Kcal
- Taxa Metabólica Específica (TME) = 99Kcal/Kg/dia

Para o cálculo da dose, a dosagem para humanos foi utilizada como parâmetro comparativo, com 4mg de dexametasona para 70Kg e 75mg de diclofenaco sódico para 70 Kg.

- Cálculo para o diclofenaco sódico:

a- Fator dose (humano) = $1,07 \text{ mg/Kg do medicamento} / 24 \text{ TME (humano)} = 0,045$

b- Dose para o rato = $99 \text{ TME (rato)} \times 0,045 \text{ Fator dose (humano)} = 4,45 \text{ mg/Kg}$
para ratos com 250g = 1,1mg de diclofenaco sódico

- Cálculo para a dexametasona:

a- Fator dose (humano) = $0,057 \text{ mg/Kg do medicamento} / 24 \text{ TME (humano)} = 0,002375$

b- Dose para o rato = $99 \text{ TME (rato)} \times 0,002375 \text{ Fator dose (humano)} = 0,235 \text{ mg/Kg}$
para ratos com 250g = 0,058mg de dexametasona

Os grupos foram subdivididos em 4 subgrupos (a,b,c,d) com 5 animais cada, de acordo com o tempo de sacrifício demonstrado no quadro abaixo:

SUBGRUPOS	TEMPO DE SACRIFÍCIO
a	Após 6 horas
b	Após 24 horas
c	Após 48 horas
d	Após 120 horas

Quadro 4.1 – Subdivisão dos grupos de acordo com o tempo de sacrifício

O sacrifício dos animais foi realizado com sobredosagem anestésica seguida de deslocamento cervical.

4.2 Materiais

1. Biossegurança: luvas de procedimento; luvas cirúrgicas estéreis; óculos de proteção; touca e máscara descartáveis; papel branco descartável para forramento da bancada; campos cirúrgicos estéreis e aventais descartáveis.
2. Pesagem e individualização dos animais: balança digital e tesoura cirúrgica reta.
3. Procedimento cirúrgico (fase1):, seringas hipodérmicas para insulina BD ultra-fineTM II de 1ml (5/16”) e calibre 30G (0,3mm); fio de nylon agulhado para sutura 4.0; punch de 3 milímetros de diâmetro; anéis elásticos para stop do Punch; gaze; tesoura cirúrgica fina e curva; cronômetro; máquina fotográfica digital reflex α 200 Sony e tripé para máquina fotográfica.
4. Assepsia, anestesia geral e medicação: clorexidina à 0,12%; Cloridrato de Ketamina - Dopalen[®] injetável – Sespo, divisão Vetbrands; Cloridrato de Xilasina - Anasedan[®] injetável - Sespo, divisão Vetbrands; Diclofenaco Sódico (Voltaren[®]) Solução injetável 25mg/ml - Laboratório Novartis; Dexametasona (Decadron[®]) Solução injetável 2mg/ml - Laboratório Aché.
5. Fixação: Vidros de boca larga para coleta do material; Formaldeído a 4% em tampão Fosfato 0,1M pH 7,4.
6. Preparo e análise do material: Micrótomo – Reichert-Jung 820; Microscópio óptico OLYMPUS BX60; Ocular Integradora / Objetiva tipo Merz (Integrationsplatte I) – KPL 8X - made in Germany, com 25 pontos; Software de morfometria digital ImageLab 2000[®] e demais equipamentos para preparo do material de análise, no laboratório de Patologia Geral da FOUSP.

4.3 Métodos

4.3.1 Indução da lesão

Inicialmente os animais foram pesados e identificamos por pequenas marcas nas orelhas. Foi injetado 0,235mg/kg de dexametasona (2mg/ml); 4,45mg/kg de diclofenaco sódico (25mg/ml) ou soro fisiológico de acordo com o respectivo grupo, 30 minutos antes da cirurgia, através da administração na musculatura interna da coxa. (figura 4.1)

Figura 4.1 - Administração do fármaco ou soro na musculatura interna da coxa

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal de 0,1ml/100g de peso corporal, com o anestésico geral cloridrato de Ketamina (1,16g/10ml de solução) associado à 0,01ml/100g de peso corporal do sedativo/relaxante muscular cloridrato de xilazina 0,23g/10ml.

Os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre a bancada forrada com papel branco descartável, cobertos com campo cirúrgico mantendo apenas a cabeça para fora do campo cirúrgico. A língua foi tracionada cuidadosamente, passado um fio de sutura no seu ápice para manipulá-la com o mínimo de pressão e trauma.

Com uma haste flexível foi realizada a antissepsia com clorexidina à 0,12%. Apoiando o dorso da língua sobre a polpa do dedo do cirurgião, uma lesão circular no ventre lingual foi realizada utilizando punch de 3mm de diâmetro com profundidade

padronizada, através da colocação de anéis elásticos a 1mm da ponta ativa do instrumento de corte. (figuras 4.2 e 4.3)

Figuras 4.2 e 4.3 - Antissepsia com clorexidina à 0,12% e ato da intervenção cirúrgica com anel elástico limitador

A base do tecido cortado com o punch foi removida com o auxílio de uma tesoura cirúrgica, para que a lesão ficasse regular, com a mesma profundidade em toda sua extensão (figuras 4.4 e 4.5).

Figuras 4.4 e 4.5 - Remoção do fragmento incisionado e aspecto imediato da lesão após a cirurgia

Após a captação padronizada da imagem da ferida cirúrgica, realizada com máquina digital profissional reflex, à uma distância de 40mm e com iluminação local, o fio de sutura foi removido e os animais devolvidos às respectivas gaiolas. Todos ficaram

em observação até o retorno da consciência para que pudessem assim voltar à estante do biotério. Após o prazo estabelecido para cada grupo, os animais foram pesados novamente, anestesiados e acondicionados na bancada da mesma forma descrita quando da realização da ferida cirúrgica. Após nova captação de imagem da região operada, foi realizada a extirpação da língua e o sacrifício dos animais.

4.3.2 Fixação e lavagem das peças

A extirpação da língua foi realizada de forma padronizada, com margem posterior à lesão de aproximadamente 3mm, cortadas sagitalmente, dividindo de forma simétrica a lesão. As peças foram fixadas em um preparado de Formaldeído a 4% em tampão Fosfato 0,1M pH 7,4 por 24h. Após esse período foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos cada, com as soluções fosfato que foram utilizadas como solução tampão no preparo do formaldeído a 4%. Após estes três banhos, os fragmentos foram submetidos à um processos de desidratação, onde cada peça foi mergulhada por 10 minutos em álcool 30%; 10 minutos em álcool 50% e por fim em álcool 70%, no qual permaneceram em média 20 minutos até o início do processamento histológico.

4.3.3 Processamento histológico

Todos os fragmentos foram enviados para processamento histológico até a inclusão em parafina para o Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Estomatologia da FO-USP. Os blocos de parafina foram montados de modo que a ferida cirúrgica fosse cortada paralelamente ao corte sagital da língua. Utilizando o Micrótomo – Reichert-Jung 820, foram obtidos seis cortes histológicos semiseriados de 3 µm de espessura de cada espécime, com intervalo entre eles de 10µm, totalizando doze cortes por lesão inteira. Desse total, 6 cortes foram direcionados para coloração

em hematoxilina-eosina (HE) e 6 para coloração em Azul de Toluidina para evidenciação de mastócitos. De cada subgrupo de 5 animais, foram obtidos 60 cortes, 30 para cada coloração.

4.3.4 Análise histológica

As características do processo reparativo foram descritas por meio de avaliação qualitativa dos seguintes componentes: extensão de áreas necróticas; intensidade de edema intersticial; tipo e intensidade do infiltrado inflamatório; grau de reepitelização; grau do tecido de granulação e grau de neovascularização. Essas características foram analisadas nos cortes corados em HE e tabuladas por meio de graduação semiquantitativa de acordo com a frequência do elemento tecidual no campo histológico. Essa gradação consiste em: 0 – ausência total do elemento; 1 – até 25% de presença do elemento analisado; 2 – de 25% a 50% de presença no campo; 3 – de 50% a 75% de presença; 4 – mais de 75% de presença no campo histológico.

4.3.5 Análise clínica do processo de reparo e morfometria

As imagens das lesões foram digitalizadas com máquina digital reflex profissional, como citado anteriormente, logo após a cirurgia e no momento de sacrifício dos animais, com distância focal de 40mm e resoluções horizontal e vertical padronizadas em 72dpi. As imagens foram transferidas para um software de morfometria digital (ImageLab[®] 2000), do Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (LIDO), no departamento de Estomatologia da FO-USP. Os valores de área da lesão inicial (0h) e final (6h, 24h, 48h e 120h) (em mm²) foram determinados a partir da delimitação manual das bordas do ferimento.

Para fins de cálculo individualizado, foi calculada a porcentagem equivalente entre os valores iniciais e finais para cada animal. Todo o procedimento foi realizado de forma cega, por um único operador previamente calibrado sem conhecimento dos grupos e períodos experimentais (análise cega).

4.3.6 Análise Morfométrica

Campos dos cortes histológicos obtidos foram digitalizados por meio de máquina digital acoplada em microscópio de luz convencional e analisados morfometricamente pelo software de morfometria digital ImageLab 2000[®]. O número de campos foi estabelecido posteriormente à obtenção da amostra total, no sentido de minimizar o erro-padrão.

Para mensuração indireta da reepitelização, foi medida em μm a distância entre as bordas da lesão utilizando aumento de 40X. Para mensurações do tecido de granulação (em μm^2), o mesmo aumento foi utilizado e esse tecido delimitado manualmente, sendo calculada sua área pelo software. Celularidade e matriz fibrosa foram mensurados em aumento de 400X, utilizando segmentação de imagem e subtração RGB, método pelo qual são reconhecidas porcentagens dos tons azuis (que identificam os núcleos das células) e róseos (que identificam as fibras da matriz). O edema foi avaliado também em um aumento de 400x, com a mensuração dos espaços brancos, que podem ser interpretados como edema nas primeiras horas.

Para a contagem do número de mastócitos, dividimos cada fragmento de todos os grupos e subgrupos em 12 campos, logo abaixo do epitélio, sendo 4 voltados para o ápice da língua, 4 ao centro (praticamente respectivos à área da lesão), e 4 voltados para a base da língua. Observamos esses campos em microscópio de luz, em aumento de 40x, e contamos todos os mastócitos de cada campo, somando-os e obtendo-se assim o número total de células para cada fragmento.

4.3.7 Análise Estatística

Foi realizada estatística descritiva com base na média e desvio-padrão, bem como mediana e valores mínimo e máximo. Para análise da variação entre os grupos concomitantemente, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. A comparação entre os grupos dois a dois foi realizada a partir do teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica semiquantitativa

A tabela 5.1 mostra os valores da mediana da gradação atribuída à necrose para cada grupo e período experimental. Nota-se que o grupo da dexametasona exibiu gradação de necrose significativamente menor em 6h em comparação aos outros dois grupos e significativamente maior em 120h.

Tabela 5.1 – Gradação de necrose (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental

Grupo	Controle			Diclofenaco			Dexametasona		
Período	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx
6h	1	0	1	1	1	1	0 ^{a,b}	0	0
24h	1.5	1	2	1	1	1	1	1	2
48h	1	1	2	1	1	1	1	1	3
120h	1	0	1	0.5	0	2	2 ^{a,b}	1	3

Teste de Mann-Whitney. $P < 0.05$

a = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

b = diferença estatisticamente significativa em relação ao diclofenaco.

Na tabela 5.2 tem-se a gradação de edema atribuída aos grupos e períodos experimentais. Observa-se que somente em 6h houve diferenças significantes, com o diclofenaco exibindo valores menores em relação ao controle e a dexametasona (Figura 5.1).

Tabela 5.2 – Gradação de edema (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental

Grupo	Controle			Diclofenaco			Dexametasona		
Período	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx
6h	3 ^b	1	3	1	1	2	3 ^b	2	3
24h	2	2	3	2	1	2	2	2	2
48h	2	1	2	1	1	3	2	2	3
120h	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Teste de Mann-Whitney. $P < 0.05$

b = diferença estatisticamente significativa em relação ao diclofenaco.

A gradação do infiltrado inflamatório para cada grupo e período experimental encontra-se na Tabela 5.3. Nota-se que em 6h e 24h, os grupos diclofenaco e dexametasona exibiram valores menores significativamente em relação ao controle. A partir de 48h, a dexametasona aproxima seu valor do controle e ambos são significativamente maiores do que o diclofenaco. Em 120h, somente a dexametasona ainda exibe infiltrado inflamatório moderado (Figuras 5.1 a 5.4).

Tabela 5.3 – Gradação de infiltrado inflamatório (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental

Grupo	Controle			Diclofenaco			Dexametasona		
Período	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx
6h	3	2	3	2 ^a	2	2	1 ^{a,b}	1	1
24h	4	3	4	2.5 ^a	2	4	2 ^a	2	3
48h	3 ^b	2	4	2	2	4	3 ^b	2	4
120h	1	1	1	1	0	2	2 ^{a,b}	1	3

Teste de Mann-Whitney. $P < 0.05$

a = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

b = diferença estatisticamente significativa em relação ao diclofenaco.

Na Tabela 5.4 tem-se a gradação para reepitelização nos diferentes períodos e grupos experimentais. Houve diferenças significativas nos períodos de 48h ($p=0,0159$) e 120h ($p=0,0137$), quando o grupo da dexametasona exibiu intensidade de reepitelização significativamente menor do que o diclofenaco e o controle. Essa tendência foi confirmada indiretamente pela histomorfometria das bordas da ferida (vide Tabela 5.6).

Tabela 5.4 – Gradação de reepitelização (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental

Grupo	Controle			Diclofenaco			Dexametasona		
Período	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx
6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24h	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48h	2	1	2	2	2	2	1 ^{a,b}	1	2
120h	4	3	4	4	2	4	2 ^{a,b}	1	4

Teste de Mann-Whitney. $P<0.05$

a = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

b = diferença estatisticamente significativa em relação ao diclofenaco.

A intensidade de neovascularização encontra-se na Tabela 5.5. Houve diferenças significativas entre os grupos nos períodos de 48h e 120h. O grupo da dexametasona exibiu mediana da intensidade de neovascularização significativamente menor nesses períodos em relação ao controle e o diclofenaco.

Tabela 5.5 – Gradação de tecido de neovascularização (mediana, valor mínimo e máximo) atribuída para cada período experimental

Grupo	Controle			Diclofenaco			Dexametasona		
Períodos	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx	Med	Mín	Máx
6h	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24h	1	1	1	1	1	2	1	0	2
48h	2	2	2	2	2	3	1 ^{a,b}	1	2
120h	4	4	4	3,5	3	4	3 ^{a,b}	2	3

Teste de Mann-Whitney. $P < 0.05$

a = diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

b = diferença estatisticamente significativa em relação ao diclofenaco.

5.2 Análise histomorfométrica

O Gráfico 5.1 exibe as curvas da média de porcentagem de espaço branco (que pode ser interpretado como edema nas primeiras horas) em cada grupo e período experimental. Em 6h, houve diferenças significantes entre os três grupos ($p=0.0041$), com o diclofenaco exibindo valores significativamente menores do que controle ($p=0.0038$) e a dexametasona ($p=0.0047$). A dexametasona não exibiu diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle nesse período ($p=0,8924$). Em 24h, essa tendência permaneceu, havendo novamente diferenças significantes entre o diclofenaco e o controle ($p=0.0215$), bem como entre o diclofenaco e a dexametasona ($p=0.0425$).

Valor de p pelo teste de Kruskal-Wallis. $p<0.05$.

Gráfico 5.1 – Média da porcentagem de espaço branco (edema) para cada grupo e período experimental

O Gráfico 5.2 mostra a curva da porcentagem de celularidade (equivalente a infiltrado inflamatório) para cada grupo nos períodos de 6h e 24h. Nos dois períodos, houve diferenças estatisticamente significantes ao se compararem os três grupos concomitantemente. Em 6h, o grupo da dexametasona exibiu valores significativamente menores do que o grupo controle ($p<0.0001$) e o diclofenaco ($p<0.0001$). Nesse período, não houve diferenças estatisticamente significantes entre o controle e o diclofenaco. Em 24h, o grupo da dexametasona exibiu valores maiores do que o diclofenaco ($p=0.0007$) e menores do que o controle ($p=0.0090$). Nesse período, o grupo controle ainda exibiu valores significativamente maiores do que o diclofenaco ($p<0.0001$).

Valor de p pelo teste de Kruskal-Wallis. $p<0.05$.

Gráfico 5.2 - Média da porcentagem de celularidade (equivalente a infiltrado inflamatório) para cada grupo nos períodos de 6h e 24h

A Tabela 5.6 contém a média da distância entre as bordas da lesão medida no corte histológico. Para os períodos de 6h e 24h, não houve diferenças significantes entre os três grupos, com a distância entre as bordas variando de 1,72mm a 1,89mm. Em 48h, pela análise de variância comparando-se os três grupos concomitantemente, houve diferenças significantes ($p=0,0385$), em que o grupo controle exibiu valores de distância entre as bordas significativamente menores quando comparado ao grupo do diclofenaco ($p=0.0231$) e dexametasona ($p=0.0366$). Em 120h, já observamos a reepitelização completa em alguns casos, com o grupo dexametasona apresentando menor porcentagem de casos, 20% apenas, o grupo controle com 40% e o grupo diclofenaco sódico, que apresentou a maior porcentagem de reepitelização completa com 45% dos casos (Figura 5.4).

Tabela 5.6 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da distância entre as bordas da ferida (mm) medida no corte histológico, segundo os grupos e períodos experimentais

Período experimental	Grupos			Valor de p
	Controle	Diclofenaco	Dexametasona	
6h	1.87 $\pm$ 0.21	1.72 $\pm$ 0.33	1.78 $\pm$ 0.25	0.1467
24h	1.82 $\pm$ 0.18	1.73 $\pm$ 0.30	1.89 $\pm$ 0.28	0.2473
48h	1.70 $\pm$ 0.32	1.96 $\pm$ 0.35 ^a	1.91 $\pm$ 0.23 ^a	0.0385

Valor de p pelo teste de Kruskal-Wallis. a = pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. $p<0.05$.

No gráfico 5.3 tem-se a distribuição dos valores médios de área de tecido de granulação nos períodos de 48h e 120h. Não houve diferenças entre os grupos pela análise conjunta em ambos os períodos ($p=0.1120$ para 48h e $p=0.0915$ para 120h) (Figuras 5.3 e 5.4). Em todos os grupos houve uma redução da média da área de tecido de granulação em 120h, com valores ligeiramente maiores para o grupo da dexametasona.

Valor de p pelo teste de Kruskal-Wallis. $p < 0.05$.

Gráfico 5.3 - Média da área (em μm) de tecido de granulação para cada grupo nos períodos de 48h e 120h

O Gráfico 5.4 mostra a média da porcentagem da área de lesão para cada grupo e período experimental. Houve variações significantes entre os três grupos nos períodos de 6h ($p=0.0305$) e 120h ($p=0.0060$). No período de 6h, o grupo da dexametasona exibiu valores de área menores em comparação aos demais grupos, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p=0.0163$). A mesma tendência se observa em 24h para todos os grupos, porém sem significância estatística. Em 48h, as áreas lesionais se equivalem nos três grupos, mas em 120h há discrepâncias grandes, com o grupo da dexametasona exibindo valores maiores e o diclofenaco, valores menores. Houve diferenças estatisticamente significantes nesse período do diclofenaco com o grupo controle ($p=0.0090$) e o grupo dexametasona ($p=0.0090$).

Valor de p pelo teste de Kruskal-Wallis. $p<0.05$.

Gráfico 5.4 – Média ($\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de área da lesão na língua segundo o grupo e o período experimental

A tabela 5.7 contém a quantidade de mastócitos em relação aos diferentes grupos. Para o período de 6h, não houve diferenças significantes entre os três grupos, com o nº de mastócitos variando de 51,2 células à 60,3 células nos campos previamente padronizados. Em 24h, comparando-se os três grupos concomitantemente, o grupo controle exibiu valores de nº de mastócitos significativamente maiores quando comparado aos grupos do diclofenaco ($p<0,0001$) e dexametasona ($p<0,0001$) (Figuras 5.5 e 5.6). O mesmo ocorreu no período de 48h, onde o nº de mastócitos no grupo controle permaneceu significativamente maior em relação aos outros dois grupos, diclofenaco ($p=0,009$) e dexametasona ($p=0,0005$). Já em 120h obtivemos diferenças significativas entre os três grupos ($p<0,0001$), o grupo controle apresentando maior nº de mastócitos quando comparado aos dois outros grupos ($p<0,0001$) e o grupo da dexametasona com um nº significativamente menor de mastócitos ($p<0,0001$) também quando comparado ao grupo do diclofenaco sódico.

Tabela 5.7 – Contagem dos mastócitos no corte histológico, segundo os grupos e períodos experimentais

Período experimental	Grupos			Valor de p
	Controle	Diclofenaco	Dexametasona	
6h	51,2	57,6	60,3	0,1447
24h	80	33,1 ^a	36,9 ^a	<0,0001
48h	69,4	56,1 ^a	51,8 ^a	0,0009
120h	58,4	25,6 ^a	15,8 ^{a,b}	<0,0001

Valor de p pelo teste de Kruskal-Wallis. a = pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. b = pelo teste de Mann-Whitney, diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo diclofenaco. p<0.05.

Figura 5.1 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 6h (HE, 100X). Nota-se perda da continuidade epitelial e de parte da lâmina própria, bem como necrose superficial e intenso infiltrado inflamatório, principalmente no grupo controle. O grupo do diclofenaco exhibe menor edema em comparação aos demais grupos

Figura 5.2 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 24h (HE, 100X). Nota-se início de migração epitelial e intenso infiltrado inflamatório estendendo-se até a submucosa. O grupo do diclofenaco exibe intensidade ligeiramente menor de inflamação em relação aos demais grupos

Figura 5.3 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 48h (HE, 100X). Somente no grupo do diclofenaco é evidente a formação de tecido de granulação em relação aos demais grupos. O grupo controle exibe matriz extracelular delicada, com significativa redução do infiltrado inflamatório e início da angiogênese. Já o grupo da dexametasona exibe ainda padrão inflamatório intenso, com edema e necrose superficial ainda marcantes

Figura 5.4 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 120h (HE, 100X). Nota-se reepitelização bem avançada no grupo controle, completa no grupo diclofenaco e discreta no grupo da dexametasona. O tecido de granulação no grupo do diclofenaco encontra-se bem organizado, enquanto no grupo da dexametasona ainda não se observa um padrão típico desse tecido

Figura 5.5 - Cortes histológicos representativos da ferida no ventre lingual de ratos no período de 24h, com coloração para evidênciação de mastócitos (Azul de toluidina, 100X). Nota-se grande quantidade de mastócitos (setas) no grupo controle em relação ao diclofenaco e a dexametasona. No grupo controle essas células parecem infiltrar mais intensivamente no local da ferida do que nos demais grupos

Figura 5.6 – Detalhe dos mastócitos, os quais exibem metacromasia e granulação intensa no citoplasma (Azul de toluidina, 400X)

6 DISCUSSÃO

Analisamos vários fatores relacionados ao processo inflamatório e reparativo, portanto para facilidade de interpretação, os discutiremos por tópicos.

6.1 Necrose

A necrose é um processo patológico, causado por fatores que levam à lesão celular irreversível e consequente morte celular. Quanto menor o grau de necrose, melhor e mais rápido será o processo reparativo do tecido lesado. Em nosso estudo, procuramos dentre outros fatores, verificar o grau de necrose após a lesão, comparando os grupos que foram medicados com anti-inflamatórios ao grupo controle. Verificamos na análise semiquantitativa que a dexametasona foi o grupo que exibiu menor gradação de necrose, no período de 6 horas, quando comparada aos outros dois (tabela 5.1). Essa gradação significativamente menor da necrose nas primeiras horas é benéfico no controle inicial da reparação, para minimizar as chances da instalação de infecção secundária no tecido em reparação. Porém, houve um aumento na gradação de necrose para esse mesmo grupo no período de 120 horas. Essa permanência tardia de necrose na área à ser reparada atrasa o processo de reparo e leva à formação de tecido cicatricial.

O aumento dessa necrose pode estar relacionado à um aumento na permanência de macrófagos e tecido de granulação na área da lesão, e o grupo da dexametasona ainda exibia certo grau de tecido de granulação em 120h. De acordo com Cotran et al. (2006) , os macrófagos produzem Óxido Nítrico, que apresenta propriedades vasodilatadoras e microbicidas, e na forma de radicais livres, podem causar danos às células, aumentando o grau de necrose e a reação inflamatória. O diclofenaco, assim como outros AINEs, além de diminuir as citocinas pró-inflamatórias, é capaz de reduzir a síntese de óxido nítrico (Goodman e Gilman 2007).

6.2 Edema

O edema é caracterizado por um excesso de líquido no interstício. Quando temos uma vasodilatação e um consequente aumento do fluxo sanguíneo, como o que ocorre em uma inflamação aguda, há um aumento da pressão hidrostática. Na inflamação aguda, concomitantemente à vasodilatação, temos o aumento da permeabilidade vascular, que causa exsudação de líquido rico em proteínas culminando na diminuição da pressão osmótica do plasma. A soma do aumento da pressão hidrostática com a diminuição da pressão osmótica acaba resultando em uma maior saída de líquido dos vasos para o interstício formando o edema (Cotran et al., 2006).

O diclofenaco apresentou na análise semiquantitativa, valores menores da gradação de edema no período de 6 horas, quando comparado ao grupo da dexametasona e ao grupo controle (Tabela 5.2). Esses resultados corroboram com os resultados de Uslu et al. (2010), que verificaram redução do edema após 4 horas da administração de 25mg/Kg de diclofenaco sódico via intraperitoneal.

Em função de um controle mais eficaz do edema, o diclofenaco proporcionou também melhor controle celular, com maior contração desse tecido em reparação e consequentemente resultou em um melhor efeito sobre o fechamento dessa ferida (Gráfico 5.4).

Isso mostrou-se verdade também na análise histomorfométrica (Gráfico 5.1). Após 6 horas do trauma cirúrgico, o tecido lesionado do grupo de animais tratados com diclofenaco sódico apresentava significativamente menos edema quando comparado aos dois outros grupos. Essa situação permaneceu ainda nas próximas 24 horas. Em 48h, como a análise semiquantitativa não demonstrou diferenças entre os grupos, não foi realizada a análise histomorfométrica.

Em nossos resultados, não observamos diferenças estatisticamente significantes na redução de edema intersticial ao se comparar o grupo da dexametasona e o grupo controle, porém a literatura é vasta em afirmar esta redução. Podemos atribuir o nossos achados ao fato de a dose dos medicamentos por nós empregada (0,235mg/Kg que equivale à dose de 4mg para humanos), ser menor do que a administrada nos

demais estudos para humanos; Kara e Gokalan (1999) com 10mg , Grossi et al. (2007) com doses de 4 e 8mg e Simone (2009) com 8mg. Aliado ao fato da dose ser menor, a metodologia empregada neste estudo é mais objetiva, favorecendo a quantificação através de métodos mais precisos, diferentemente da metodologia empregada nos demais trabalhos, que utilizaram análises subjetivas realizadas a partir da observação visual.

6.2 Infiltrado inflamatório

Os grupos dexametasona e diclofenaco, nos períodos 6 e 24 horas, apresentaram menor infiltrado inflamatório na análise semiquantitativa, quando comparados ao controle (Tabela 5.3), fato esperado em função do mecanismo de ação e farmacocinética dos anti-inflamatórios utilizados (Rang et al., 2001; Goodman e Gilman, 2007; Yagiela et al., 2011) e confirmados pelos estudos realizados por Nguyen et al. (1998), Durmus et al. (2003), Tenius et al. (2007) e Reis et al. (2008).

Observamos porém, um aumento do infiltrado inflamatório após 48 horas no grupo da dexametasona. No estudo de Nguyen et al. (1998), a dexametasona, quando comparada com a betametasona, mostrou menor duração de ação, quando administradas em dose única, com diminuição do infiltrado inflamatório de 57% em 24 h após a cirurgia e apenas 10% de redução desse infiltrado em 72 e 120 horas. Esses autores utilizaram uma dose bem aproximada à do nosso estudo e a intervenção cirúrgica também não foi muito invasiva. Esses achados provavelmente se deram, pelo fato de termos administrado dose única desse fármaco, que tem meia-vida tecidual de aproximadamente dois dias, com 65% desse fármaco excretado pela urina dentro de 24 horas (Goodman e Gilman, 2007). Isso se comprova quando essa mesma droga é utilizada de maneira crônica, como no estudo de Tenius et al. (2007), onde a redução do infiltrado inflamatório permaneceu até o 7º dia pós cirúrgico.

Em 120 horas, graduamos um infiltrado inflamatório moderado, persistindo na área lesionada, nos animais tratados com a dexametasona. Isso pode estar diretamente

relacionado ao atraso na reparação do tecido nesse grupo, influenciado diretamente ao maior grau de necrose apresentado (Tabela 5.1). Durmus et al. (2003) também observaram maior infiltrado inflamatório no grupo de ratos tratados com 1mg/Kg de dexametasona quando comparado ao grupo controle, porém um pouco mais tardiamente, através de análise realizada após 14 dias da indução da lesão.

Já na análise histomorfométrica (Gráfico 5.2), para os períodos de 6 e 24 horas, encontramos diferenças ao compararmos os três grupos em relação à celularidade (que equivale à infiltrado inflamatório). No tempo de 6h, o grupo da dexametasona apresentou maior redução da celularidade quando comparado aos outros dois grupos, que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si nesse período. Isso pode ter ocorrido, pois após administração de dose única de glicocorticóides, há uma redução significativa no número de linfócitos (70%) e monócitos (90%) entre 4 e 6 horas, retornando à níveis normais dentro de 24 horas (Goodman e Gilman, 2007). Esse fato também foi verificado em nosso estudo, já que nesse período de 24 horas, o grupo da dexametasona exibiu valores maiores do que o diclofenaco e menores do que o controle. A diminuição do número de linfócitos, monócitos e eosinófilos no local da lesão, após administração de dexametasona, talvez possa ser explicado pela redistribuição das células, e não da sua destruição (Goodman e Gilman, 2007). No caso do diclofenaco, assim como outros AINEs, não há redução no acúmulo de células inflamatórias locais, mas sim a modulação da inflamação através do seu mecanismo de ação, que consequentemente irá influenciar na quimiotaxia e na migração de células inflamatórias para o local, logo após a lesão (Rang et al., 2001). Alguns autores mostraram que o diclofenaco apresenta meia-vida de 6 horas em tecidos inflamados, bem acima da meia-vida encontrada em tecidos sadios (2 horas), e que após um período de 24 horas ainda pode ser encontrado nos tecidos lesionados que estão em processo inflamatório (Schweitzer et al., 2009). Nesse período de 24 horas, o grupo controle do nosso estudo ainda exibiu valores significativamente maiores de infiltrado inflamatório do que o diclofenaco.

6.4 Reepitelização e bordas

O grupo da dexametasona exibiu intensidade de reepitelização significativamente menor do que o diclofenaco e o controle nos períodos de 48h e 120h (Tabela 5.4). Essa tendência foi confirmada indiretamente pela histomorfometria das bordas da ferida, em que após 48h, o grupo controle exibiu valores de distância entre as bordas significativamente menores quando comparado ao grupo do diclofenaco e dexametasona (Tabela 5.6). A menor quantidade de tecido de granulação observada nos grupos dos anti-inflamatórios em 48h (Gráfico 5.3), explica parcialmente esse atraso na reepitelização, já que é fundamental o tecido de granulação para a multiplicação, diferenciação e migração de queratinócitos durante o processo de reparo. Nós percebemos esse atraso na reparação mais evidente no grupo da dexametasona, após dose única desse fármaco, assim como Durmus et al., 2003, que também verificou menor índice de reepitelização após dose única de 1mg/kg de dexametasona na reparação de feridas em dorso de ratos, quando comparadas ao grupo controle. Porém, outros autores afirmam que o atraso e a influência negativa da dexametasona sobre o processo de reparo estão ligados ao uso crônico desse fármaco e não à dose única (Gupta et al., 1999; Talas et al., 2002), influenciando negativamente também na reepitelização.

6.5 Neovascularização

Quanto à intensidade de neovascularização no presente estudo, houve diferenças significativas entre os grupos nos períodos de 48h e 120h (Tabela 5.5). O grupo da dexametasona exibiu mediana da intensidade de neovascularização significativamente menor nesses períodos em relação ao controle e ao diclofenaco. A menor vascularização observada no grupo da dexametasona pode estar atrelada a menor formação de tecido de granulação em 48h, como será discutido mais adiante.

Um atraso na formação do tecido de granulação e o menor remodelamento da ferida, provavelmente levaram à essa vascularização mais tardia, no caso do grupo medicado com a dexametasona.

Em nosso estudo, esse grupo também apresentou menor quantidade, porém sem significância estatística, de mastócitos nas imediações da lesão, para os períodos de 48 e 120 horas, conforme será abordado mais adiante. É relatado na literatura que muitos tipos celulares (células tumorais, macrófagos, linfócitos e mastócitos) estão correlacionados à indução da angiogênese, sendo maior o enfoque sobre os mastócitos, por se localizarem próximo aos pequenos vasos e apresentarem mediadores que influenciam a proliferação das células endoteliais (Pinheiro, 2006). Os mastócitos produzem diversos mediadores angiogênicos (proteínases, FGF-2, VEGF, TNF-, IL-8, heparina e histamina) e várias proteinases (tripsina, quimase) presentes nos tecidos são capazes de gerar angiotensina II, a partir da angiotensina I ou do próprio angiotensinogênio (Resende; Mill, 2002).

Dentre as proteinases, a quimase identificada nos mastócitos foi uma via alternativa de formação de angiotensina II nos vasos sanguíneos. Desta forma, a quimase presente nos grânulos dos mastócitos parece contribuir significativamente nos processos de proliferação vascular (Resende; Mill, 2002). Portanto, sugeriu-se que o aumento da atividade da quimase em determinados tecidos estaria associado à densidade local de mastócitos. No grupo do diclofenaco e grupo controle observamos maior quantidade desse tipo celular e conseqüentemente maior grau de neovascularização.

Outros dois estudos (Tuna et al., 2006; Ribatti et al., 2007), apesar de terem sido realizados com amostras teciduais totalmente diferentes, de carcinoma renal e mioma, respectivamente, também observaram uma relação do número de mastócitos com a neovascularização, sugerindo que os mastócitos teriam um importante papel na angiogênese tumoral.

Diferentemente de Durmus et al. (2003) que apresentaram maior grau de neovascularização no grupo dexametasona, quando comparado ao grupo controle, porém com maior dano causado ao tecido, através de uma incisão de 4cm no dorso dos animais e com análise apenas após 14 dias da cirurgia.

Quanto ao grupo do diclofenaco, observamos um menor grau de neovascularização para o período de 120h, quando comparado ao grupo controle, porém sem significância estatística, podendo também estar relacionado à menor quantidade de mastócitos. Porém, alguns autores (Mayorek et al., 2010) que utilizaram uma dose de 30mg/kg do fármaco, bem maior quando comparada à nossa de 4,45mg/Kg, obtiveram como resultados uma redução de 60% no tamanho de tumores de pâncreas em ratos, relacionada à acentuada diminuição da vascularização do tumor, com baixos níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

6.6 Tecido de granulação

Apesar de não ter sido estatisticamente significativa, o grupo controle exibiu valores de área de tecido de granulação maiores do que os grupos da dexametasona e do diclofenaco em 48h, o que pode ter sido resultado da inibição da fase inflamatória do reparo nesses dois últimos grupos, culminando com um atraso da fase proliferativa. De fato, em 120h ambos os grupos exibem área de tecido de granulação maior do que o controle, o que confirma o atraso da formação do tecido de granulação em 48h, com posterior atraso também na fase de remodelamento em relação ao controle. Também obtiveram resultados semelhantes Reis et al. (2008), com a conclusão de que a dexametasona interfere negativamente no processo de reparo e que sua utilização simultânea à laserterapia pode ser benéfica à reparação. Provavelmente, para confirmação desses achados, seria necessária maior extensão do número amostral. Contudo, os efeitos dessas diferenças estão parcialmente confirmados pela reepitelização e pela área da ferida. Durmus et al., 2003 também observaram um atraso na reparação, no grupo de ratos tratados com dose única de 1mg/Kg de dexametasona, com maior grau de neovascularização e tecido de granulação, porém após 14 dias.

6.7 Área da ferida

Verificamos que em 6 horas, o grupo que apresentou menor área foi o grupo de animais tratados com dexametasona, com áreas significativamente menores que as medidas do grupo controle.

Isso pode ser explicado pelo menor número de células inflamatórias, nesse período para esse grupo. Podemos dizer que não houve praticamente necrose nesse grupo para esse período e que o infiltrado inflamatório consequentemente foi menor.

Essa menor celularidade auxilia na manutenção das bordas da ferida sem um deslocamento causado por um acúmulo maior de células, que levaria à uma distanciação dessas bordas e consequentemente em uma aferição maior de área dessas feridas.

Um aspecto importante foi o fato de a intensidade de edema no grupo da dexametasona ter sido semelhante ao controle, e ambos bem mais intensos que o diclofenaco. Apesar dessas diferenças, o edema parece não ter influenciado na área superficial da lesão. De fato, ao se observarem os cortes histológicos há uma tendência de o edema se dissipar por entre as fibras musculares subjacentes na submucosa, o que poderia levar a um aumento do volume geral da língua. Como isso não foi avaliado, não podemos dizer que houve essa alteração de volume total, mas provavelmente as alterações dimensionais geradas pela exsudação plasmática estejam relacionadas ao todo do órgão e não a uma área específica.

Após 120 horas do trauma cirúrgico, as discrepâncias entre os grupos tornaram-se grandes, com a inversão de valores, onde o grupo tratado com dexametasona exibiu valores maiores de área da ferida quando comparado ao grupo controle e ao grupo diclofenaco. Observamos a reepitelização completa em alguns casos, com o grupo dexametasona apresentando menor porcentagem de casos, 20% apenas, o grupo controle com 40% e o grupo diclofenaco sódico, que apresentou a maior porcentagem de reepitelização completa com 45% dos casos.

A presença ainda do tecido de granulação no grupo dexametasona, bem como a reepitelização ativa nessa fase podem ter contribuído para a manutenção de área maior de ferida.

Com relação ao grupo do diclofenaco, a menor área de ferida observada nesse grupo está relacionada a menor quantidade de células inflamatórias, a formação de tecido de granulação compatível com o grupo controle e a maior reepitelização na maioria dos casos. Nesse sentido, analisando-se os fatores interferentes no processo de reparo, pode-se dizer que o grupo do diclofenaco exibiu os melhores padrões de reparo tecidual.

6.8 Mastócitos

A significativa redução de mastócitos nos grupos dos anti-inflamatórios pode estar atrelada às ações imunossupressoras e anti-inflamatórias geradas pela dexametasona e pelo diclofenaco. Pode-se dizer que a redução de mastócitos nas primeiras horas do reparo acompanhou a redução das células inflamatórias de uma maneira geral. Com relação a dexametasona, não encontramos trabalho que demonstrasse redução do número de mastócitos na mucosa oral a partir da administração preemptiva dessa droga. Acreditamos que possivelmente essa redução da população de mastócitos esteja atrelada a inibição da síntese dos conteúdos dos grânulos do mastócito, principalmente da histamina, tal qual outros autores observaram em pele (Lavker; Schechter, 1985). Também é possível ter havido redução da população de mastócitos diretamente pela dexametasona, e não mediada pela redução de citocinas e de mediadores químicos da inflamação, tal qual observaram outros autores em mucosa intestinal de ratos (Soda et al., 1991). Ainda, estudos têm demonstrado que a diferenciação e a maturação dos mastócitos em nível de medula óssea hematopoiética dependem da sinalização de fatores de crescimento derivados de linfócitos T e de outros fatores diretamente ligados ao microambiente medular (Jamur;

Oliver, 2011), e como houve redução da população de células inflamatórias, dentre elas de linfócitos, pode ser que também essa via esteja envolvida na redução de mastócitos.

O diclofenaco também acarretou redução da quantidade de mastócitos no local em reparo até o período de 120h. Essa redução pode ser atribuída ao próprio mecanismo de ação desse anti-inflamatório, o qual inibe a liberação de prostaglandina D2 a partir dos mastócitos (dePaulis et al., 1997). Como esse mediador químico constitui um quimioatrator para mastócitos (Jamur; Oliver, 2011), pode-se depreender que a redução na quantidade dessa célula esteja atrelada a esse fenômeno inibitório, acarretando pouca migração de precursores dessas células ou do mastócito já diferenciado para o local em reparação.

O impacto da redução de mastócitos no processo de reparo está presente em todas as fases. Particularmente neste estudo, a reduzida população de mastócitos pode ter influenciado, juntamente com as drogas, na redução da celularidade, já que a migração neutrofílica é dependente da presença de mastócitos (Walsh et al., 1991; Granger; Kubes, 1994; Noli; Miolo, 2001). Ainda, a redução dos mastócitos pode ter tido influência sobre a menor formação de tecido de granulação nos animais que receberam os anti-inflamatórios, principalmente devido a sua ação direta e indireta sobre a angiogênese e sobre a secreção de colágeno pelos fibroblastos (Berton et al., 2000; Noli; Miolo, 2001).

Diante das limitações do presente estudo em explicar a origem da diminuição do número de mastócitos nos animais tratados com diclofenaco e dexametasona, e considerando-se a escassez de trabalhos na literatura, devem ser instituídos estudos mais abrangentes envolvendo a fisiologia e a farmacologia das interações aqui apontadas.

7 CONCLUSÕES

- A dexametasona provocou redução mais intensa do infiltrado inflamatório quando comparado ao diclofenaco sódico e ao controle.
- Tanto o diclofenaco quanto a dexametasona provocam redução de mastócitos na área lesionada, situação que se mantém até 5 dias após a administração dessas drogas.
- O diclofenaco sódico apresentou menor edema em relação ao grupo controle e à dexametasona no período de 6 horas, com maior contração do tecido em reparação no período de 120 horas e consequentemente um melhor efeito sobre o fechamento da ferida cirúrgica.

REFERÊNCIAS¹

Aoki T, Yamaguchi H, Naito H, Shiiki K, Izawa K, Ota Y, et al. Premedication with cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam reduced postoperative pain in patients after oral surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 35(7):613-7.

Bamgbose BO, Akinwande JA, Adeyemo WL, Ladeinde AL, Arotiba GT, Ogunlewe MO. Effects of co-administered dexamethasone and diclofenac potassium on pain, swelling and trismus following third molar surgery. *Head Face Med*. 2005, 1:11.

Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Dis*. 2005;11:249-254.

Berton A, Levischaffer F, Emonard H, et al. Activation of fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. *Clinical and Experimental Allergy*. 2000; 30: 485-92.

Bishop CR, Athens JW, Boggs DR, et al. Leukokinetic studies: a non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J Clin Invest*. 1968;47:249-260.

Bogliolo L. *Patologia*. Geraldo Brasileiro Filho. 7.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006.1488p.

Brooks PM, Day RO. Nonsteroidal antiinflammatory drugs- differences and similarities. *N Engl J Med*. 1991; 324: 1716-1725.

Buyukkurt MC, Gungormus M, Kaya O. The effect of a single dose prednisolone with and without diclofenac on pain, trismus, and swelling after removal of mandibular third molars. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64(12):1761-6.

¹ De acordo com a Norma Vancouver.

Cotran RS, Robbins SL, Abbas AK, et al. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7a ed. Elsevier ; 2006.800p.

DePaulis A, Ciccarelli A, Marinò I, DeCrescenzo G, Marinò D, Marone G. Human synovial mast cells. Arthritis & rheumatism. 1997 March ;40(3):469-478.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth factor Rev. 2003, 14:193-209.

Duarte MEL, Peixoto ALP, Pacheco A. Hiperplasia de mastócitos na oxalose óssea. Rev. Ass. Med. Brasil. 1999.45:95-98.

Durmus M, Karaaslan E, Ozturk E, et al. The effects of single-dose dexamethasone on wound healing in rats. Anesthetic Pharmacology. 2003; 97:1377-80.

Gailit J, Welch MP, Clark RAF. TGF-beta1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. Journal of Investigative Dermatology 1994; 103: 221–7.

Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica / editor Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker; [revisão de conteúdo Almir Lourenço da Fonseca] ; [tradução Carlos Henrique de Araújo Cosendey ... [et al.]] -- Rio de Janeiro : McGraw-Hill, c2007.

Grönneberg R, Dahlén SE. Interactions between histamine and prostanoids in IgE-dependent, late cutaneous reactions in man. J Allergy Clin Immunol.1990, 85(5):843-52.

Grossi GB, Maiorana C, Garramone RA, Borgonovo A, Farronato D. Effect of Submucosal Injection of Dexamethasone on Postoperative Discomfort After Third Molar Surgery: A Prospective Study. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. J Oral Maxillofac Surg 2007, 65:2218-2226.

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. Journal of Leukocyte Biology 1994; 55: 662–75.

Gupta A, Jain GK, Raghubir R. A time course study for the development of an immunocompromised wound model, using hydrocortisone. *J Pharmacol Toxicol methods*. 1999;41:183-7.

Hasan SMF, Ahmed T, Talib N, Hasa, F. Pharmacokinetics of diclofenac sodium in normal man. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005 January;18(1): 18-24.

Jamur MC, Oliver C. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors. *Frontiers en Bioscience S3*, 2011 June1: 1390-1406.

Joshi A, Parara E, Macfarlane T. A double-blind randomised controlled clinical trial of the effect of preoperative ibuprofen, diclofenac, paracetamol with codeine and a placebo tablets for relief of postoperative pain after removal of impacted third molar. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 2004; 42:299-306.

Kara CO, Gokalan I. Effects of single - dose steroid usage on edema , ecchymosis, and intraoperative bleeding in rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg*. 1999; 104:2213-8.

Laureano Filho JR, Maurette PE, Allais M, et al. Clinical comparative study of the effectiveness of two dosages of Dexamethasone to control postoperative swelling, trismus and pain after the surgical extraction of mandibular impacted third molars. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13(2):129-32.

Lavker RM, Schechter NM. Cutaneous mast cell depletion results from topical corticosteroid usage. *The journal of Immunology*. 1985 Oct;135(4): 2368-2373.

Malaviya R, Morrison AR, Pentland AP. Histamine in human epidermal cells is induced by ultraviolet light injury. *Journal of Investigative Dermatology*. 1996; 106: 785–9.

Markovic AB, Todorovic LJ. Effectiveness of dexamethasone and low-power laser in minimizing edema after third molar surgery: a clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36(3):226-9.

Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*. 2005;15(11):599-607.

Mayorek N, Naftali-Shani N, Grunewald M. Diclofenac inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer by modulation of VEGF levels and arginase activity. *PLoS One*. 2010 Sep15;5(9):e12715.

Mengle-Gaw LJ, Schwartz BD. Cyclooxygenase-2 inhibitors: promise or peril? *Mediators of Inflammation*. vol. 2002;11(5): 275–286.

Nguyen H, Lim J, Dresner ML, Nixon B. Effect of local corticosteroids on early inflammatory function in surgical wound of rats. *J Foot Ankle Surg*.1998; 37:313-8.

Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Veterinary Dermatology* 2001;12: 303-313.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology*. 2006; 119(3): 229–240.

Pinheiro SW. Avaliação comparativa do número de mastócitos na musculatura circular do esôfago e do cólon de chagásicos crônicos com e sem mega. [Tese]. Minas Gerais: Universidade Federal do Triângulo Mineiro; 2006.

Puxeddu I, Piliponsky AM, Bachelet I, et al. Mast cells in allergy and beyond. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35:1601–7.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.808p.

Reis SRA, Medrado AP, Marchionni AMT, et al. Effect of 670-nm Laser Therapy and Dexamethasone on Tissue Repair: A Histological and Ultrastructural Study .*Knop. Photomedicine and Laser Surgery*. 2008; 26(4): 307-313.

Resende MM, Mill JG. Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 78:425-31.

Ribatti D, Finato N, Crivellato E. Neovascularization and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathologic progression in human endometrial câncer. *Am. J. Obs. Gyn*. 2005; 193:1961-1965.

Ribatti D, Belloni A, Nico B. Tryptase- and leptin-positive mast cells correlate with vascular density in uterine leiomyomas. *Am. J. Obs. Gyn.* 2007; 196:470- 477.

Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Comparative immunohistochemical study of the presence of mast cells in apical granulomas and periapical cysts: possible role of mast cells in the course of human periapical lesions. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2004; 97:59-63.

Schweitzer A, Hasler-Nguyen N, Zijlstra J. Preferential uptake of the non steroid anti-inflammatory drug diclofenac into inflamed tissues after a single oral dose in rats. *BMC Pharmacology.* 2009; 9:5.

Simone JL. Administração preemptiva de dexametasona e diclofenaco sódico: estudo comparativo da efetividade analgésica e anti-inflamatória. [Tese]. Livre Docência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.

Soda K, Kawabori S, Perdue MH, Bienenstock J. Macrophage engulfment of mucosal mast cells in rats treated with dexamethasone. *Gastroenterology.* 1991 Apr; 100(4):929-37.

Talas DU, Nayci A, Atis S, et al. The effects of corticosteroids on the healing of tracheal anastomoses in a rat model. *Pharmacol.* 2002;45:299-304.

Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Na bras Dermatol.* 2007;82(2):141-9.

Trautmann A, Krohne G, Bröcker ER. Human mast cells augment fibroblast proliferation by heterotypic cell-cell adhesion and action of IL-4. *J. Imm.* 1998; 160:5053-5057.

Tsai W, Tang F, Wong M, Pang J. Inhibition of tendon cell migration by dexamethasone is correlated with reduced alpha-smooth muscle actin gene expression: a potential mechanism of delayed tendon healing. *J. Orthop. Res.* 2003; 21, 265-271.

Tuna B, Yorukoglu K, Unlu M. Association of mast cells with microvessel density in renal cell carcinomas. *Eur. Ass. Uro.* 2006; 50:530-534.

Uslu M, Kılınçoğlu V, Toker S, Kalender AM, Doğan A, Sebik A. Comparison of anti-edema effects of iloprost and diclofenac sodium on traumatic rat paw edema. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2010;44(6):484-491.

Vliagoftis H, Hutson AM, Mahmudi-Azer S, et al. Mast cells express connexins on their cytoplasmic membrane. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1999; 103: 656–62.
Walsh LJ, Trinchieri G, Waldorf HA, et al. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leucocyte adhesion molecule-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 1991; 88: 4220–4.

Walsh LJ, Xu LJ, Savage NW. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J. Oral. Pathol. Med.* 1995; 24:266- 272.

Walsh LJ. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14:188- 198.
Wannmacher L, Ferreira MBC. *Farmacologia Clinica para dentistas.* 3a ed. Guanabara Koogan; 2008.568p.

Wilgus TA. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. *Pharmacological Research.* 2008;58:112–116.

Yagiela JA, Neidle EA, Dowd FJ. *Farmacologia e terapêutica para dentistas.* 6a ed. Guanabara Koogan; 2011.717p.

Yu D, Clements PJ, Paulus HE, et al. Human lymphocyte subpopulations: effect of corticosteroids. *J Clin Invest.* 1974; 53:565-571.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cup@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **048** nas fls. **86** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) José Leonardo Simone, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Estudo comparativo da eficácia entre dexametasona, diclofenaco sódio e laser de baixa potência no controle da resposta inflamatória em feridas cutâneas em dorso de ratos** do qual participou(aram) o(s) **Gisele Ebling Artes, Maria Cláudia Camargo de Almeida Monteiro e os pesquisadores Victor Elias Arana-Chavez, Alyne Simões**, 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 **28.04.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 03 de maio de 2010.

Prof. Dr. WOTIAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP