



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): **FERNANDA VIEIRA RIBEIRO**



Ano de Conclusão do Curso: 2003

TCC 040



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



FERNANDA VIEIRA RIBEIRO

**EFEITO DO MELOXICAM NO REPARO DE
DEFEITOS ÓSSEOS EM CALVÁRIA DE
RATOS**

TCC 417

*Monografia apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, como Trabalho de
Conclusão do Curso de Graduação em
Odontologia – Área de Periodontia.*

**PIRACICABA
2003**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FERNANDA VIEIRA RIBEIRO

**EFEITO DO MELOXICAM NO REPARO DE
DEFEITOS ÓSSEOS EM CALVÁRIA DE
RATOS**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Odontologia – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, não apenas por me iluminar e guiar durante todos os dias de minha vida, dando-me força em todos os meus momentos, mas principalmente por te me concedido o dom da vida.

Aos meus pais, **Ivanilde e Antônio**, pelo amor, compreensão, confiança e total apoio que ofereceram a mim durante todo meu caminho e por se fazerem tão presentes em minha vida, apesar da distância. Agradeço imensamente a vocês, que sempre estão por trás dos meus sonhos e das minhas conquistas, ajudando-me em tudo o que preciso, dando-me carinho e amor.

Aos meus irmãos, **Renata e Ricardo**, por todos os maravilhosos momentos compartilhados até hoje, pelo sincero amor e pela amizade eterna existente entre nós.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pelo exemplo de profissionalismo, incentivo e atenção dispensados em todos os momentos. Pela oportunidade concedida durante o curso de graduação de trabalhar com sua pessoa, contribuindo imensamente na minha formação acadêmica.

Ao meu co-orientador, **Bruno César de Vasconcelos Gurgel**, pela contribuição científica, apoio, incentivo, auxílios prestados durante todos os momentos de execução deste trabalho e pela amizade conquistada neste período.

A todos os amigos que fazem parte da minha vida, em especial às minhas amigas **Aline, Giovana, Thalita e Vanessa**, pelos maravilhosos momentos compartilhados durante nossa vida acadêmica e pela grande amizade e carinho conquistados nesse período.

Ao meu namorado, **Luiz Gustavo**, pelo amor, carinho e compreensão demonstrados durante todo o tempo que estamos juntos e por cada minuto inesquecível que vivemos.

AGRADECIMENTOS

Ao excelentíssimo senhor Prof. Dr. **Carlos Henrique de Brito Cruz**, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. **Thales de Mattos Filho**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **Fapesp**, pelo auxílio financeiro concedido para execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum**, responsável pela área de Periodontia da FOP/Unicamp.

À sra. **Mariana Piovezan Fugolin**, técnica do laboratório de Periodontia, pelo auxílio, simpatia e pela pronta disposição em ajudar durante toda a fase laboratorial deste trabalho.

À sra. **Eliete Aparecida Ferreira Lima**, secretária da área de Periodontia, pelos auxílios prestados sempre com tanto carinho e atenção.

À Profa. Dra. **Silvana Pereira Barros**, do Departamento de Morfologia, pela colaboração durante a fase laboratorial e pelo empréstimo de equipamentos gentilmente cedidos.

Ao aluno de doutorado do Departamento de Morfologia, **Marco Antônio Dias da Silva**, por todas as sugestões e pela imensa ajuda dispensada durante a fase laboratorial deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pg.
RESUMO	01
1. INTRODUÇÃO	02
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1. Remodelação óssea	05
2.2. Mediadores químicos envolvidos na atividade óssea	07
2.3. Mecanismo de ação dos AINES	15
2.4. Efeito dos AINES no reparo ósseo	18
3. PROPOSIÇÃO	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1. Animais utilizados	33
4.2. Antiinflamatório	33
4.3. Procedimento cirúrgico e constituição dos grupos	34
4.4. Análise histológica e histométrica	36
4.5. Análise Estatística	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Análise Histológica	39
5.2. Análise Histométrica	43
6. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8. ANEXOS	69

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, histologicamente e histometricamente, o efeito do meloxicam, uma droga antiinflamatória não esteroideal seletiva para a ciclooxigenase-2, administrada sistemicamente, sobre o reparo ósseo de defeitos confeccionados na calvária de ratos. O experimento foi realizado em 36 ratos machos adultos, *Norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, os quais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Em cada animal foram confeccionados dois defeitos ósseos bilaterais de 4mm de diâmetro nos ossos parietais. No grupo tratado (n=18) foi administrado o meloxicam diariamente, via subcutânea, na dosagem de 3 mg/kg/dia. No grupo controle (n=18), foi administrada diariamente solução fisiológica de cloreto de sódio à 0,9% esterilizada, na dosagem de 1ml/Kg/dia, durante os mesmos períodos pós-operatórios. Foi realizado sacrifício dos animais em dois períodos, 15 e 45 dias de pós-operatório. A avaliação histológica mostrou maior atividade osteogênica nos animais que não receberam o medicamento. A análise histométrica mostrou que houve diminuição estatisticamente significativa no reparo ósseo nos animais tratados com meloxicam, tanto aos 15 quanto aos 45 dias após a administração da droga ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística significativa no reparo ósseo entre 15 e 45 dias de experimento, tanto nos animais tratados quanto nos controle ($p > 0,05$). Os resultados indicam que o meloxicam é capaz de gerar atraso no reparo ósseo e que a osteogênese ocorre com maior intensidade nas duas primeiras semanas do processo de reparo.

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material intercelular calcificado (matriz óssea). Sendo um tecido metabolicamente ativo, é submetido a contínuo processo de renovação, denominado remodelação óssea. As principais células que regulam a renovação do esqueleto são os osteoblastos e osteoclastos, os quais encontram-se em equilíbrio nesse processo por meio de fenômenos de reabsorção e neoformação óssea (HOROWITZ *et al.*, 2001).

Muitos estudos têm mostrado que os metabólitos do ácido araquidônico e os AINES estão envolvidos na regulação da formação e reabsorção óssea, porém, os resultados apresentam-se muito variados. Essa variação pode ser ocasionada pelo uso de diferentes drogas, dosagens e duração do tratamento (YAZDI *et al.*, 1992).

As PGs exercem importante atividade no processo de reparo ósseo (SIMON *et al.*, 2002), sendo que a administração de PGE₂ ocasiona aumento na taxa de reparo das fraturas em muitos modelos animais (KELLER *et al.*, 1993; KELLER, 1996; NORRDIN *et al.*, 1988), indicando que os metabólitos da cicloxigenase podem ser necessários para que ocorra eficiente reparo ósseo.

Duas isoenzimas da cicloxigenase têm sido relatadas e caracterizadas como COX-1, constitutiva ou fisiológica, e COX-2, induzida. Os agentes antiinflamatórios convencionais agem tanto sobre a enzima COX-1 como COX-2, no entanto, geram efeitos colaterais como distúrbios gastrintestinais e renais (EMERY,

1996). Há antiinflamatórios não esteroidais (AINES) que apresentam seletividade pela inibição da via COX-2, fato que justifica uma melhor tolerabilidade a este tipo de medicamento, preservando o organismo de reações adversas ligadas à excessiva inibição de COX-1. A utilização de novos AINES, que bloqueiam a COX-2 e apresentam baixa toxicidade para o estômago e rins, podem promover efeitos sobre o reparo ósseo por inibir os efeitos das PGE₂ relacionados aos estímulos inflamatórios (LARA, 1998; ANDRADE, 2000).

Dentro da área da Periodontia, é muito importante que ocorra adequado reparo ósseo em pacientes que se submeteram a alguns tipos de procedimentos como colocação de implantes osseointegráveis ou terapia periodontal cirúrgica envolvendo ostectomia ou procedimentos regenerativos, associados ou não a enxertos ósseos.

A utilização de drogas sobre o reparo ósseo tem sido alvo de diversos estudos na literatura (GIANNOUDIS *et al.*, 2001; BRAGGER *et al.*, 1997; HO *et al.*, 1999). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm sido relatados como inibidores do reparo e formação óssea. BICHARA *et al.* (1999), demonstraram tal efeito no tratamento de defeitos intra-ósseos após cirurgia periodontal para colocação de membranas.

Dentro deste contexto, é necessário que os AINES, principalmente aqueles que apresentam seletividade pela COX-2, sejam mais estudados com relação aos seus efeitos sobre a formação e o reparo ósseo, a fim de que sua utilização como coadjuvante no tratamento de pacientes que se submetem ao processo de reparo ósseo seja aplicada corretamente.

O meloxicam é um novo AINES pertencente ao grupo das oxicanas, recentemente introduzido no mercado farmacêutico brasileiro, que tem como

característica inibir seletivamente a enzima COX-2 (LARA, 1998). Frente às evidências mostradas na literatura a respeito do efeito dos AINES, especialmente os seletivos para a COX-2, sobre o processo de reparo ósseo, o presente estudo propôs-se a avaliar a influência do uso do meloxicam sobre o processo de reparo do tecido ósseo.

2.REVISÃO DA LITERATURA

2.1. REMODELAÇÃO ÓSSEA

Frente à necessidade de reparo, há tecidos que possuem células reservas, as quais são capazes de se replicarem, substituindo células parenquimatosas destruídas por alguma agressão. Através desse processo, a arquitetura e a função dos tecidos perdidos são restaurados por completo, levando à regeneração (COTRAN *et al.*, 1996). Outros tecidos podem restaurar sua continuidade anatômica sem, no entanto, substituir células funcionantes do parênquima e realizando tal substituição através de um tecido fibrosado não especializado ocasionando a cicatrização (MELCHER, 1969). Um desses mecanismos de reparo ou os dois podem ocorrer e isso pode variar de acordo com a extensão da lesão e dependendo da capacidade regenerativa das células (ROBBINS *et al.*, 1986).

Para que a remodelação óssea se inicie, uma região inativa deve tornar-se ativa. Esse processo envolve proliferação de novos vasos sanguíneos responsáveis pela condução de osteoclastos, os quais preparam uma cavidade, sendo posteriormente movidos para um novo sítio de ação. A cavidade deixada logo é preenchida por osteoblastos. Nesta fase onde ocorre o fim da reabsorção e o início da formação óssea, o osso velho é recoberto por uma estreita camada de substância composta de colágeno e matriz rica em aminoglicosídeos, glicoproteínas e ácido fosfático, afim de que ocorra fixação dos osteoblastos (WEINSTEIN *et al.*, 2000; HOROWITZ *et al.*, 2001). Essa alternância mantém o equilíbrio ósseo no

esqueleto, e um desequilíbrio pode resultar em maior ou menor quantidade óssea (HOROWITZ *et al.*, 2001).

Numa lesão óssea, a região afetada é preenchida por coágulo ocorrendo posterior formação de tecido de granulação (ROBBINS *et al.*, 1986). Ao fim da primeira semana, surgem ilhotas de cartilagem nesse tecido de granulação, quando a ossificação é do tipo endocondal. Na ossificação do tipo intramembranosa, não ocorre a diferenciação das células osteoprogenitoras em condroblastos, sendo os osteoblastos derivados diretamente das células mesenquimais indiferenciadas (EINHORN, 1998). Forma-se, então, um tecido de sustentação conhecido como "calo provisório" ou "pró-calo". Os osteoblastos começam a formar osteóide, a matriz protéica do osso, onde é depositado cálcio progressivamente. Ao fim desse processo, o calo ósseo substitui o calo provisório. Após quatro a seis semanas, a área lesionada apresenta-se firmemente unida, porém há um excesso ósseo dentro do espaço medular e envolvendo a porção externa da lesão. Esse excesso é lentamente remodelado sendo reabsorvido por osteoclastos ao passo que as trabéculas são reforçadas pela calcificação e neo-osteogênese aumentadas dentro do osso normal. A ação dos fibroblastos e osteoblastos faz com que o periósteo seja reformado, sobrando apenas algum tecido conectivo cicatricial dos músculos adjacentes como sinal da lesão anterior. Portanto, após aproximadamente um mês, a lesão apresenta-se completamente reparada através do seu preenchimento por tecido ósseo-fibroso e nos dias subseqüentes ocorre a completa remodelação e amadurecimento do novo tecido (ROBBINS *et al.*, 1986).

Portanto, o osso, além da sua estrutura físicoquímica característica, tem a capacidade de regeneração e remodelação durante todo o período pós-fetal, fazendo com que este tecido diferencie-se dos demais (GOMES, 1998). Essa

capacidade de regeneração ocorre em função de dois processos combinados, devendo-se tanto à proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas, como à indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas. Porém, esta capacidade regenerativa pode ser limitada pelo tamanho da lesão, fazendo com que grandes defeitos ósseos não se regenerem espontaneamente, representando um problema estético e funcional para o pacientes (CORMACK, 1991).

2.2. MEDIADORES QUÍMICOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ÓSSEA

A formação óssea pode ser afetada pela ação de diversos mediadores químicos, tanto hormônios sistêmicos quanto fatores locais (SCHWARTZ *et al.*, 1997).

Muitos pesquisadores têm localizado e identificado mediadores relacionados ao processo de remodelação óssea (MASSAGUÉ, 1990; CAREY & LIU, 1995). Os reguladores de formação óssea local são os fatores de crescimento produzidos pelas células presentes no tecido conjuntivo, que agem diretamente sobre as células da linhagem osteoblástica, estimulando a neoformação óssea, como por exemplo, o fator de crescimento derivado das plaquetas, fator de insulina I e II, fator de crescimento transformador $\beta 1$ e $\beta 2$, fator de crescimento de fibroblastos e proteínas morfogenéticas ósseas (SCHWARTZ *et al.*, 1997).

Sob a ação de estímulos inflamatórios, as células imunes do tecido conjuntivo e células ósseas são ativadas. As células do sistema imune passam a induzir a formação de fatores locais, chamados osteotrópicos, como interleucina 1 α e β (IL-1 α e β), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E-2 (PGE₂) e fator de necrose

tumoral a (FNTa), como também outros mediadores inflamatórios que são capazes de modificar o controle da remodelação óssea *in vitro* e *in vivo*, inibindo a função osteoblástica e aumentando a formação e ativação osteoclástica. Este mecanismo gera destruição do tecido conjuntivo e conseqüentemente à reabsorção óssea (SCHWARTZ *et al.*, 1997).

Porém, as células imunes e inflamatórias são também capazes de liberar fatores que agem de maneira oposta àquela que estimula a reabsorção. Tais fatores são IL-1ra, Interferon γ (IFN γ), IL-10, IL-4, fator transformador de crescimento β (FTC β), os quais têm influencia sobre diversas respostas inflamatórias (GEMMELL *et al.*, 1997) bloqueando a ativação de citocina induzida, inibindo a formação de osteoclastos ou ativando os osteoblastos a partir de outros fatores de crescimento ósseos, beneficiando, deste modo, o mecanismo de reparo ósseo (MIYASAKI, 1997).

De acordo com GOLDRING & GOLDRING (1990), as citocinas podem ser definidas como produtos liberados por algumas células para modular a atividade de outras, sendo que uma citocina pode ter múltiplas atividades celulares e muitas citocinas podem apresentar propriedades em comum. O termo citocina geralmente inclui produtos originalmente descritos como fatores de crescimento ou de diferenciação, interleucinas, linfocinas, monocinas, etc.

Vários reguladores biológicos estão associados ao reparo ósseo. O fator de crescimento transformador beta (TGF- β) age de modo a estimular a expressão de colágeno tipo I nos osteoblastos e aumentando a atividade dessas células (MASSAGUÉ, 1990). Além disso, os TGF- β são responsáveis pela regulação da calcificação da matriz e estimulam a regeneração intra-óssea. Os TGF- β incluem mais de 25 fatores moleculares tais como as proteínas ósseas morfogenéticas

(BMPs) (BONEWALD *et al.*, 1989), também envolvidas no processo de reparo ósseo. Muitas evidências mostram que o papel das BMPs é promover a expressão de osteoblastos a partir de precursores pluripotentes. A BMP-2 induz a diferenciação de células tronco em osteoblastos, podendo inclusive, juntamente com a BMP-3, aumentar a expressão osteoblástica. A BMP-7 induz a diferenciação de osteoblastos a partir de células osteoprogenitoras de calvárias de ratos (CAREY & LIU, 1995).

Atualmente, a BMP recombinante humana tem sido utilizada em defeitos ósseos em calvárias de ratos (MARDEN *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 1995), em mandíbula de cães (TORIUMI *et al.*, 1991) entre outros. Tais estudos mostram que a BMP recombinante humana promove reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico, os quais não reparariam naturalmente.

Alguns trabalhos relataram que aplicações de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e de fator-I de crescimento relacionado à insulina (IGF-I) em defeitos ósseos periodontais de cães estimularam o reparo ósseo (LYNCH *et al.*, 1989; LYNCH *et al.*, 1991). Outros, porém, mostraram que o uso de PDGF associado à BMP-3 em defeitos em calvárias de ratos reduziu a regeneração óssea de forma significativa (MARDEN *et al.*, 1993). Mais estudos são necessários para determinação do papel do PDGF no processo de reparo ósseo (HOLLINGER & WONG, 1996).

Numa lesão óssea, concomitantemente à liberação desses fatores, os macrófagos, responsáveis pela remoção de tecido necrótico na região afetada, também ocasionam a liberação de interleucina-1 (IL-1), necessária para angiogênese e ativação de fibroblastos e células osteoprogenitoras (PIERCE, 1990). A IL-1 tem a capacidade de estimular certas proteases na degradação do calo

ósseo, preparando a região para invasão de novos vasos sanguíneos e deposição de cálcio. Ela também induz a liberação de outras citocinas, com a IL-6. Essa participação ativa da IL-1 logo nos estágios iniciais de reparo ósseo, indica que ela apresenta papel importante na regulação da reabsorção e formação óssea (BEUSCHER *et al.*, 1992).

Exposições a curto prazo à interleucina-1 beta (IL-1 β) e aos fatores de necrose tumoral alfa e beta (TNF- α e TNF- β , respectivamente) podem levar a formação osteoblástica, enquanto grandes períodos de exposição a essas citocinas inibem a formação osteoblástica (JARDINSKI *et al.*, 1991; MASADA *et al.*, 1990).

Os osteoblastos produzem PGs de maneira autoregulada, sendo que as PGs podem regular sua própria produção (PILBEAN *et al.*, 1997). A regulação da produção de PGs pelas células ósseas pode também ocorrer através de forças mecânicas, citocinas, fatores de crescimento e hormônios sistêmicos (KAWAGUCHI *et al.*, 1995).

As atividades antiinflamatórias associadas ao osso podem ocorrer através do bloqueio da ativação osteoclástica pelas citocinas. Deste modo, linfócitos NK (Natural Killer) e linfócitos T helper-1 (LTh-1) produzem interferon gama (IFN- γ), que inibe a proliferação e diferenciação osteoclástica. A ação do IFN- γ se deve principalmente à inibição da IL-1 e TNF- α , os quais ativam os osteoclastos. Os efeitos osteoclásticos derivados das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-1 α são antagonizados pela IL-1ra, também responsável pela inibição da reabsorção óssea, assim como o IFN- γ (CARRANZA & NEWMAN, 1997). Bloqueio na formação de osteoclastos é outro tipo de resposta do sistema imune à inflamação relacionada ao tecido ósseo. A inibição na formação osteoclástica ocorre através da ação do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), produzido por monócitos ou pela

própria matriz óssea. Enfim, a ativação de osteoblastos pode também ocorrer com o objetivo de induzir a cicatrização óssea. Neste caso, fatores de crescimento do fibroblasto (FGF), fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF) e fatores I e II de crescimento da insulina (IGF-I e IGF-II) favorecem a mitose de células ósseas, sendo que IGF-I e IGF-II induzem o crescimento de osteoblastos, diferenciação, síntese de colágeno tipo I e formação de uma proteína liberada durante o processo de formação óssea, a fosfatase alcalina (LYNCH *et al.*, 1989).

Para que o processo de remodelação óssea ocorra de maneira controlada, as células da linhagem osteoblástica regulam a diferenciação de células da linhagem osteoclástica. As células da linhagem osteoblástica estão, portanto, envolvidas na osteoclastogênese através de um mecanismo que envolve o contato célula-célula com os precursores dos osteoclastos, quando estes são colocados em contato direto, em cultura de medula óssea, ocorrendo indução de osteoclastos pelas células da linhagem osteoblástica (TAKAHASHI *et al.*, 1988). Esse mecanismo se dá através de moléculas presentes na superfície dos osteoblastos e que são reconhecidas por moléculas receptoras na superfície nos precursores dos osteoclastos, as quais são essenciais para diferenciação e função destes. Deste modo, um novo grupo de citocinas da família de ligantes e receptores do fator de necrose tumoral (FNT), os quais são necessários para o controle da osteoclastogênese, foi identificado (SUDA *et al.*, 1999; HOROWITZ *et al.*, 2001). Tais moléculas são: Osteoprotegerin (OPG) ou Fator Inibidor de Osteoclastogênese (FIOC); RANK ligante (RANKL ou Receptor ativador de NF kappa B ligante) ou também chamado FDO (Fator de diferenciação de osteoclasto), expresso nas células osteoblásticas e o seu receptor RANK, expresso nos precursores osteoclásticos.

Alguns fatores, por regularem indiretamente a produção de OPG e do RANKL nos osteoblastos, são essenciais para a osteoclastogênese (YASUDA *et al.*, 1998; HOFBAUER & HEUFELDER, 2001). Dentre eles podemos citar vários hormônios como glicocorticóide, estrógeno, hormônio paratireóide, 1,25 hidroxivitamina D₃, citocinas tais como FNT, IL-1, IL-4, IL-6, IL-11, IL-17 e PGE₂ e também vários fatores de transcrição mesenquimal como cbfa-1 (HOFBAUER & HEUFELDER, 2001).

A sinalização do RANK ligante (RANKL) é negativamente regulada pela osteoprotegerin (OPG), uma glicoproteína solúvel que é secretada pelos osteoblastos em resposta a estímulos de fatores osteotrópicos ou de citocinas (UDAGAWA *et al.*, 2000). Ela inibe a sinalização do RANK ao RANK ligante, induzindo a apoptose das células osteoclásticas (SIMONET *et al.*, 1997) e executa importante papel de proteção na reabsorção óssea (UDAGAWA *et al.*, 2000).

O RANKL é produzido pela linhagem de células osteoblásticas, sendo ativado por linfócitos T (HOFBAUER & HEUFELDER, 2001). Caracterizado como uma proteína transmembrana tipo II, o RANKL parece auxiliar na fusão, sobrevivência e diferenciação de progenitores osteoclásticos em osteoclastos (UDAGAWA *et al.*, 2000). Quando o RANKL se liga ao RANK presente nas células precursoras de osteoclastos, é traduzido um sinal para a osteoclastogênese (NAKAGAWA *et al.*, 1998). Foi demonstrado também que a OPG inibe a osteoclastogênese por interferir na ligação do RANKL ao RANK, mostrando que a OPG atua como um receptor "isca" para RANKL por competir com RANK, expressos nas células da linhagem osteoclástica (NAKAGAWA *et al.*, 1998; UDAGAWA *et al.*, 2000).

O RANK é uma proteína transmembrana tipo I que se liga exclusivamente ao RANKL, sendo um receptor expresso nas células precursoras de osteoclastos e em osteoclastos maduros, ativando o processo de osteoclastogênese (NAKAGAWA *et al.*, 1998; HOROWITZ *et al.*, 2001).

Inúmeras desordens que envolvem o metabolismo ósseo podem ser derivadas de anormalidades existentes no sistema RANK/OPG como, por exemplo, artrite erosiva (KONG *et al.*, 1999), hipercalcemia (OYAJOB I *et al.*, 2001), osteoporose (SIMONET *et al.*, 1997), metástases ósseas (HONORE *et al.*, 2000), doenças ósseas malignas (HOFBAUER *et al.*, 2001) entre outras. A administração de inibidores da sinalização do RANKL ou RANK, como OPG e, pode ser útil no controle e na prevenção dessas desordens ósseas (HOFBAUER & HEUFELDER, 2001).

O papel inibidor das moléculas de superfície RANK e RANKL sobre o processo de reabsorção óssea já foi estudado em vários trabalhos (NAKAGAWA *et al.*, 1998; HOROWITZ *et al.*, 2001; HOFBAUER & HEUFELDER, 2001). Porém, com o intuito de avaliar a ação dessas moléculas também sobre o reparo ósseo, FLICK *et al.* (2003) realizaram um estudo analisando o efeito da depleção de osteoclastos sobre a formação do calo ósseo, remodelação e maturação da matriz óssea e taxa de união óssea em fraturas confeccionadas em tíbias de camundongos. Os resultados mostraram que, de fato, a administração de RANK:Fc, inibidor da sinalização do RANK, é capaz de inibir a osteoclastogênese, sendo que mesmo em doses suficientes pra eliminar os osteoclastos e reduzir a reabsorção óssea, tais moléculas não causam prejuízo no processo de reparo ósseo. O reparo foi também analisado em animais com ausência de RANK, os quais mostraram, tanto nas observações histológicas quanto nas radiográficas, formação de calo ósseo,

indicando que a sinalização do RANK não é necessária para formação de calo no local da fratura óssea.

Trabalhos recentes mostraram que a PGE₂, hormônio da paratireóide, a 1,25D₃ e a dexametasona inibiram a produção de OPG em calvária de ratos e estimularam o RANKL (O'BRIEN *et al.*, 2001). Além disso, na ausência de efeitos estimulatórios promovidos pela PGE₂ na reabsorção óssea, existe um aumento na expressão de OPG nas linhagens celulares osteoblásticas, havendo uma inibição na atividade dos osteoclastos, *in vitro*. A indometacina inibiu a reabsorção óssea por inibir a produção de PGE₂ e promover uma separação dos osteoclastos da superfície óssea, inserindo-se no periósteo (O'BRIEN *et al.*, 2001).

Pesquisas recentes, utilizando-se da biologia molecular, têm identificado genes que são especificamente requeridos para a diferenciação dos osteoblastos e formação óssea. Dois desses genes são *cbfa1* e *osterix*. O *cbfa1* é um membro da família RUNX dos fatores de transcrição e está envolvido na regulação de muitos genes específicos dos osteoblastos, incluindo a osteocalcina (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). O padrão de expressão tecidual do *cbfa1* é altamente restrito, e sua importância para o tecido ósseo é evidente em camundongos que não possuem o gene *cbfa1*, sendo que os mesmos apresentam falta de osteoblastos (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). Enquanto isso, camundongos que não expressão o gene *osterix* são caracterizados pela persistência de células mesenquimais indiferenciadas, além de também apresentarem falta de osteoblastos (NAKASHIMA *et al.*, 2002).

As PGs, segundo SIMON *et al.*, (2002), são necessárias para o reparo ósseo. Desta forma, os AINES podem ter alguma influência no processo de neoformação e reparo ósseo.

2.3. MECANISMO DE AÇÃO DOS AINES

Existem dois grupos de antiinflamatórios, aqueles associados ao hormônio glicocorticóide, e por isso denominados “esteroidais” e aqueles não relacionados com hormônios, denominados “não esteroidais” (LARA, 1998).

Os antiinflamatórios esteroidais (AIE) possuem eficácia mais elevada que os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) por inibirem a liberação do ácido araquidônico (AA), através do bloqueio da enzima fosfolipase A₂, impedindo, deste modo, a liberação de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (SEYMOUR & HEASMAN, 1988). Apesar do seu potencial terapêutico ser superior, tais drogas apresentam muitos efeitos colaterais como degeneração óssea e supressão da resposta imune, se administrados durante longos períodos, limitando sua utilização como agente antiinflamatório (KUEHL & EGAN, 1980).

Além das propriedades antiinflamatórias, os AINES possuem também ação analgésica e antipirética, agindo por meio de mecanismos farmacológicos distintos dos antiinflamatórios esteroidais (SEYMOUR & HEASMAN, 1988).

Os AINES produzem efeitos no metabolismo do ácido araquidônico (AA) através da inibição da síntese de determinados metabólitos, como as PGs, pelo bloqueio da via cicloxigenase (SALVI *et al.*, 1997). Tais mediadores químicos são capazes de iniciar e regular a resposta inflamatória e também estimular a reabsorção óssea em doenças osteolíticas (KLEIN & RAISZ, 1970).

Em determinadas situações que ocasionam lesão celular, a enzima fosfolipase A₂ é ativada e conseqüentemente há liberação de AA no interior das células envolvidas no processo inflamatório. Através da via cicloxigenase (COX ou prostaglandina H₂-sintetase) ou da via lipoxigenase (5-LOX), o AA, componente dos

fosfolipídios das membranas celulares e de complexos lipídicos, é transformado (VANE & BOTTING, 1995; COLLINS, 2000). Quando enzimaticamente oxidado pela via cicloxigenase, o AA forma cicloendoperóxidos intermediários instáveis (PGG₂ e PGH₂), levando posteriormente a síntese de prostanóides (prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PCs)) e tromboxanos (TBX). Através da via lipoxigenase, forma leucotrienos e ácido mono-hidroxi-eicosatetraenóico (HETE) (SEYMOUR & HEASMAN, 1988).

Os tecidos produzem eicosanóides de acordo com as necessidades e estímulos que o organismo recebe do meio exterior. São considerados mediadores e moduladores de todos os processos inflamatórios que acontece no organismo, além de participarem de inúmeros processos fisiológicos (LARA, 1998). As ações inflamatórias mais importantes dos metabólitos são a vasodilatação (PGI₂, PGE₁, PGE₂, PGD₂), vasoconstrição (TXA₂, LTC₄, LTD₄, LTE₄), aumento da permeabilidade vascular (LTC₄, LTD₄, LTE₄), quimiotaxia e aderência leucocitária (LTB₄, HETE, lipoxinas) (COLLINS, 1998). A natureza destes produtos biologicamente ativos será determinada pelo tecido em questão (KUEHL & EGAN, 1980).

Recentemente, isoenzimas da cicloxigenase têm sido relatadas sendo caracterizadas como COX-1 e COX-2, as quais são codificadas por diferentes genes (KUJUBU *et al.*, 1992). A COX-1 é denominada constitutiva e está presente em quase todas as células, sendo seus derivados responsáveis pela homeostasia, regulando atividades normais das células (LARA, 1998). Enquanto isso, a COX-2, denominada induzida ou patológica, é produzida em resposta a uma variedade de estímulos pró-inflamatórios como, por exemplo, as citocinas, fatores de crescimento

e lipopolissacarídeos bacterianos, tendo, portanto, sua quantidade aumentada substancialmente sob qualquer estímulo inflamatório (LARA, 1998).

Apesar da COX-1 ter sido caracterizada como construtiva por participar de eventos fisiológicos normais e da COX-2 ter sido descrita como resultante de reações inflamatórias (LARA, 1998), as pesquisas realizadas com o intuito de estudar o papel fisiológico dos produtos na cascata do ácido araquidônico deixam evidente que a ativação da COX-1 também tem seu papel na gênese da resposta inflamatória e, por outro lado, que a ativação da COX-2 nem sempre está associada a processos patológicos.

O papel da COX-2 nos fenômenos biológicos animais foi estudado através da técnica da biologia molecular por MORHAM *et al.* (1995). Camundongos nocautes que não apresentavam o gene para a COX-1 sobreviveram normalmente, porém os animais que não possuíam o gene para a COX-2, ou nasceram mortos ou com severos problemas renais e susceptíveis a desenvolver peritonite. Deste modo, os autores concluíram que a enzima COX-2 também participa em determinados processos fisiológicos. Assim como nesse estudo, OKADA *et al.* (2000) também sugeriram que a enzima COX-2 pode ser responsável por eventos fisiológicos normais, relatando em seu trabalho que camundongos com deficiência de COX-2 apresentaram menor densidade óssea quando comparados a animais normais.

Os antiinflamatórios não esteroidais que apresentam inibição preferencial para COX-2 podem apresentar atividade até 1000 vezes maior do que AINES não seletivos, que atuam também sobre a enzima COX-1. São exemplos desses inibidores seletivos para COX-2 o meloxicam, BF 389, DuP-697, SC 58125 e NS-398 (VANE & BOTTING, 1995). De acordo com MARNETT & KALGUTKAR (1999), a capacidade de tais inibidores sobre a síntese de PGs provenientes da COX-1 é

mínima ou mesmo inexistente. Além de agirem sobre os níveis de PGs, os AINES seletivos para COX-2 são também capazes de reduzir a taxa de IL-6, a intensidade do infiltrado inflamatório celular e a expressão de RNAm para COX-2 e IL-6, evidenciando o papel anti-citocina desta drogas (ANDERSON *et al.*, 1996).

Os metabólitos do ácido araquidônico têm sido relatados como importantes no processo de reparo ósseo, podendo estimular a formação óssea através da indução da osteoblastogênese (SUPONITZKY & WEINREB, 1998; KEILA *et al.*, 2001). Deste modo, os AINES podem interferir no reparo ósseo.

2.4. EFEITO DOS AINES NO REPARO ÓSSEO

Inúmeros trabalhos na literatura têm estudado o efeito de drogas sobre o reparo ósseo. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm sido descritos como inibidores da formação e do processo reparador do tecido ósseo (ALTMAN *et al.*, 1995; GIANNOUDIS *et al.*, 2001). Apesar de algumas evidências científicas tentarem explicar o real papel das enzimas COX-1 e COX-2 no metabolismo ósseo, a ação de tais enzimas ainda permanece um pouco obscura.

SATO *et al.* (1997) relataram tanto a COX-1 como a COX-2 podem estar envolvidas com o processo de osteogênese em seus estágios iniciais e que a COX-2 esteja mais associada à maturação osteoblástica nos estágios posteriores decorrentes da formação óssea. Trabalhos recentes têm mostrado que a enzima COX-2, inibida durante o mecanismo de ação dos AINES, apresenta importante influência tanto na formação óssea endocondral como intramembranosa durante o processo de reparo (ZHANG *et al.*, 2002).

O efeito inibitório dos AINES, já descrito em alguns trabalhos é, no entanto, dependente da dosagem do medicamento utilizado, (HO *et al.*, 1995) e do período de administração da droga e da quantidade utilizada (YAZDI *et al.*, 1992), podendo tais medicamentos não exercer efeito algum sobre o processo de reparo (BICHARA *et al.*, 1999) ou até aumentar a formação óssea dentro de alguns delineamentos experimentais (YAZDI *et al.*, 1992).

Com o objetivo de avaliar o efeito dos AINES em ratos na formação óssea induzida por matriz óssea desmineralizada, YAZDI *et al.* (1992) utilizaram ácido acetilsalicílico, acetaminofeno, ibuprofeno, indometacina, piroxicam e flurbiprofeno em períodos e concentrações diferentes. Nos grupos tratados com AINES previamente à colocação da matriz, as drogas começaram a ser administradas três dias antes do procedimento, enquanto que os grupos pós-tratados começaram a receber as drogas três dias após a colocação da matriz. Em ambos os grupos os antiinflamatórios foram administrados via subcutânea, diariamente, durante 14 dias, a partir do primeiro dia de tratamento. As avaliações foram realizadas através de análise histológica e bioquímica. Nos animais tratados previamente com AINES foi verificado que as drogas podem tanto inibir como estimular a formação óssea, dependendo do tipo e quantidade das mesmas. A indometacina (4 mg/Kg) foi a droga que mais inibiu a formação óssea, sendo que o piroxicam (4 mg/Kg) gerou o mesmo resultado, porém em menor intensidade que a primeira. O flurbiprofeno foi inibidor da formação óssea somente na concentração de 8 mg/Kg, pois em doses mais baixas (0,02; 0,4 e 4 mg/Kg) não apresentou efeito. Ainda com relação ao grupo que iniciou o tratamento previamente à colocação da matriz, houve aumento na formação óssea com a administração de acetaminofeno (50 mg/Kg), ácido acetilsalicílico (50 mg/Kg) e ibuprofeno (50 mg/Kg). Com relação aos ratos tratados

com AINES após a implantação da matriz, mesmo não havendo diferença significativa entre o grupo controle e o experimental, houve boa osteoindução nos grupos tratados com indometacina (4 mg/Kg), piroxicam (4 mg/Kg) e flurbiprofeno (4 mg/Kg). Os resultados observados sugerem que eventos prévios à formação óssea sejam modulados por metabólitos do ácido araquidônico.

As observações desse trabalho comparadas com àquelas obtidas por WILLIAMS *et al.* (1985), que mostraram que baixas doses de flubiprofeno inibem a reabsorção óssea, indicam que o processo de reabsorção pode ser mais sensível aos metabólitos do ácido araquidônico do que o processo de formação óssea. Além disso, outros mediadores podem estar envolvidos nesses processos.

ALTMAN *et al.*, (1995), realizaram um estudo avaliando o efeito de duas drogas antiinflamatórias não esteroidais no reparo de fraturas femorais em ratos. Ibuprofeno (30 mg/Kg/dia) e indometacina (1 mg/Kg/dia) foram administrados via oral durante um período de 4 a 12 semanas, sendo que o grupo controle não recebeu medicação. A avaliação do reparo foi feita através de teste mecânico e análise histológica qualitativa. Ambas as drogas atrasaram o reparo da fratura óssea, havendo diferença significativa no teste mecânico entre o grupo controle e o experimental após 10 semanas de administração dos antiinflamatórios. Foi verificado também, através da avaliação histológica, que as drogas ocasionaram atraso na maturação do calo ósseo. Após a interrupção da administração dos medicamentos, o efeito inibitório no reparo da fratura foi revertido no caso da indometacina, mas não para o ibuprofeno.

Em 1995, HO *et al.* avaliaram o efeito do ketorolac e da metilpredinisolona no reparo de defeitos ósseos confeccionados na ulna de coelhos associados à enxertos de matriz óssea desmineralizada. A terapia medicamentosa foi

estabelecida por um período de 6 semanas. Duas dosagens do antiinflamatório foram utilizadas diariamente (2 e 4 mg/Kg), de acordo com o grupo. O grupo tratado com metilpredinisolona (1 mg/Kg) recebeu o medicamento semanalmente, enquanto o grupo controle não recebeu tratamento. Animais tratados com metilpredinisolona apresentaram redução de suas propriedades mecânicas, já que esta droga inibiu a resistência óssea no local da fratura. Foi verificado que o ketorolac inibe o reparo e a remodelação óssea, porém esse efeito foi maior nos animais que receberam o medicamento em maior dosagem. Após análise biomecânica, os autores concluíram que o efeito inibitório do ketorolac no reparo ósseo é dose dependente.

Um estudo realizado por SATO *et al.* (1997) sugeriu que tanto as enzimas COX-1 como as COX-2 podem estar envolvidas com a osteogênese em seus estágios iniciais e que a COX-2 esteja mais associada à maturação dos osteoblastos nos estágios posteriores. Observações na cavidade medular de tíbias de ratos mostraram que após a injeção de colchicina, indutora da osteogênese, a expressão gênica de ambas as enzimas foi elevada nos estágios iniciais, antes do começo da formação óssea. Apenas a expressão do gene da COX-2 apresentou-se elevada no início da formação óssea. Além disso, a administração diária de indometacina reduziu a indução óssea da colchicina nas tíbias dos ratos, indicando a relação entre as PGs e ao processo de osteogênese.

Em 1998, HO *et al.* estudaram os efeitos do ketorolac (2 mg/Kg ou 4 mg/Kg) e da metilpredinisolona (1 mg/Kg) no processo de reparo ósseo através da análise de radiografias tomadas 2, 4 e 6 semanas após a fratura óssea. Matriz óssea desmineralizada foi enxertada nos defeitos ósseos confeccionados em ulnas de coelhos. As drogas foram administradas por um período de 6 semanas após a fratura. Comparando os resultados observados no grupo que recebeu ketorolac com

o controle, foi verificado que não houve diferença estatística significativa na mineralização e união óssea entre os grupos. No entanto, no grupo que recebeu metilprednizolona foi verificada supressão em ambos os parâmetros. Avaliando a mineralização decorrente do reparo ósseo, pôde ser observado que o grupo controle e o tratado com ketorolac (2 mg/Kg) apresentaram aumento da taxa de mineralização entre a segunda e a quarta semana, enquanto os grupos tratados com ketorolac (4 mg/Kg) e metilprednizolona (1 mg/Kg) não mostraram tal aumento. Deste modo, na dosagem de 4 mg/Kg, o ketorolac inibe o processo de reparo ósseo endocondral, entre a segunda e a quarta semana do experimento.

Dentro da área da periodontia, o sucesso da neoformação óssea é comprometido pela rápida formação de tecido conjuntivo frouxo no local a sofrer o reparo (GOMES, 1998). Com o intuito de repovoar o defeito ósseo com o tipo de tecido desejado, estudos em animais têm sido realizados possibilitando a exclusão de células indesejáveis e favorecendo a regeneração tecidual específica (NYMAN, 1991). Muitos autores têm relatado a necessidade de algum tipo de preenchimento do defeito ósseo, isto é, de uma barreira física para que seja impedido o colapso de tecido mole no interior dos mesmos (LINDE *et al.*, 1993). Deste modo, a rápida formação de tecido conjuntivo é prejudicada e isso possibilita uma neoformação e reparação óssea satisfatória (LINDE *et al.*, 1993; BOSCH *et al.*, 1995). Deste modo, o osso revela um grande potencial de regeneração, sendo capaz de curar defeitos locais ou fraturas com estruturas idênticas às originais, sem deixar cicatriz (BERNE R. M. & LEVY, M. N., 1990; HARISSON, T. R., 1996).

Baseados neste contexto, BICHARA *et al.* (1999) demonstraram o efeito do naproxeno, administrado duas vezes ao dia na dosagem de 500 mg, durante uma semana, no tratamento de defeitos intra-ósseos após cirurgia periodontal para

colocação de membranas. As avaliações foram realizadas a partir de mensurações de parâmetros clínicos como índice de placa, índice gengival, mobilidade dental, profundidade de sondagem, recessão gengival e nível clínico de inserção obtidas antes e após o tratamento. Foi utilizado um stent de acrílico para auxiliar na mensuração dos parâmetros analisados. Radiografias periapicais realizadas após nove meses foram utilizadas como instrumento coadjuvante na análise dos resultados. Avaliações realizadas depois de nove meses mostraram que o grupo que recebeu naproxeno não apresentou maior preenchimento ósseo nos defeitos quando comparado ao grupo que apenas recebeu a membrana.

Em um estudo utilizando linhagem de células osteoblásticas, foi verificada a ação da aplicação contínua de PGE₂ em alta e baixa concentração (1 microg/ml e 1 ng/ml, respectivamente) e de indometacina (1 microg/ml) na diferenciação, proliferação e mineralização dessas células. A linhagem celular tratada com indometacina apresentou aumento na atividade da fosfatase alcalina, enzima secretada por osteoblastos durante o processo de maturação e mineralização da matriz óssea. No grupo que recebeu o AINES também ocorreu maior acúmulo de cálcio, fosfato inorgânico e hidroxiprolina, parâmetros indicativos de maior maturação do processo de mineralização e de maior diferenciação osteoblástica. Segundo os autores, a indometacina aumenta a atividade da fosfatase alcalina e a taxa de tecido mineralizado na cultura de células osteoblásticas provavelmente por inibir a produção de PGE₂. Além disso, a supressão da mineralização pela PGE₂ ocorre nos estágios iniciais deste processo (KAJII *et al.*, 1999).

HO *et al.* (1999), avaliaram os efeitos das prostaglandinas (PGE₁ e PGE₂), e dos AINES (indometacina e ketorolac) nas atividades celulares em culturas de osteoblastos derivados de calvárias fetais. Foi verificado que as PGE₁ e PGE₂ e os

AINES inibem a síntese de DNA e mitose celular em tempo e concentração dependentes. Deste modo, como a proliferação osteoblástica é inibida tanto pelas PGs como pelos antiinflamatórios, os autores sugerem que o efeito inibitório do ketorolac e da indometacina no reparo e na remodelação óssea pode não ocorrer através da inibição da síntese de PGs. Porém, a atividade intracelular de fosfatase alcalina e o conteúdo de colágeno tipo I foi estimulado nos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica tanto pelos AINES quanto pela PGE₂. Os autores sugeriram que PGs e AINES podem estar envolvidos na maturação e mineralização óssea nos estágios iniciais de diferenciação osteoblástica e que o efeito do ketorolac e indometacina na proliferação e diferenciação celular pode não ser mediado pelas PGE₁ e PGE₂.

GIANNOUDIS *et al.* (2001) realizaram um estudo que avaliou os fatores que poderiam estar relacionados à não união de fraturas no fêmur, dentre eles, o uso de AINES. Dos pacientes avaliados, 67 apresentaram e 32 não apresentaram união da fratura óssea. Os autores verificaram que houve associação entre o uso de AINES pelos pacientes após a injúria e ausência de reparo nas fraturas. Atraso no reparo foi observado naqueles pacientes que usaram AINES, mas cujas fraturas tornaram-se unidas.

Existem AINES que bloqueiam seletivamente a COX-2 e apresentam baixa toxicidade para o estômago e rins reduzindo, deste modo, efeitos adversos como perfurações, ulcerações e hemorragias gastrointestinais. Assim, eles podem promover efeitos sobre o reparo ósseo por inibir os efeitos das PGE₂, relacionadas aos estímulos inflamatórios (LARA, 1998; ANDRADE, 2000).

Indometacina e celecoxib (sendo este último, AINES seletivo para COX-2), ambos na dosagem de 10 mg/Kg, foram administrados via oral, diariamente,

durante oito semanas, de acordo com o grupo experimental, após fratura na espinha dorsal de coelhos. Os animais tratados com AINES apresentaram menor taxa de fusão da fratura óssea quando comparados ao grupo controle, o qual recebeu solução salina, oralmente, durante o mesmo período. Através de análise por palpação, a fusão óssea ocorreu em 64%, 45% e 18% dos animais, respectivamente nos grupos em que foi administrada solução salina, celecoxib e indometecina, havendo diferença estatística apenas quando foi administrada indometacina. Observações semelhantes foram demonstradas através da avaliação radiográfica e histológica, sendo que o grupo que recebeu indometacina apresentou menor taxa de união óssea que os demais grupos, não havendo diferença estatística significativa entre o grupo controle e o tratado com celecoxib. Os resultados sugerem que o celecoxib não inibe de forma significativa a fusão óssea espinal. Segundo os autores, o efeito inibitório dos AINES no reparo ósseo é provavelmente ocasionado pela inibição da COX-1 (LONG *et al.*, 2002).

A ação do diclofenaco sódico sobre o reparo de fraturas nas tíbias de ratos foi avaliada por AKMAN *et al.* (2002). Após a confecção das fraturas, durante dez dias, foi administrado 1 ou 2 mg do medicamento, via intramuscular, de acordo com o grupo experimental, enquanto que o grupo controle não recebeu medicamento. Os animais foram sacrificados após duas, quatro e seis semanas para realização de análises radiográfica, clínica e histológica. A análise clínica dos animais sacrificados após duas semanas mostrou que o grupo controle apresentou maior estabilidade no calo ósseo quando comparado aos dois grupos submetidos ao tratamento. Radiograficamente,

pôde ser observada diferença entre os grupos controle e tratados, porém não significativa. Histologicamente, não foram observadas diferenças entre os grupos na formação do reparo ósseo.

Apesar de ambas as enzimas, COX-1 e COX-2, terem sido identificadas nas células osteoblásticas (SATO *et al.*, 1997), as diferenças existentes entre o papel das mesmas na formação óssea ainda não estão muito claras. Deste modo, a ação da cicloxigenase na remodelação óssea tem sido recentemente estudada através de pesquisas que se utilizam animais geneticamente deficientes de COX-1 ou COX-2 (MORHAM *et al.*, 1995; LANGENBACH *et al.*, 1995).

Apesar da similaridade tanto histológica quanto molecular no desenvolvimento ósseo fetal e no processo de reparo, a inflamação das áreas a sofrerem reparo não está presente no processo normal de desenvolvimento. Para determinar a ação da COX-2 no reparo de fraturas, foi realizado um estudo onde ratos eram tratados com celecoxib e rofecoxib, AINES inibidores seletivos da COX-2 (SIMON *et al.*, 2002). Exames radiográficos, mecânicos e histológicos mostraram falta de reparo nas fraturas dos animais que receberam tais medicamentos. O mesmo ocorreu para animais que não possuíam a COX-2 por não expressarem o gene da mesma. Portanto, os autores relatam que a atividade da COX-2 é necessária para que ocorra reparo ósseo e acreditam que o efeito das drogas estudadas seja ocasionado pela inibição da COX-2 e não por outros efeitos locais dos medicamentos. Observações histológicas, confirmando os resultados descritos anteriormente, sugerem que a COX-2 seja necessária para a ossificação endocondral durante o reparo de fraturas. Além disso, os resultados sugerem que o desenvolvimento ósseo fetal e o reparo de fraturas ocorram através de diferentes mecanismos, já que ratos com ausência de COX-2 apresentaram formação normal

do esqueleto. Isso indica que a função da COX-2 é especificamente essencial para o reparo de fraturas ósseas (SIMON *et al.*, 2002).

ZHANG *et al.* (2002) realizaram um estudo para verificar o papel das isoformas da COX sobre a ossificação endocondral e intramembranosa. Para a avaliação sobre o reparo ósseo endocondral, fraturas ósseas confeccionadas em tíbias de camundongos nocautes, que não expressavam o gene para a COX-1 ou para a COX-2, foram avaliadas através de radiografias tomadas após 7, 14 e 21 dias da confecção do defeito e comparadas com o reparo presente nos animais controle. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa, aos 14 dias, na calcificação do calo ósseo quando comparado o grupo controle com aquele sem o gene para COX-2, sendo que este apresentou menor calcificação. Aos 21 dias, também foi verificada diferença significativa na união óssea entre o grupo controle e aquele com ausência de COX-2, sendo tal união observada em quase todos os animais do grupo controle. Não foi constatada diferença entre o grupo controle e o grupo que não expressava o gene para COX-1 em nenhum dos períodos avaliados. A fim de estudar o reparo dependente da ossificação intramembranosa, os autores deste estudo utilizaram dois modelos experimentais. No primeiro modelo, foi avaliado o processo de reparo em animais controle e nocautes seguido de perda óssea inflamatória, a qual foi ocasionada pela inserção de partículas de titânio sobre a calvária. Após 10 dias, foi observado, nos animais que não expressavam o gene para a COX-2, 75% de redução na neoformação óssea na área adjacente à região de reabsorção, corroborando os achados em outros estudos (ZHANG *et al.*, 2001). No outro modelo experimental utilizado para avaliação do processo de reparo ósseo intramembranoso, a formação óssea foi examinada seguida da injeção de FGF-1, durante três dias, na calvária de

camundongos nocautes e normais. A osteogênese foi avaliada histomorfometricamente e por hibridização *in situ*. A formação óssea foi reduzida em 67% nos animais que não expressavam o gene para COX-2 quando comparados com o grupo controle, enquanto nenhum defeito foi observado nos animais sem COX-1. De acordo com esses resultados, na hibridização *in situ* para osteocalcinina, a expressão do gene mostrou-se diminuída em animais com ausência de COX-2 quando comparados aos controle. Esses resultados demonstraram que a COX-2 é requerida tanto na ossificação endocondral quanto na intramembranosa durante o processo de reparo, enquanto que a COX-1 não possui papel crítico neste processo.

Ainda com relação aos experimentos realizados no trabalho descrito anteriormente, ZHANG *et al.*, (2002) observaram, em culturas de células de medula óssea derivadas de animais nocautes e controle, a diferenciação osteoblástica das células a partir de sinais osteogênicos. Após 21 dias, na cultura celular derivada de animais com ausência de COX-2, foi observado menor número e área de nódulos ósseos, não havendo diferenças significativas para as culturas de células provenientes de animais controle ou sem COX-1. A adição de PGE₂ à cultura celular com ausência de COX-2 restaurou a formação de nódulos ósseos a níveis compatíveis com os observados em células controle. Objetivando avaliar se a COX-2 é requerida na indução da formação óssea por BMPs, foi adicionada BMP-2 às culturas celulares controle e que não apresentavam gene para a COX-2, sendo observada indução da formação óssea similar em ambas as culturas. Porém, em culturas contendo tanto PGE₂ quanto BMP-2 foi verificado aumento na formação de nódulos ósseos, quando comparadas às culturas que apenas continham BMP-2, sugerindo que a COX é necessária para que haja máxima osteogênese na presença de sinais osteogênicos.

Fatores de transcrição como *cbfa-1* e *osterix* exercem papel fundamental na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). Através da técnica de PCR, a presença destes genes foi examinada em culturas celulares de medula óssea derivadas de animais desprovidos de COX-2 e normais. Foi observada redução significativa de *cbfa-1* e *osterix* na cultura celular sem COX-2, sendo que após a administração de PGE₂, a expressão destes genes retorna a níveis semelhantes aos obtidos no grupo controle, ocorrendo expressão máxima deste genes, quando da adição de BMP-2 à PGE₂. De acordo com os resultados, a presença de COX-2 é importante para que haja expressão adequada dos genes *cbfa-1* e *osterix*, críticos no processo de formação óssea associada ao reparo (ZHANG *et al.*, 2002).

O efeito dos AINES no processo de reparo ósseo em fraturas de tíbias de ratos também foi avaliado por GIORDANO *et al.* (2003) utilizando tenoxicam. Enquanto o grupo controle recebeu 0,1 ml de solução salina, os grupos experimentais receberam tenoxicam (10 mg/Kg), diariamente, via intramuscular. A droga começou a ser administrada previamente à fratura, de uma semana a 48 horas antes da mesma, dependendo do grupo experimental. Houve diferença significativa entre os animais submetidos ao tratamento e àqueles que não receberam a droga. Análises histológicas e histométricas mostraram que os grupos que receberam o AINES apresentaram atraso na formação do calo ósseo, tanto quantitativa quanto qualitativamente e esse resultado foi mais acentuado no grupo que iniciou a administração da droga uma semana antes da fratura. Os autores sugerem que a administração da droga anteriormente ao surgimento de fraturas ósseas atrasa o processo de reparo, apesar de não ter sido detectada diferença estatística significativa.

Em um estudo recente, realizado por GERSTENFELD *et al.* (2003), foram mensuradas as alterações ocorridas em 42 dias na expressão de mRNAs de COX-1 e COX-2 no processo de reparo de fraturas ósseas confeccionadas no fêmur de ratos. Além disso, os autores compararam os efeitos de um AINES não seletivo, o ketorolac, com os observados através do uso de um AINES seletivo para COX-2, o parecoxib, sobre o processo de reparo ósseo. O RNA total foi obtido antes da fratura e 1, 3, 5, 7, 14, 21, 35, e 42 dias após a fratura óssea, sendo que os níveis de mRNAs de COX-1 e COX-2 foram mensurados através de PCR. Enquanto os níveis de mRNA de COX-1 permaneceram constantes durante o período de 21 dias, os níveis de mRNA de COX-2 apresentaram picos de elevação durante os primeiros 14 dias de reparo, retornando à níveis basais aos 21 dias. As propriedades mecânicas do calo ósseo foram avaliadas aos 21 e 35 dias após a confecção da fratura. Em ambos os períodos, o grupo tratado com ketorolac mostrou resistência e rigidez mecânica significativamente menor, quando comparado ao grupo controle. Os animais tratados com parecoxib apresentaram, aos 21 dias, menor rigidez e resistência no local da fratura quando comparados aos animais do grupo controle, sendo que essa diferença não foi estatisticamente significativa. Através da análise física, foi observado que 25% dos animais do grupo tratado com ketorolac e 8% dos tratados com parecoxib apresentaram união óssea incompleta, sendo que em ambos os grupos, aos 35 dias, pôde ser verificado fechamento total da fratura. Histologicamente, aos 21 dias, foi verificado que o calo ósseo do grupo que recebeu ketorolac apresentava quantidade substancial de cartilagem residual, enquanto nos demais grupos, controle e tratado com parecoxib, não foi observada presença de tal tecido cartilaginoso. De acordo com os resultados, os dois AINES utilizados no experimento foram capazes de inibir o processo de reparo ósseo no modelo animal

utilizado, sendo a inibição gerada pelo ketorolac mais pronunciada. Segundo os autores, ambos os tipos de AINES causam apenas um pequeno efeito inibitório sobre o reparo ósseo, mesmo sendo utilizados em doses que inibem completamente a produção de PGs.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, histologicamente e histometricamente, o efeito do meloxicam, uma droga antiinflamatória não esteroidal seletiva para a cicloxigenase-2, administrada sistemicamente, sobre o reparo ósseo de defeitos confeccionados na calvária de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS UTILIZADOS

No experimento foram utilizados 36 ratos machos, adultos (10 semanas de vida), da espécie *Norvegicus albinus*, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 350, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp. Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas no biotério da FOP-Unicamp, sob as mesmas condições ambientais, em sala climatizada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), e com ciclo claro/escuro de 12/12 h. Receberam, durante todo o período, ração para animais de laboratório (Purina) e água "ad libitum". Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Bioterismo da UNICAMP (CEMIB), certificado sob o protocolo 528-1.

4.2. ANTIINFLAMATÓRIO

Foi utilizado no experimento um agente antiinflamatório não esteroide, o Meloxicam[®] (Movatec[®], Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda., Itapeverica da Serra, SP, Brasil). A dosagem consistiu em 3mg/kg de peso do medicamento, aplicado de forma injetável, via subcutânea, diariamente, nos períodos de 15 e 45 dias.

4.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO E CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS

Após a sedação inicial com éter sulfúrico os animais foram anestesiados, de acordo com o peso corpóreo, através de injeção intramuscular de cloridrato de xylasina (Virbaxyl®2% - Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA - 0,3 ml/Kg) e ketamina (Francotar® - Virbac do Brasil Ind. e Com. LTDA - 1ml/Kg). Depois de realizada a tricotomia da região dorsal do crânio do animal, foi feita assepsia vigorosa para a cirurgia. Em seguida, a pele, o tecido subcutâneo e o periósteo foram seccionados e afastados lateralmente através de uma incisão mediana de 15 mm na calvária do animal (FIG. 1a e b).

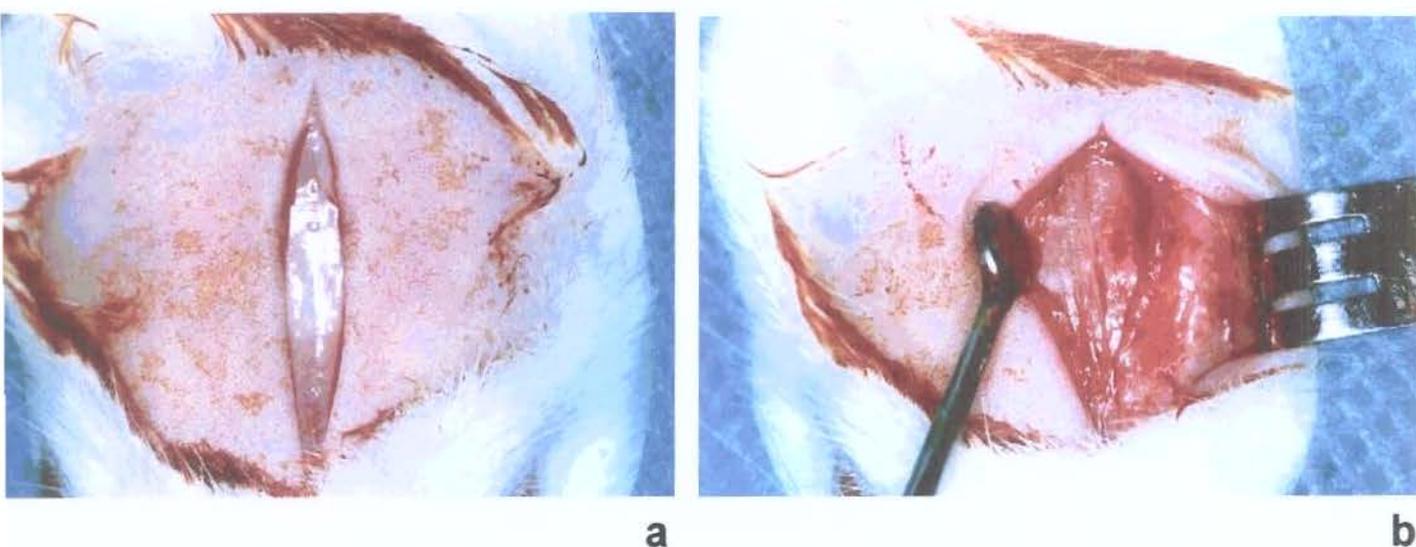


FIGURA 1 – Fotografia da incisão (a) e afastamento do periósteo e do tecido subcutâneo expondo os ossos parietais (b).

Após exposição dos ossos parietais e localização da sutura mediana, foram confeccionados em cada animal dois defeitos ósseos, um do lado esquerdo e outro do lado direito, preservando o osso sagital médio, com uma broca trefina (3i[®] Implantes Innovations do Brasil Ltda) de 4 mm de diâmetro, montada em contra-ângulo de baixa rotação sob irrigação constante com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (Glicolabor[®] - Indústria Farmacêutica – São Paulo/Brasil), para se evitar aquecimento excessivo do tecido ósseo (FIG.3a e b). Durante a confecção dos defeitos, foi evitada a exposição da dura-máter, para não causar danos ao cérebro dos animais. Após a confecção dos defeitos ósseos, o periósteo foi reposicionado e a pele foi suturada com fio de nylon 4-0 monofilamentado (Ethicon[®] - Johnson & Johnson Produtos Profissionais LTDA). Durante o período pós-operatório de quatro dias, os animais receberam dipirona 20mg/Kg para analgesia, via gavagem.

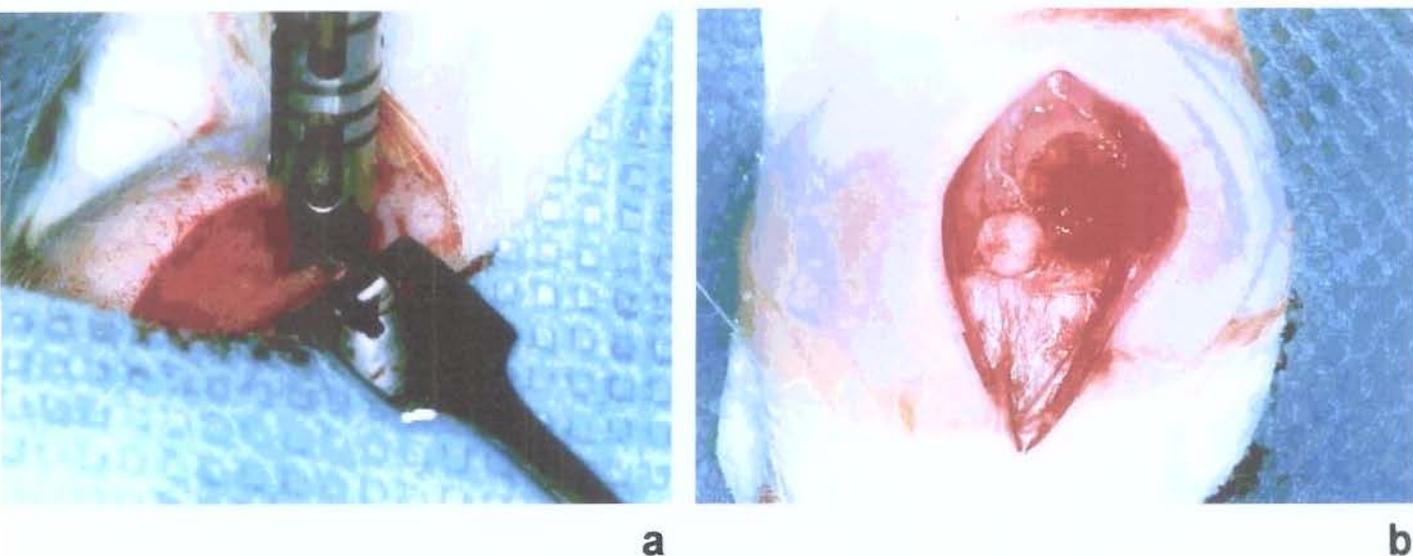


FIGURA 2 – Fotografia da confecção do defeito com utilização de broca trefina de 4 mm de diâmetro (a) e remoção do tecido ósseo (b).

Posteriormente, foram organizados quatro grupos nos quais os ratos foram distribuídos aleatoriamente (TAB.1).

Tabela 1. Grupos experimentais

Grupos (n=09)	Período de administração (dias consecutivos)	Via de administração	Dosagem
IA- Controle – Solução NaCl 0,9% Esterelizada	15	Subcutânea	1 ml/Kg de peso
IB- Controle – Solução NaCl 0,9% Esterelizada	45	Subcutânea	1 ml/Kg de peso
IIA-Teste- Movatec®	15	Subcutânea	3 mg/Kg de peso
IIB-Teste- Movatec®	45	Subcutânea	3 mg/Kg de peso

4.4. ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA

Os animais foram sacrificados, por meio de inalação com halotano em campânulas hipersaturadas, nos períodos pré determinados para cada grupo, isto é, 15^o e 45^o dia pós-operatório. Os ratos foram pesados imediatamente antes ao sacrifício. Após tal procedimento, os defeitos confeccionados foram removidos através de ostectomia com broca tronco-cônica 701, montada em baixa rotação sob irrigação com soro fisiológico. As peças coletadas foram processadas rotineiramente em laboratório através da fixação em formol a 4 % em tampão fosfato (pH 7,2 - 7,4). A descalcificação foi realizada em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais (solução de Morse). Segundo o procedimento laboratorial de rotina, o descalcificador foi renovado a cada três dias por seis semanas. Ao final desse período, o osso já fixado e descalcificado, foi desidratado em álcool e diafanizado em xilol. As amostras foram divididas ao meio, de forma a fornecer

cortes coronais do centro da cavidade óssea cirúrgica, para depois serem incluídas em parafina e secções seriadas com 6 µm de espessura, no sentido coronal, foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina, para análise em microscopia de luz.

Após a obtenção das lâminas com os cortes devidamente corados, foram realizados os exames histológicos e histométricos.

Na análise de microscopia de luz foi avaliada a intensidade de reação inflamatória e os eventos do reparo ósseo, tais como, necrose, hemorragia, atividade osteoclástica e osteoblástica, presença de tecido conjuntivo e maturação óssea.

Para essa análise foi utilizado o microscópio Leica na objetiva para aumento de 50 vezes. Os cortes histológicos foram avaliados através do Sistema de Cruzes, onde os parâmetros de análise observados nas lâminas eram quantificados subjetivamente através de pontos (de zero a três), de acordo com sua frequência ou intensidade. A avaliação em Cruzes é um critério semi-quantitativo utilizado para comparar a magnitude das alterações das estruturas analisadas. Assim temos: uma cruz (+), alteração discreta; duas cruzes (++) , alteração moderada; três cruzes (+++) , alteração intensa, (0) ausência de alteração (SANADA *et al.*, 2003).

Os eventos histológicos utilizados como parâmetros para essa análise foram: intensidade da reação inflamatória, neoformação de vasos sanguíneos, espessura do tecido conjuntivo formado na região do defeito cirúrgico, espessura das fibras colágenas presentes no tecido conjuntivo, presença de quadros hemorrágicos e sua intensidade, quantidade de células presentes no tecido conjuntivo encontrado no centro do defeito e nível de organização tecidual na região da cavidade cirúrgica. Além disso, outros eventos como neoformação óssea e características das células envolvidas nesse processo foram analisados.

Para a análise histométrica, as lâminas foram avaliadas através do microscópio de luz na objetiva para aumento de 2,5 vezes, utilizando o programa para análise de imagens Image-Pro[®], Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA. Foram realizadas medidas lineares do remanescente do defeito em milímetros. Para cada animal foram selecionados vinte cortes histológicos, distribuídos em intervalos uniformes, de modo que toda a região do defeito ósseo, do início ao fim, fosse mensurada.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos controle e experimental foram feitas pela Análise de Variância Bifatorial em nível de probabilidade de erro de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os resultados obtidos na análise histológica através do Sistema de Cruzes estão presentes na TAB. 2 (em anexo).

De acordo com as observações visualizadas, pôde ser realizada a análise histológica descritiva que segue abaixo:

GRUPO CONTROLE - PERÍODO DE 15 DIAS:

A região onde foi realizado o defeito cirúrgico encontrou-se recoberta por uma espessa faixa de tecido conjuntivo, na qual foi possível evidenciar junto a sua baixa organização, a presença de fibras colágenas finas, alto nível de celularidade (fibroblastos e miofibroblastos), intensa neoformação vascular e forte infiltrado inflamatório (linfócitos, macrófagos e leucócitos) seguido de processos hemorrágicos. Essas observações caracterizam um tecido na fase inicial de formação do tecido de granulação.

Foi observada, em todos os defeitos cirúrgicos, neoformação óssea advinda das extremidades laterais do defeito e formação de ilhas ósseas (FIG.3) na maioria deles. Sobre o osso neoformado foi verificada a presença de osteoblastos com aspecto cubóide a cilíndrico (FIG.4), indicando a alta atividade em que se apresentavam para a síntese de matriz óssea.

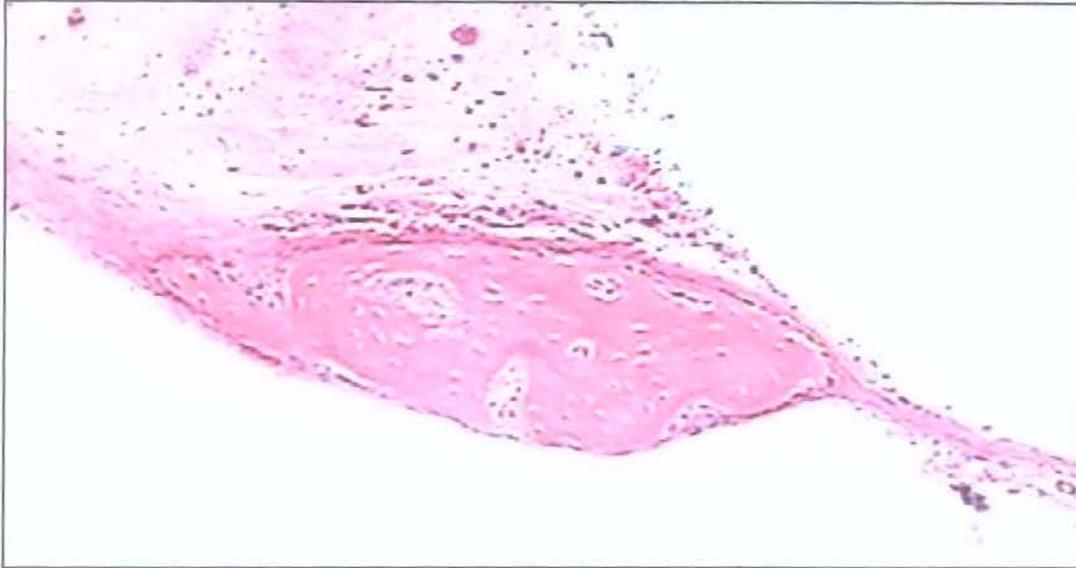


FIGURA 3 – Fotomicrografia do grupo controle no período de 15 dias, ilustrando a presença de ilha óssea na região onde foi confeccionado o defeito cirúrgico. Aumento original X 25.



FIGURA 4– Fotomicrografia do grupo controle no período de 15 dias, ilustrando a extremidade lateral do defeito onde houve neoformação óssea. A seta indica a presença de osteoblastos cubóides sobre o osso neoformado. Aumento original X 125.

GRUPO CONTROLE - PERÍODO DE 45 DIAS:

Nas amostras deste grupo pôde ser observada, sobre a região onde foi realizado o defeito cirúrgico, a presença de uma fina camada de tecido conjuntivo denso altamente organizado (espessas fibras colágeno do tipo I e presença de fibrócitos) (FIG.5). Essas evidências histológicas, associadas à ausências de quadros hemorrágicos, mínima presença de células inflamatórias e normalização dos níveis de vascularização tecidual, caracterizam classicamente as fases avançadas do processo de reparação tecidual. Alguns animais apresentaram formação de ilhas de tecido ósseo.

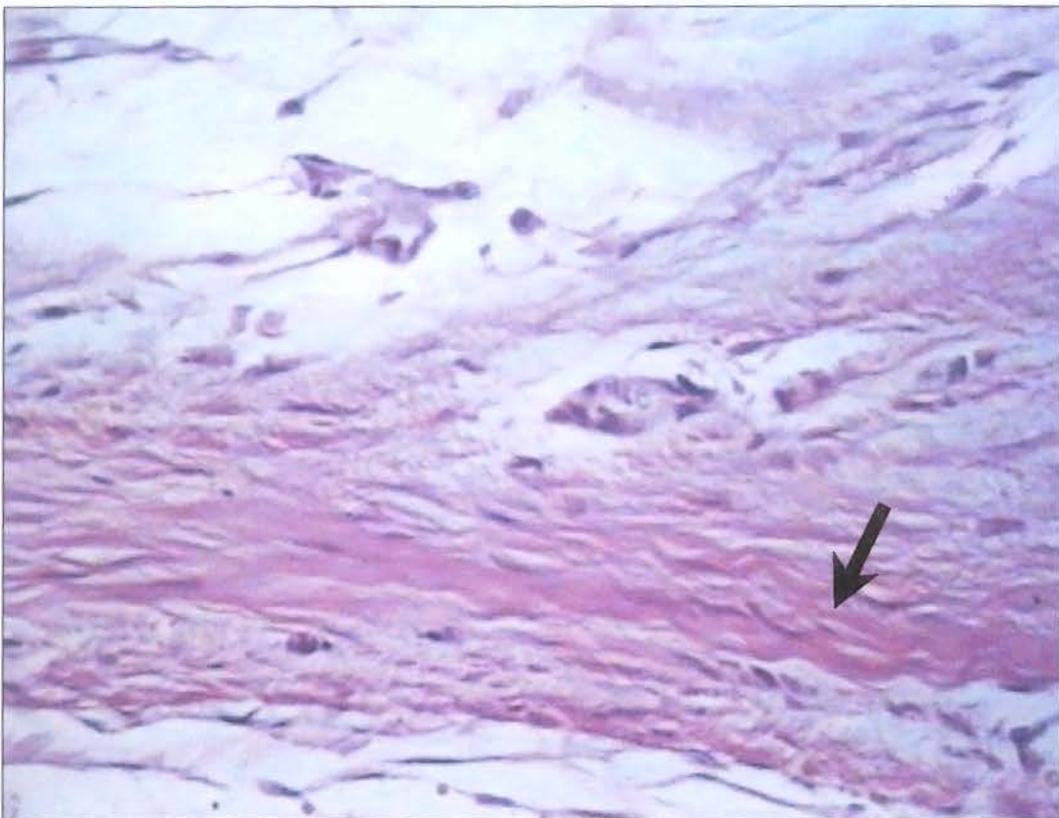


FIGURA 5 – Fotomicrografia do grupo controle no período de 45 dias ilustrando o tecido conjuntivo organizado. A seta indica a presença de fibras colágenas espessas. Aumento original X 125.

GRUPO TRATADO – PERÍODO DE 15 DIAS:

Foi observada a presença de uma fina camada de tecido conjuntivo pouco organizado sobre a área do defeito cirúrgico. Nesta faixa é possível evidenciar, em meio a um tecido formado por finas fibras colágenas com quantidade regular de fibroblastos e miofibroblastos, quadros de hemorragias discretas, angiogênese intensa e pequeno infiltrado inflamatório. Houve formação de algumas ilhas ósseas.

Neste grupo, os osteoblastos presentes sobre o tecido ósseo neoformado apresentaram-se pavimentosos, já que perderam grande parte da síntese protéica para produção de osteóide.

GRUPO TRATADO – PERÍODO DE 45 DIAS:

Nas amostras deste grupo observou-se a presença de uma fina camada de tecido conjuntivo bem organizado onde foi possível observar a presença de alguns fibrócitos em meio às fibras colágenas finas. Pôde ser também evidenciada a presença de focos hemorrágicos esporádicos, vascularização tecidual normal e mínimo infiltrado inflamatório.

Os osteoblastos encontrados sobre o tecido ósseo neoformado nas amostras deste grupo também se apresentaram com aspecto pavimentoso, demonstrando a reduzida produção de matriz óssea. Pôde ser observada a presença de ilhas de tecido ósseo em alguns dos animais

5.2. ANÁLISE HISTOMÉTRICA:

A partir dos valores obtidos na mensuração linear do remanescente do defeito ósseo, foi calculada a média para cada grupo e realizada a análise estatística. Os resultados referentes ao tratamento utilizado, bem como aos períodos de administração do meloxicam ou de solução salina estão apresentados na TAB.3.

Foi observado que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos utilizados, isto é, entre os grupos que receberam meloxicam e aqueles que receberam solução salina, tanto no período de 15 quanto no período de 45 dias ($p < 0,05$), como verificado na FIG.6. Porém, não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação ao período experimental de 15 e 45 dias, apesar de ter sido observada uma tendência numérica de redução do defeito aos 45 dias tanto no grupo controle quanto no tratado com a droga, quando comparados aos respectivos grupos no período de 15 dias ($p < 0,05$).

TABELA 3. Média linear e desvio padrão do remanescente de defeito ósseo (mm) dos grupos controle e tratados com meloxicam nos períodos de 15 e 45 dias.

Período (dias)	Grupo Controle	Grupo Tratado
15	1,78±0,23 A	2,30±0,29 B
45	1,61±0,55 A	2,09±0,69 B

n=09. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$).

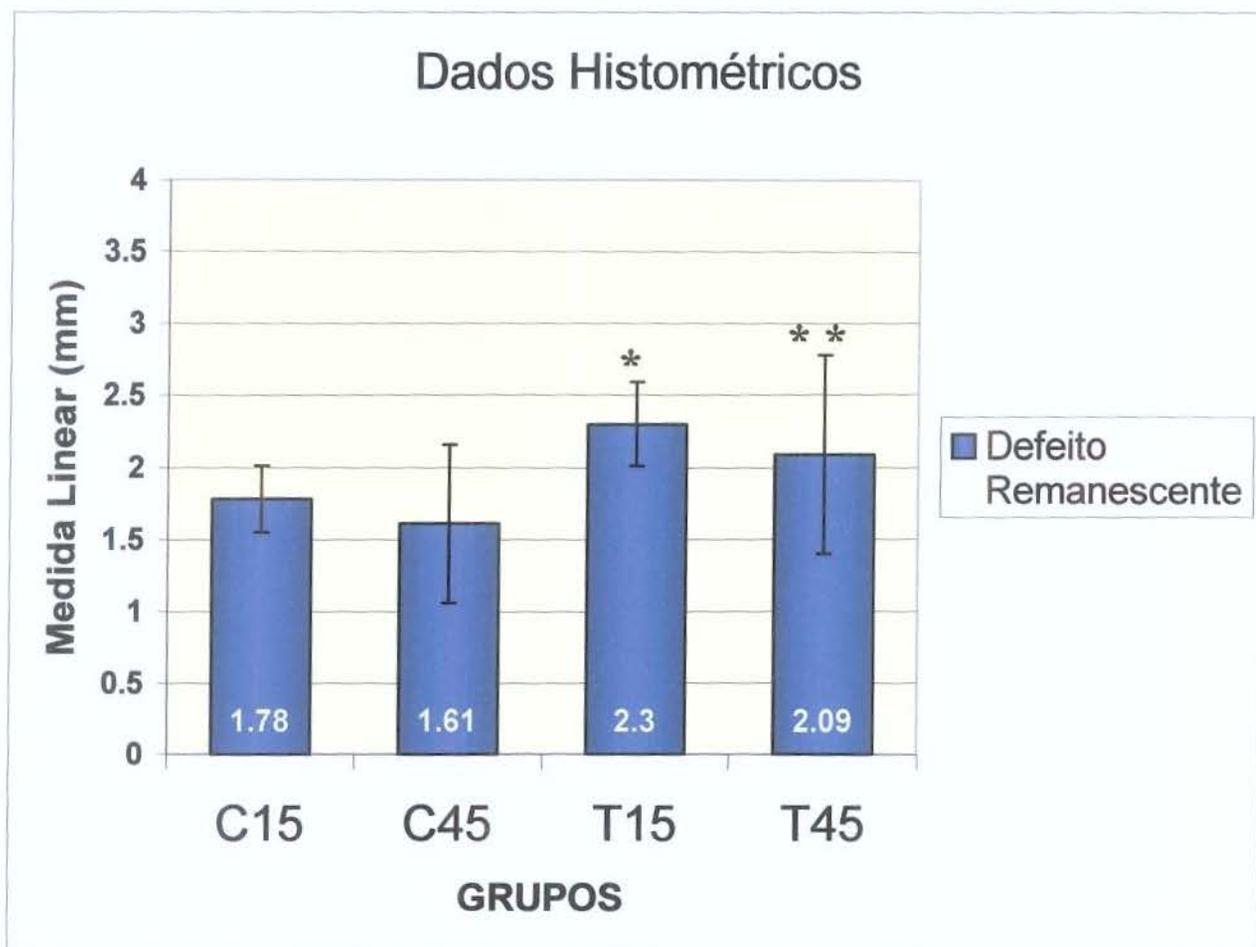
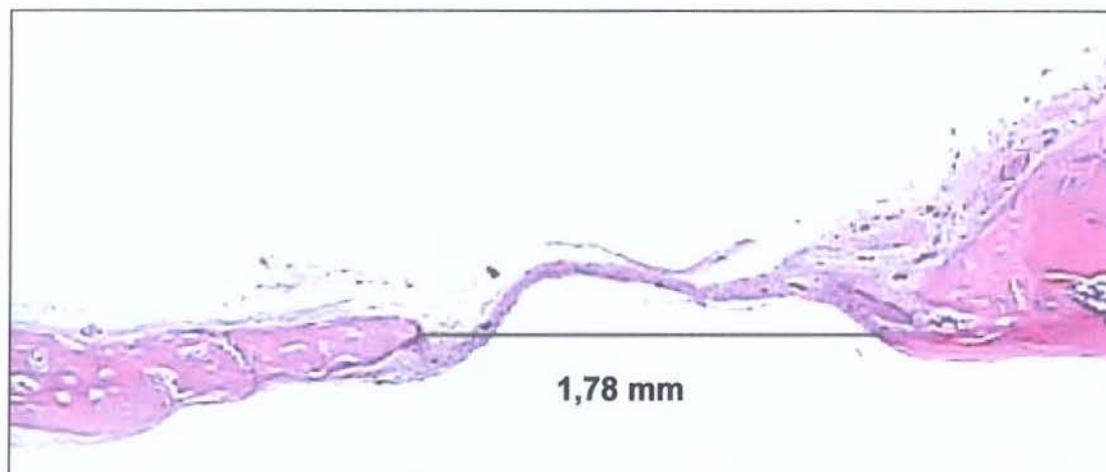
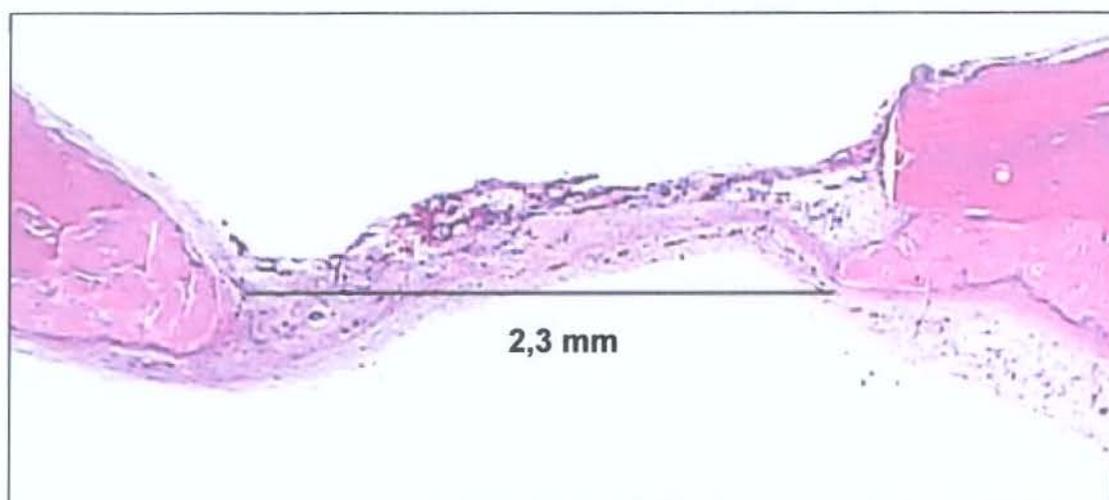


FIGURA 6 – Médias e desvio padrão do remanescente linear do defeito ósseo (mm) dos grupos controle e tratados com meloxicam nos períodos de 15 e 45 dias. *Diferença significativa em relação ao grupo controle aos 15 dias ($p < 0,05$). **Diferença significativa em relação ao grupo controle aos 45 dias ($p < 0,05$).

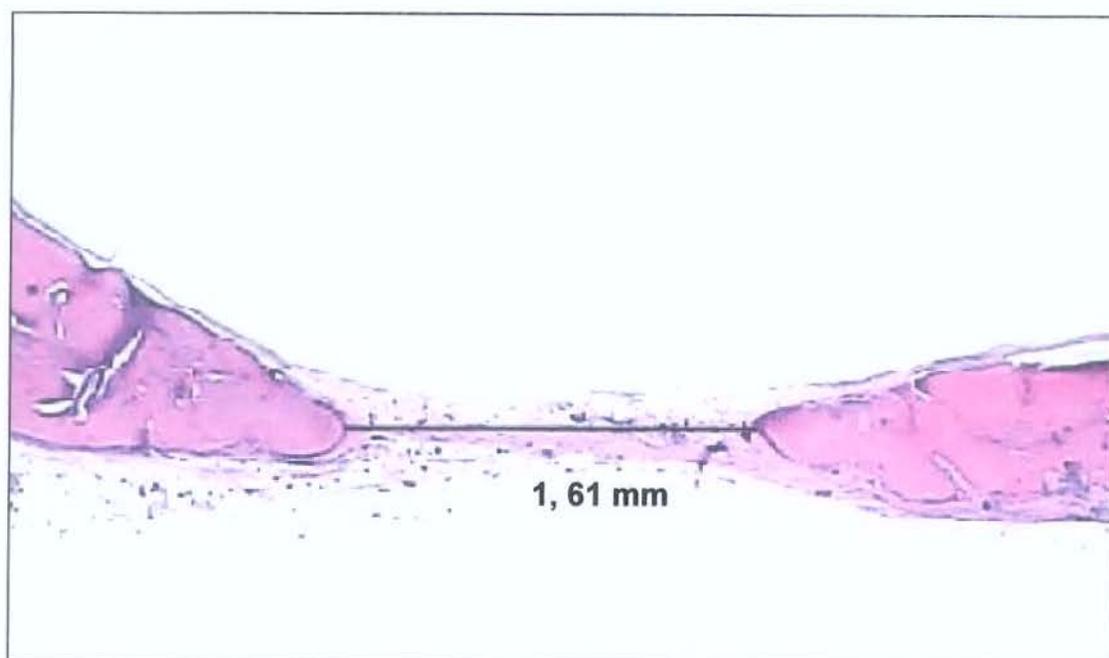


a

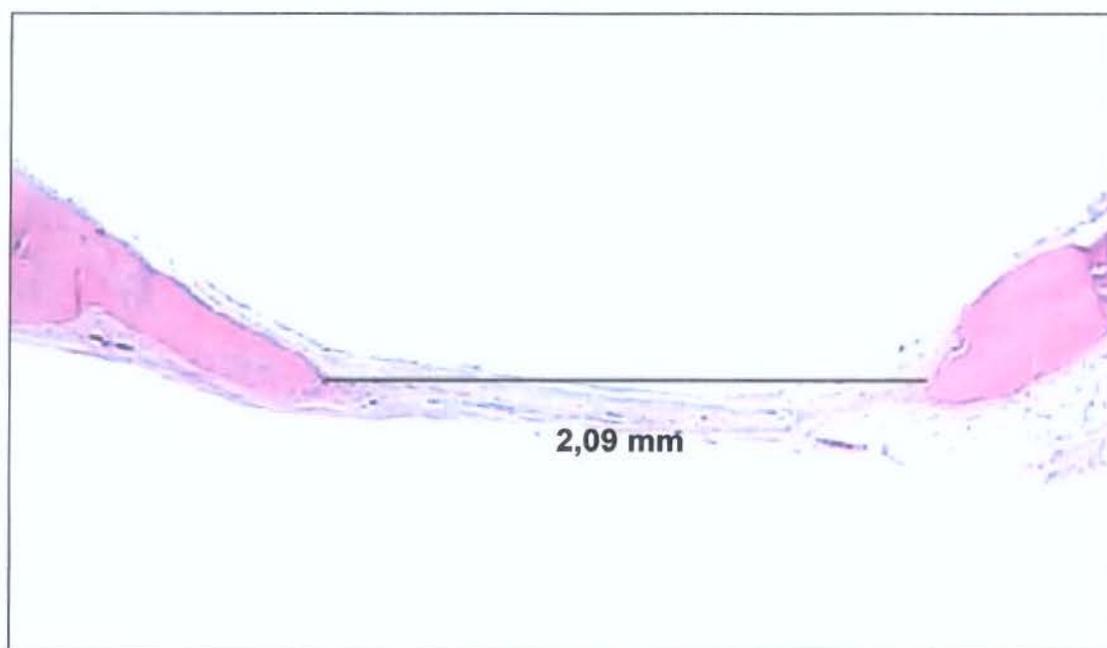


b

FIGURA 7 – Fotomicrografias do grupo controle no período de 15 dias (a) e do grupo tratado no período de 15 dias (b), ilustrando a região onde está presente o remanescente do defeito ósseo confeccionado na calvária dos ratos. A reta indica a medida correspondente à média dos respectivos grupos, com relação ao remanescente do defeito ósseo. Aumento Original X 6.25.



a



b

FIGURA 8 – Fotomicrografias do grupo controle no período de 45 dias (a) e do grupo tratado no período de 45 dias (b), ilustrando a região onde está presente o remanescente do defeito ósseo confeccionado na calvária dos ratos. A reta indica a medida correspondente à média dos respectivos grupos, com relação ao remanescente do defeito ósseo. Aumento Original X 6.25.

6. DISCUSSÃO

Para ocorrer a formação óssea, é necessária a proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos. A fim de que estes eventos se iniciem, a migração e estimulação destas células parecem ocorrer em função da inflamação provocada pela injúria local (PROBST & SPIEGEL, 1997).

Inúmeros trabalhos na literatura têm estudado o efeito de drogas sobre o reparo ósseo. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) têm sido descritos como inibidores da formação e do reparo e ósseo causando atraso na maturação do calo ósseo, já que inibem a via da cicloxigenase, responsável pelo controle da produção de PGs, as quais possuem importante papel no metabolismo do tecido ósseo (ALTMAN *et al.*, 1995; SEALEY *et al.*, 1977; SIMON *et al.*, 2002).

Por serem derivadas da COX, as PGs também exercem importante influência na formação óssea (HAKEDA *et al.*, 1985; RAISZ, 1999). Recentemente, HO *et al.* (1999) mostraram que a ação inibitória das PGE₁ e PGE₂ na síntese de DNA e na mitose de osteoblastos depende da concentração das mesmas e do tempo de exposição. Além disso, a formação óssea é estimulada pela PGE₂, a qual também é responsável pela síntese de DNA em cultura de células da calvária (CHYUN & RAISZ, 1984; RAISZ, 1990; KAWAGUCHI *et al.*, 1995).

A enzima cicloxigenase apresenta papel importante sobre o reparo e a formação óssea. WEINREB *et al.* (1997) e SUPONITZKIY & WEINREB (1998) mostraram em seus estudos que a injeção local ou sistêmica de PGE₂ estimula a formação de tecido ósseo. Além disso, DUNCAN & TURNER (1995) demonstraram

que o aumento da formação de osso lamelar em resposta à forças mecânicas é mediado por COX-2.

Estudos recentes mostram que os AINES seletivos para COX-2 apresentam maior custo benefício no tratamento de periodontites, se comparados a AINES não seletivos (BEZERRA *et al.*, 2000). Além disso, o meloxicam, inibidor seletivo da COX-2, tem se mostrado como um potente inibidor não só de processos inflamatórios como a artrite, como também inibe a destruição óssea e cartilaginosa (OGINO, 2002).

Neste trabalho foi utilizado o meloxicam, antiinflamatório não esteroidal introduzido recentemente na indústria farmacêutica brasileira (LARA, 1998) para determinação da influência de inibidores seletivos da via COX-2 sobre o reparo ósseo. O meloxicam, desenvolvido inicialmente para o tratamento de osteoartrite e artrite reumatóide, é um dos AINES que mais apresenta seletividade para a COX-2 (NOBLE & BALFOUR, 1996), preservando o organismo de reações adversas associadas à intensa inibição da COX-1. Além disso, devido sua meia-vida plasmática alta, a eliminação desta droga é mais rápida, sendo suficiente uma única dose diária (ANDRADE, 2000).

Os osteoblastos são derivados de células menos diferenciadas, as células osteogênicas, e são responsáveis pela formação de matriz óssea. Quando ativos, os osteoblastos apresentam formato cuboidal, medindo aproximadamente 20 µm de diâmetro (DOUGLAS & DOUGLAS, 2002). Nesta fase, tais células apresentam citoplasma basófilo, refletindo alto desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso, característico de células com alta capacidade de síntese protéica. O aparelho de Golgi é também evoluído, fator relevante no processamento do colágeno e de sua extrusão (DOUGLAS & DOUGLAS, 2002). Contudo, quando os

osteoblastos estão inativos, sua aparência é mais semelhante aos fibroblastos achatados e alongados. Nesta fase, os osteoblastos achatados presentes na superfície do osso formam uma camada agindo como uma membrana, controlando o fluxo de íon, através da superfície do tecido (DOUGLAS & DOUGLAS, 2002).

Na análise histológica realizada neste estudo pôde ser observado que aos 15 dias o grupo controle apresentava osteoblastos com formato cubóide a cilíndrico, evidenciando sua alta atividade para a produção de osteóide, matriz óssea não calcificada. Tal característica não pôde ser tão observada no grupo que recebeu o tratamento com AINES, onde os osteoblastos em sua maioria apresentaram-se mais achatados e pavimentosos, demonstrando a redução de atividade dos mesmos para a síntese de matriz óssea. Esses achados podem ser explicados pelo papel tanto das enzimas COX-1 como das COX-2 na osteogênese em seus estágios iniciais. Além de agir nos estágios iniciais da formação óssea, a COX-2, a qual foi inibida seletivamente neste estudo, talvez esteja também associada à maturação dos osteoblastos nos estágios posteriores, explicando a distinção morfológica e conseqüentemente a diferença de atividade encontrada nos osteoblastos presentes na superfície de osso neoformado, quando comparado o grupo controle e o grupo tratado.

As células osteoprogenitoras observadas sob microscopia óptica apresentam-se em tudo semelhantes aos fibroblastos, sendo achatadas e aparentemente indiferenciadas (GARTNER & HIATT, 2002; DOUGLAS & DOUGLAS, 2002). Elas foram observadas no tecido conjuntivo que preencheu o interior dos defeitos ósseos cirúrgicos confeccionados neste estudo, juntamente com uma faixa de fibras colágenas. A alta celularidade presente neste tecido indica a alta atividade do mesmo no processo osteogênico.

A análise dos cortes histológicos do grupo controle aos 15 dias mostrou alta taxa destas células no tecido conjuntivo presente na região do defeito, sendo que tal grupo foi o que apresentou maior quantidade das mesmas quando comparado com os demais grupos. Comparando-se o grupo tratado com o controle, no período experimental de 15 dias, pôde-se observar maior celularidade no grupo controle que no grupo submetido ao tratamento. O mesmo resultado foi observado entre os grupos tratado e controle, aos 45 dias, sugerindo que a terapia com AINES é capaz de ocasionar redução na quantidade de células osteogênicas, inibindo, portanto, o processo de osteogênese.

Na comparação entre o grupo controle de 15 dias e o controle de 45 dias de experimento, pôde ser observado que aos 15 dias a quantidade de células foi maior que aos 45 dias, sugerindo que as fases iniciais de formação óssea apresentem osteogênese mais intensa. O mesmo resultado foi encontrado entre os grupos tratados de 15 e 45 dias, evidenciando maior atividade osteogênica nos primeiros dias de experimento.

Com relação à quantidade de vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo encontrado na região do defeito, o grupo controle no período de 15 dias foi o que mais apresentou neoformação vascular, quando comparado aos demais grupos, caracterizando um tecido na fase inicial de formação do tecido de granulação e promissor ao processo de reparo.

A presença de faixa espessa de tecido conjuntivo, com fibras colágenas finas, junto a sua baixa organização são característica indicativas de processos iniciais de cicatrização, evidenciando intensa atividade de reparo. Tais características foram observadas principalmente no grupo controle no período de 15 dias.

O infiltrado inflamatório (linfócitos, macrófagos e leucócitos) apresentou-se com maior intensidade no grupo controle aos 15 dias, sendo que nos demais grupos este infiltrado foi discreto, ou em função da administração do antiinflamatório, ou em função do tempo experimental utilizado.

O tecido ósseo pode histologicamente ser diferenciado em tecido ósseo primário e secundário, sendo este também conhecido como haversiano ou lamelar. O tecido neoformado tem coloração fortemente eosinófila, é mais celular que o secundário e não apresenta lamelas, sendo as fibras colágenas orientadas mais ou menos ao acaso, caracterizando o tecido ósseo primário como entrelaçado. Enquanto isso, o tecido ósseo maduro, devido à deposição de fibras colágenas do osteóide ao longo das linhas de tensão, é caracterizado pela presença de lamelas. O limite entre o osso novo recém depositado pelos osteoblastos e o osso lamelar é marcado pela linha cementante, distinta por tonalidade basófila mais intensa.

Em todos os grupos pôde ser observada formação de tecido ósseo a partir das margens do defeito e ilhotas de osso na região onde o mesmo foi confeccionado.

Na avaliação histométrica realizada no presente estudo, o grupo controle, aos 15 dias, apresentou fechamento linear do defeito ósseo maior que o grupo tratado durante o mesmo período de tempo e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Tal diferença também pôde ser observada entre os grupos controle e tratado aos 45 dias, sendo o fechamento linear do defeito significativamente maior no grupo controle quando comparado ao grupo tratado ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que o uso do antiinflamatório não esteroide é capaz de inibir o reparo ósseo, tanto aos 15 quanto aos 45 dias de tratamento, corroborando com as observações histológicas, onde os grupos tratados com

meloxicam apresentaram osteoblastos pavimentosos, evidenciando reduzida atividade no processo de osteogênese.

Os achados deste estudo estão de acordo com outros trabalhos que também evidenciaram a inibição do reparo ósseo quando do uso de AINES seletivos para COX-2 (SIMON *et al.*, 2002). Este atraso encontrado na formação e reparo do tecido ósseo pode ser explicado pela inibição da síntese de PGs, através do bloqueio da via de metabolização da COX-2, a qual possui papel importante durante a osteogênese, sendo as PGs essenciais na formação óssea associada a reparo tanto de tecido ósseo endocondral (SIMON *et al.*, 2002) como intramembranoso (ZHANG *et al.*, 2002).

Sendo a calvária um tipo de tecido ósseo que sofre ossificação intramembranosa, nosso trabalho confirma os achados de ZHANG *et al.* (2002) demonstrando que para que ocorra neoformação óssea intramembranosa no local onde foi confeccionado o defeito cirúrgico, a COX-2 é de essencial importância, sendo a terapia com AINES prejudicial no processo de reparo ósseo no modelo experimental estudado.

Apesar de ambas as enzimas, COX-1 e COX-2, terem sido identificadas nas células osteoblásticas (SATO *et al.*, 1997), as diferenças existentes entre o papel das mesmas na formação óssea ainda não estão muito claras. Deste modo, a ação da cicloxigenase na remodelação óssea tem sido recentemente estudada através de pesquisas que se utilizam animais geneticamente deficientes de COX-1 ou COX-2 (MORHAM *et al.*, 1995; LANGENBACH *et al.*, 1995).

Apesar da similaridade tanto histológica quanto molecular no desenvolvimento ósseo fetal e no processo de reparo, a inflamação das áreas a sofrerem reparo não está presente no processo normal de desenvolvimento. Para

determinar a ação da COX-2 no reparo de fraturas, foi realizado um estudo onde ratos eram tratados com celecoxib e rofecoxib, AINES inibidores seletivos da COX-2 (SIMON *et al.*, 2002). Exames radiográficos, mecânicos e histológicos mostraram falta de reparo nas fraturas dos animais que receberam tais medicamentos. O mesmo ocorreu para animais que não possuíam a COX-2 por não expressarem o gene da mesma. Portanto, os autores relatam que a atividade da COX-2 é necessária para que ocorra reparo ósseo e acreditam que o efeito das drogas estudadas seja ocasionado pela inibição da COX-2 e não por outros efeitos locais dos medicamentos. Observações histológicas sugerem que a COX-2 seja necessária para a ossificação endocondral durante o reparo de fraturas. Além disso, os resultados sugerem que o desenvolvimento ósseo fetal e o reparo de fraturas ocorram através de diferentes mecanismos, já que ratos com ausência de COX-2 apresentaram formação normal do esqueleto. Isso indica que a função da COX-2 é especificamente essencial para o reparo de fraturas ósseas.

Apesar da COX-2 ter sido sugerida, no trabalho descrito anteriormente, por agir especificamente no reparo ósseo e não na formação normal do esqueleto, os achados de MORHAM *et al.*, (1995) e OKADA *et al.* (2000) e sugeriram que a enzima COX-2 pode ser responsável por outros eventos fisiológicos normais

Um estudo realizado por SATO *et al.* (1997) avaliou a expressão dos subtipos da COX (COX-1 e COX-2) durante a osteogênese na cavidade medular de tíbias de rato, cuja osteogênese pôde ser induzida através da injeção de colchicina. A expressão tanto dos genes da COX-1 quanto da COX-2 foi aumentada após a injeção de colchicina previamente ao início da formação óssea. Apenas a expressão dos genes da COX-2 foi elevada novamente durante o início da formação de tecido ósseo. Além disso, a administração diária de indometacina reduziu a indução óssea

da colchicina nas tíbias dos ratos, indicando a relação entre as PGs e a osteogênese. O presente estudo sugere que tanto as enzimas COX-1 como as COX-2 podem estar envolvidas com a osteogênese em seus estágios iniciais e que a COX-2 esteja mais associada à maturação dos osteoblastos nos estágios posteriores.

Além disso, a injeção local ou sistêmica de PGE₂ estimula a formação óssea (WEINREB *et al.*, 1997; SUPONITZKY & WEINREB, 1998). Outros estudos mostram que a administração de PGE₂ ocasionou aumento na taxa de reparo das fraturas em muitos modelos animais (KELLER *et al.*, 1993; KELLER, 1996; NORRDIN *et al.*, 1988), indicando que os metabólitos da ciclooxigenase podem ser necessários para que ocorra eficiente reparo ósseo. Estes trabalhos sustentam, portanto, os achados em estudos que através da terapia com AINES geram atraso no reparo do tecido ósseo, como relatado por GLASSMAN *et al.*(1998), onde significativa redução na taxa de fusão espinhal foi verificada em paciente que usavam AINES.

Apesar da COX-1 ter sido caracterizada como construtiva por participar de eventos fisiológicos normais e da COX-2 ter sido descrita como resultante de reações inflamatórias (LARA, 1998), as pesquisas descritas acima estudando o papel fisiológico dos produtos na cascata do ácido araquidônico deixam evidente que a ativação da COX-1 também tem seu papel na gênese da resposta inflamatória e, por outro lado, que a ativação da COX-2 nem sempre está associada a processos patológicos. Tais observações corroboram com os resultados obtidos neste estudo, evidenciando a necessidade da COX-2 para que ocorra adequado reparo do tecido ósseo e confirmando os efeitos prejudiciais do uso de AINES seletivos para COX-2 sobre este processo de reparo.

Pesquisas recentes, utilizando-se da biologia molecular, têm identificado genes que são especificamente requeridos para a diferenciação dos osteoblastos e formação óssea. Dois desses genes são *cbfa1* e *osterix*. O *cbfa 1* é um membro da família RUNX dos fatores de transcrição e está envolvido na regulação de muitos genes específicos dos osteoblastos, incluindo a osteocalcina (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). O padrão de expressão tecidual do *cbfa1* é altamente restrito, e sua importância para o tecido ósseo é evidente em camundongos que não possuem o gene *cbfa1*, sendo que os mesmos apresentam falta de osteoblastos (DUCY *et al.*, 1997; KOMORI *et al.*, 1997). Enquanto isso, camundongos que não expressão o gene *osterix* são caracterizados pela persistência de células mesenquimais indiferenciadas, além de também apresentarem falta de osteoblastos (NAKASHIMA *et al.*, 2002).

ZHANG *et al.* (2002) realizaram um estudo para verificar o papel das isoformas da COX sobre o processo de formação óssea. Os resultados demonstraram que a COX-2 é requerida tanto na ossificação endocondral quanto na intramembranosa durante o processo de reparo, enquanto que a COX-1 não possui papel crítico neste processo. Foi observado que ratos nocaute para COX-2 apresentaram maior quantidade de células mesenquimais no sítio da fratura, bem como atraso da ossificação do tecido cartilaginoso, ou seja, houve redução da osteoblastogênese. A formação dos nódulos de calcificação foi reduzida quase pela metade, entretanto, após a administração de PGE₂, este efeito se restabeleceu. Além disso, os autores determinaram que *cbfa1* e *osterix* são regulados pela COX-2 e que a diminuição da expressão desses genes pode contribuir para a ocorrência de incompletos reparos ósseos em camundongos com ausência de COX-2.

Portanto, a razão essencial para explicar o atraso no fechamento dos defeitos dos animais que receberam meloxicam seria a redução do processo de osteoblastogênese.

No presente estudo, para avaliação do efeito do tempo de tratamento sobre o reparo ósseo (15 e 45 dias), foram comparados os grupo controles e os tratados entre si. Não foi observada diferença estatística significativa na comparação realizada entre os grupos controles, no período de 15 e 45 dias ($p>0,05$). Com relação à comparação feita entre os grupos tratados, aos 15 e 45 dias, também não foi verificada diferença significativa nas mensurações do defeito ósseo remanescente ($p>0,05$).

Apesar da ausência de diferença estatística significativa no reparo ósseo entre os períodos de 15 e 45 dias, em ambos os tratamentos, pôde ser observada uma tendência numérica de fechamento do defeito aos 45 dias maior que aquela encontrada aos 15 dias.

O osso, além da sua estrutura fisicoquímica característica, tem a capacidade de regeneração e remodelação durante todo o período pós-fetal, fazendo com que este tecido diferencie-se dos demais (GOMES, 1998). Essa capacidade de regeneração ocorre em função de dois processos combinados, devendo-se tanto à proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas, como à indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas. Porém, esta capacidade regenerativa pode ser limitada pelo tamanho da lesão, fazendo com que grandes defeitos ósseos não se regenerem espontaneamente, representando um problema estético e funcional para o pacientes (CORMACK, 1991).

A aparente estabilização no processo de fechamento do defeito ósseo encontrada no presente estudo no período de 45 dias, pode ser explicada pelo fato de ter sido utilizado no experimento defeitos de tamanho crítico. Refere-se a tamanho crítico quando, ao longo de toda a vida do animal, o reparo ósseo espontâneo não é capaz de preencher todo o defeito com tecido neoformado. Defeitos ósseos críticos que não recebem tratamento adequado com materiais ósseos substitutivos são preenchidos com tecido conjuntivo cicatricial, não ocorrendo a osteogênese (HOLLINGER et al., 1991). O tamanho crítico do defeito ósseo varia dependendo da espécie animal, idade, tamanho e local (BOCSH et al., 1998). Em calvária de ratos esse tamanho varia de 8 mm (KLEINSCHMIDT, 1990) à 2 mm de diâmetro (MULLIKEN & GLOWACKI, 1980). Deste modo, como o defeito utilizado neste estudo é considerado crítico no modelo experimental utilizado, podemos considerar que o mesmo não fecharia por completo, independentemente do tempo estipulado para realização do processo de reparo.

Em um estudo recente, realizado por GERSTENFELD *et al.* (2003), foram mensuradas as alterações ocorridas em 42 dias na expressão de mRNAs de COX-1 e COX-2 no processo de reparo de fraturas ósseas confeccionadas no fêmur de ratos. O RNA total foi obtido antes da fratura e 1, 3, 5, 7, 14, 21, 35, e 42 dias após a fratura óssea, sendo que os níveis de mRNAs de COX-1 e COX-2 foram mensurados através de PCR. Enquanto os níveis de mRNA de COX-1 permaneceram constantes durante o período de 21 dias, os níveis de mRNA de COX-2 apresentaram picos de elevação durante os primeiros 14 dias de reparo, retornando à níveis basais a partir do 21º dia.

Além disso, segundo um trabalho realizado por DEKEL *et al.* (1981), os níveis de prostaglandinas (PGE e PGF), importantes no processo de reparo ósseo,

apresentaram-se aumentados entre o terceiro e décimo quarto dia de reparo, após a realização de fraturas em tíbias de coelho. Segundo os autores, a expressão de RNAm para a COX-2 também apresentou-se elevada nos primeiros 14 dias, sugerindo o papel da COX, e conseqüentemente de seus metabólitos, nas fases iniciais de cicatrização.

Esses achados indicam que nas duas primeiras semanas de reparo do tecido ósseo, a atividade osteogênica é mais intensa, tendo em vista a elevada taxa de transcrição de COX-2 e conseqüentemente os maiores níveis de PGs encontrados neste período, já que tais metabólitos estimulam a formação óssea (WEINREB *et al.*, 1997; SUPONITZKY & WEINREB, 1998). Desta forma, a elevada quantidade de PGs encontrada nas fases iniciais de reparo justifica os resultados obtidos neste estudo, onde não há diferença entre o fechamento do defeito ósseo entre o período de 15 e 45 dias de experimento, evidenciando que o pico de atividade do processo de osteogênese foi obtido aos 15 dias, aumentando um pouco a partir de então, mas não significativamente.

Portanto, baseada em estudos em modelos animais, a literatura mostra que os antiinflamatórios não esteroidais diminuem o reparo ósseo, como demonstrado também neste estudo. Entretanto, os estudos clínicos ainda são limitados ou realizados por meio de análises retrospectivas (GLASSMAN *et al.*, 1998; RUEBEN *et al.*, 2001) e por vezes, apresentam fatores de confundimento (GIANNOUDIS *et al.*, 2000). A necessidade de estudos clínicos controlados é importante para se estabelecer conceitos a respeito da utilização de AINES ou coxibes como coadjuvantes no tratamento de pacientes que se submetem ao processo de reparo ósseo para colocação de implantes osseointegráveis ou que se

submeterão à terapia periodontal cirúrgica que envolva procedimentos de ostectomia ou procedimentos regenerativos, associados ou não a enxertos ósseos.

Devido à complexidade dos eventos envolvidos no metabolismo ósseo e da regulação multifuncional presente nos mecanismos de formação e remodelação do tecido ósseo, investigações adicionais devem ser realizadas para melhor entendimento da ação dos mediadores inflamatórios na regulação do metabolismo ósseo associado à administração de AINES, fornecendo base científica para que a terapia com tais medicamentos seja utilizada no tratamento de fraturas e reparo de defeitos intra-ósseos.

5. CONCLUSÃO

Através do presente estudo, pôde-se concluir que a administração diária do meloxicam, na dosagem de 3mg/Kg, por 15 e 45 dias, utilizado de forma contínua, foi capaz de reduzir o reparo ósseo em defeitos confeccionados em calvária de ratos. Além disso, foi demonstrado que o fechamento do defeito ósseo ocorre principalmente entre as duas primeiras semanas de reparo, período em que os eventos iniciais associados ao reparo do tecido ósseo são mais intensos, ocasionando uma neoformação óssea maior nos estágios iniciais de reparo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTMAN, R.D.; LATTA, L.L.; KEER, R.; *et al.* Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on fracture healing: a laboratory study in rats. **J Orthop Trauma**, 9 (5): 392-400, 1995.
2. ANDERSON, G.D. *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase (COX-2) reserves inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. **J Clin Invest**, 97 (11):2672-79, Jun, 1996.
3. ANDRADE, E.D. **Terapêutica Medicamentosa em Odontologia**. Editora Artes Médicas - Divisão Odontológica, São Paulo/SP, 2000, p.45-64.
4. AKMAN, S.; GOGUS, A.; SENER, N.; *et al.* Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. **Adv Ther**, 19 (3): 119-5, May-Jun. 2002.
5. BERNE, R. M., LEVY, M. N. **Fisiologia**. 2 Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1990, 568.
6. BEUSCHER, H.U.; RAUSCH, U.P.; OTTERNESS, I.G.; *et al.* Transition from interleukin 1b to IL-1a production during maturation of inflammatory macrophages in vivo. **J Exp Med**, 175: 1793-7, 1992.
7. BEZERRA, M.M. *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, 71(6):1009-14, Jun. 2000.
8. BICHARA, J.; GREENWELL, H.; DRISCO, C.; *et al.* The effect of postsurgical Naproxen and a bioabsorbable membrane on osseous healing in intrabony defects. **J Periodontol**, 70:869-877, 1999.
9. BONEWALD, L.F. & MUNDY, G.R. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. **Clin Orthop**, 250: 261-76, 1989.
10. BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the Critical-Size bone defect in testing bone regenerating material. **J Craniofac Surg**, 9(4):310-6, Jul. 1998.
11. BRAGGER, U.; MUHLE, T.; FOURMOUSIS, I.; LANG N.P.; MOMBELLI, A. Effect of the NSAID flurbiprofen on remodelling after periodontal surgery. **J Periodontal Res**, 32 (7): 575-82, Oct. 1997.
12. CAREY, D. & LIU, X. Expression of bone morphogenetic protein-6 messenger RNA in bovine growthplate chondrocytes of different size. **J Bone Miner Res**, 10: 401-5, 1995.
13. CHYUN YS, RAISZ LG. Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. **Prostaglandins**, 27(1):97-103, Jan. 1984.

14. COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: Cotran, R.S.; Kumar, V., Collins, T.; Robbins, Patologia estrutural e funcional. 6 Ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2000:44-78.
15. CORMACK, D.H. Osso. IN: **Ham histology**. 9.ed. Rio de Janeiro, Lippincott,1991. Cap12, p216-54.
16. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS,S.L.; SCHOEN, F.J. Crescimento celular e diferenciação. Regulação normal e adaptações. In: COTRAN, R.S.; KUMAR,V.;ROBBINS ,S.L.; SCHOEN, F.J. Patologia estrutural e funcional. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1996. Cap.2, p.31.
17. DEKEL, S.; LENTHALL, G.; FRANCIS, M.J. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. **J Bone Joint Surg Br**, 63:185-89, 1981.
18. DOUGLAS, C.R. & DOUGLAS, N.A. Fisiologia do osso. In: Douglas, C.R. **Tratado de Fisiologia aplicado á saúde**. 5 Ed:., Editora Robe, 2002, 1447-61.
19. DUCY, P.; ZANGH, R.; GEOFFROY, V., *et al.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, 89:747-54, 1997.
20. DUNCAN, R. L.; TURNER, C.H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. **Calcif Tissue Int**, 57:344-58, 1995.
21. EINHORN, T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop**, 355:7-21, 1998.
22. EMERY, P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibitor. **Scand J Rheumatol**, 25 (Suppl 102):23-28, 1996.
23. FLICK, L.M.; WEAVER, J.M.; ULRICH-VINTHER, M.; *et al.* Effects of receptor activator of NF κ B (RANK) signaling blockade on fracture healing. **J Orthop Res**, 21 (4): 676-84, Mar.2003.
24. GEMMEL, E. *et al.* Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontology**, 14:112-43, 1997.
25. GERSTENFELD, L.C.; THIEDE, M.; SEIBERT, K.; *et al.* Differential inhibition of fracture healing by non-selective and cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Orthop Res**, 21(4):670-5, Jul. 2003.
26. GIANNOUDIS, P.V.; MACDONALD, D.; MATTHEWS, S.J.; SMITH, R.M.; FURLONG, J.; DE BÔER, P. Nonunion of the femoral diaphysis. The influence of reaming and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Bone Joint Surg Br**, 83(2):308, Mar. 2001.
27. GIORDANO, V.; GIORDANO,M.; KNACKFUSS, I.G.; *et al.* Effect of tenoxicam on fracture healing in rat tibiae. **Injury**, 34 (2): 85-94, Feb. 2003.

28. GLASSMAN, S.D. et al. The effect of postoperative nonsteroidal anti-inflammatory drug administration on spinal fusion. **Spine**, 23:834-38, 1998.
29. GOLDRING, M.B. & GOLDRING, S.R. Skeletal tissue response to cytokines. **Clin Orthop Rel Res**, 258: 245-78, 1990.
30. GOMES, M.F. Comparação de matrizes dentinárias homólogas sobre o processo de regeneração tecidual guiada em coelhos. Bauru. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1998.
31. HAKEDA, Y.; NAKATANI, Y.; HIRAMATSU, M.; et al. Inductive effects of prostaglandins on alkaline phosphatase in osteoblastic cells, clone MC3T3-E1. **J Biochem**, 97(1):97-104, jan, 1985.
32. HARRISON, T. R. Medicina Interna, 13 ed. Rio de Janeiro, 1996.
33. HEASMAN, P.A. & SEYMOUR, R.A. An association between long-term non-steroidal anti-inflammatory drug therapy and the severity of periodontal disease. **J Clin Periodontol**, 17: 654-8, 1990.
34. HO, M.L.; CHANG, J.K.; QANG, G.J. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. **Clin Orthop**, (313): 270-8, Apr. 1995.
35. HO, M.L.; CHANG, J.K.; WANG, G.J. Effects of ketorolac on bone repair: A radiographic study in modeled demineralized bone matrix grafted rabbits. **Pharmacology**, 57(3):148-59, Sep. 1998.
36. HO, M.L.; CHANG. J.K.; CHUANG. L.Y.; HSU, H.K.; WANG, G.J. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. **Biochem Pharmacol**, 58(6):983-90, 1999.
37. HOFBAUER, L.C. & HEUFELDER, A.E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **J Mol Med**, 79(5-6):243-53, Jun. 2001.
38. HOFBAUER, L.C.; NEUBAUER, A., HEUFELDER, A.E. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. **Cancer**, 92(3):460-70, Aug. 2001.
39. HOLLINGER, J. & WONG, M.E.K. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radial Endod**, 82: 594-606, 1996.
40. HONORE, N.M.; LUGER, M.A.; SABINO et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. **Nat. Med**, 6 :521-528, 2000.

41. HOROWITZ, M.C.; XI, Y.; WILSON, K.; KACENA, M.A. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. **Cytokine Growth Factor Rev**, 12(1):9-18,2001.
42. JARDINSKI, J.J.; STASHENKO, P.; FEDER, L.S.; *et al.* Localization of interleukin-1 β in human periodontal tissue. **J Periodontol**, 62 (1): 36-43, Jan. 1991.
43. KAJII, T.; SUZUKI, K.; YOSHIKAWA, M.; IMAI, T.; MATSUMOTO, A.; NAKAMURA, S. Long-term effects of prostaglandin E2 on the mineralization of a clonal osteoblastic cell line (MC3T3-E1). **Arch Oral Biol**, 44 (3): 233-41, Mar. 1999.
44. KAWAGUCHI, H.; PILBEAM, C.C.; HARRISON, JR.; RAISZ, L.G. The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. **Clin Orthop**, (313):36-46, Apr. 1995.
45. KEILA, H.; KELNER, A., WEINREB, M. Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity *In vivo* and *in vitro*. **J Endocrinol**, 168:131-39, 2001.
46. KELLER, J.; *et al.* Effect of local prostaglandin E2 on fracture callus in rabbits. **Acta Orthop Scand**, 64:59-63, 1993.
47. KELLER, J. Effects of indomethacin and local prostaglandin E2 on fracture healing in rabbits. **Dan Med Bull**, 43:317-29, 1996.
48. KLEIN, D.C.; RAISZ, L.G. Prostaglandins; stimulation of bone resorption in tissue culture. **Endocrinology**, 86 (6): 1463-40, Jun. 1970.
49. KOMORI, T. *et al.* Targeted disruption of *cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, 89:755-64, 1997.
50. KUEL, F.A. & EGAN, R.W. Prostaglandin, Arachidonic Acid and Inflammation. **Science**, 210(28):978-84, 1980.
51. KUJUBU, D.A.; HERSCHMAN, H.R. Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS 10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. **J Biol Chem**, 267 (12):7991-7994, Apr. 1992.
52. LARA, P.M. Os eicosanóides nos processos inflamatórios. In: **Fascículo de atualização farmacológica da inflamação**, Vol. II. Bios Comunicação e Editora Ltda, 1998.
53. LI, L.; KHANSARI, A.; SHAPIRA, L.; GRAVES, D.T.; AMAR, S. Contribution of interleukin-11 and prostaglandin(s) in lipopolysaccharide-induced bone resorption *in vivo*. **Infect Immun**, 70 (7): 3915-22, Jul, 2002.

54. LINDE, A.; ALBERIUS, P.; DAHLIN, C.; *et al.* Osteopromotion: A soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol**, 64 (11): 1116-28, Nov. 1993.
55. LYNCH, S.E.; WILLIAMS, R.C.; POLSON, A.M.; *et al.* A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. **J Clin Periodontol**, 16 (8): 545-8, Sep. 1989.
56. LYNCH, S.E.; RUIZ, G.; WILLIAMS, R.C.; *et al.* The effects of short-term application of a combination of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. **J Periodontol**, 62 : 458-67, 1991.
57. LONG, J.; LEWIS, S.; KUKLO, T.; *et al.* The effects of cyclooxygenase-2 inhibitors on spinal fusion. **J Bone Joint Surg Am**, 84-A (10): 1763-8, Oct. 2002.
58. MARDEN, L.J.; FAN, R.; PIERCE, G.; *et al.* Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. **J Clin Invest**, 92: 2897-905, 1993.
59. MARDEN, L.J., HOLLINGER, J.O.; CHAUDHARI, A.; *et al.* Recombinant bone morphogenetic protein-2 is superior to desmineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rat. **J Biomed Mater Res**, 28: 1127-38, 1994.
60. MARNETT, L. & KALGUTKAKAR, A.M. Cyclooxygenase 2 inhibitors: Discovery and the future. **TIPS**, 20:465-69, 1999.
61. MASADA, M.P.; PERSSON, R.; KENNEY, J.S.; *et al.* Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. **J Periodontal Res**, 25 (3): 156-63, May. 1990.
62. MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, 6: 597-641, 1990.
63. MELCHER, A.H. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. **Arch Oral Biol**, 14:1101-1109, 1969.
64. MIYASAKI, K.T. Função alterada do leucócito e doença periodontal. In: Carranza F. A. & Newman M.G. *Periodontia Clínica*. 8 Ed., Rio de Janeiro/RJ, Editora Guanabara Koogan, 1997, 136-154.
65. MORHAM, S.G. *et al.* Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. **Cell**, 83:473-82, 1995.
66. NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K., *et al.* RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 18;253(2):395-400, Dec. 1998.

67. NAKASHIMA, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, 108:17-29, 2002.
68. NOBLE, S. & BALFOUR, J.A. Meloxicam: new drug profile. **Drugs**, 51(3):424-30, 1996.
69. NORRDIN, R.W.; SHIH, M.S. Systemic effects of prostaglandin E2 on vertebral trabecular remodeling in beagles used in a healing study. **Calcif Tissue Int**, 42:363-68, 1988.
70. NYMAN, S. Bone regeneration using the principle of Guided Tissue Regeneration. **J Clin Periodontol**, 18 (6): 494-8, Jul. 1991.
71. O'BRIEN, E.A.; WILLIAMS, J.H.; MARSHALL, M.J. Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane. **Bone**, 28(2):208-14, Feb. 2001.
72. OGINO, K.; SAITO, K.; OSUGI, T., SATOH, H. Meloxicam (Mobic): a review of its pharmacological and clinical profile. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, 120 (6): 391-7, Dec. 2002.
73. OKADA Y, LORENZO JA, FREEMAN AM. Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. **J Clin Invest** ;105(6):823-32 Mar, 2000.
74. OYAJOBI, B.O.; ANDERSON, D.M.; TRAIANEDES, K. *et al.*, Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor kappaB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. **Cancer Res**, 61: 2572-2578, 2001.
75. PIERCE, G.M. Macrophages: important physiologic and pathologic sources of polypeptide growth factors. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2: 233-4, 1990.
76. PILBEAM, C.C.; FALL, P.M.; ALANDER, C.B.; *et al.* Differential effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on constitutive and inducible prostaglandin G/H synthase in cultured bone cells. **J Bone Miner Res**, 12(8):1198-203, Aug. 1997.
77. PROBST, A.; SPIEGEL, H.U. Cellular mechanisms of bone repair. **J Invest Surg**, 10:77-86, 1997.
78. RAISZ LG, FALL PM. Biphaseic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. **Endocrinology**.126(3):1654-9, Mar 1990.
79. RAISZ, L.G. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. **Osteoarthritis Cartilage**, 7(4):419-21, Jul,1999.

80. ROBBINS, S.L., ANGELL M., KUMAR V. **Patologia Básica**. Atheneu Editora de São Paulo. Editora da Universidade de São Paulo, 1986, Cap. 2, p.60-61.
81. SALVI, G.E., WILLIAMS, R.C., OFFENBACHER, S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as adjuncts in the management of periodontal diseases and peri-implantitis. **Curr Opin Periodontol**, 4:51-8, 1997.
82. SANADA, J.T., *et al.* Histologic, radiographic and immunoglobulin profile analysis after implantation blocks of demineralized bovine cancellous bone graft in muscle of rats. **J Appl Oral Sci**, 11 (3), 209-15, 2003.
83. SATO, Y.; ARAI, N.; NEGISHI, A., OHYA, K. Expression of cyclooxygenase genes and involvement of endogenous prostaglandin during osteogenesis in the rat tibial bone marrow cavity. **J Med Dent Sci**, 44 (4):81-92, Dec. 1997.
84. SCHWARTZ, Z.; KIESWETTER, K.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bone-surface interface during regeneration. **J Periodontal Res**;32:166-71, Jan. 1997.
85. SEYMOUR, R.A.; HEASMAN, P.A. Drugs and the periodontium. **J Clin Periodontol**, 15 (1): 1-16, Jan. 1988.
86. SIMON, A.M.; MANIGRASSO, M.B.; O'CONNOR, J.P. Cyclooxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. **J Bone Miner Res**, 17 (6): 977-8, Jun. 2002.
87. SIMONET, W.S.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R. *et al.*, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [see comments. **Cell**, 89:309-319, 1997.
88. SMITH, J.; TUREK, T.; HOLLINGER, J.O.; *et al.* Bone regeneration using rhBMP-2 delivered with a biocompatible, biodegradable polymer. **J Controlled Rel**, 36: 183-95, 1995.
89. SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N., *et al.* Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocr Rev**, 20(3):345-57, Jun, 1999.
90. SUPONITZKY, I., WEINREB, M. Differential effects of systemic prostaglandin E2 on bone mass in rat long bones and calvariae. **J Endocrinol**, 156:51-57, 1998.
91. TAKAHASHI, N.; AKATSU, T.; SASAKI, T., *et al.* Induction of calcitonin receptors by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. **Endocrinology**, 123(3):1504-10, Sep. 1988.
92. TORIUMI, D.M.; KOTLER, H.S.; LUXUNBERG, D.P.; *et al.* Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor: functional, histologic, and biomechanical evaluation. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, 117: 1101-12, 1991.

93. UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; YASUDA, H., *et al.* Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. **Endocrinology**, 141(9):3478-84 Sep. 2000.
94. VANE, JR. & BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of antiinflammatory drugs. **Inflamm Res**, 44: 1-10, 1995.
95. YASUDA H. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF). **Seikagaku**, 70(5):385-90, May. 1998.
96. YAZDI, M.; CHEUNG, D.T.; COBBLE, S.; *et al.* Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on demineralized bone-induced bone formation. **J Periodont Res**, 27 (1): 28-33, Jan. 1992.
97. ZHANG, X. *et al.* Evidence for a direct role of COX-2 in implant wear debris induced osteolysis. **J Bone Miner Res**, 16:660-69, 2001.
98. ZHANG, X.; SCHQARZ, E.M.; YOUNG, D.A.; *et al.* Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. **J Clin Invest**, 110 (8): 1211, Oct. 2002.
99. WEINREB, M.; SUPONITZKY, I., KEILA, S. Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. **Bone**, 20:521-26, 1997.
100. WEINSTEIN, R.S.; MANOLAGAS, S.C. Apoptosis and Osteoporosis. **Am. J. Med.**, 108 (2): 153-64, Feb. 2000.
101. WILLIAMS, R.C.; JEFFCOAT, M.K.; KAPLAN, M.L.; *et al.* Flurbiprofen – a potent inhibitor of bone resorption in beagles. **Science**, 227 (4687): 640-2, Feb. 1985.

7. ANEXOS

TABELA 2. Parâmetros histológicos avaliados durante a análise em microscopia de luz classificados de acordo com sua frequência ou intensidade, através do Sistema de Cruzes

Amostras do grupo controle 15 dias	Infiltrado inflamatório	Espessura do tecido conjuntivo	Espessura das fibras colágenas	Eventos hemorrágicos	Celularidade do conjuntivo	Organização do conjuntivo	Presença de vasos sanguíneos
1	++	+++	+++	+	+++	++	+++
2	+++	+	++	++	++	+	+++
3	++	++	++	0	+++	++	+++
4	+++	+	++	0	+++	+	+++
5	+++	++	+	0	++	+	+++
6	+++	+++	+	+++	++	+	+++
7	++	++	++	+	++	++	++
8	++	++	+	0	+++	++	+++
9	++	++	+	0	+++	++	+++
Amostrado grupo controle 45 dias	Infiltrado inflamatório	Espessura do tecido conjuntivo	Espessura das fibras colágenas	Eventos hemorrágicos	Celularidade do conjuntivo	Organização do conjuntivo	Presença de vasos sanguíneos
1	++	+	++	0	+++	++	+++
2	++	+	++	0	+++	+++	++
3	+	+	+	0	++	+	+
4	+	+	++	0	+	++	++
5	+	+	++	0	++	++	+++
6	+	+	+	0	+++	+	+
7	+	+	+++	0	++	+++	+
8	+	+	+	0	+	+	+
9	+	+	++	0	++	++	++

Amostras do grupo tratado 15 dias	Infiltrado inflamatório	Espessura do tecido conjuntivo	Espessura das fibras colágenas	Eventos hemorrágicos	Celularidade do conjuntivo	Organização do conjuntivo	Presença de vasos sanguíneos
1	+	+	+	0	+	+	+
2	++	++	++	0	++	++	++
3	+	+	+	++	+	+	+++
4	+	+	+	0	++	+	+++
5	+	+	++	0	+++	+++	+
6	+	++	++	+	++	+	+++
7	+	+	+	+	+	++	++
8	+	+	+	+	+	++	++
9	+	+	+	0	++	+	+
Amostras do grupo tratado 45 dias	Infiltrado inflamatório	Espessura do tecido conjuntivo	Espessura das fibras colágenas	Eventos hemorrágicos	Celularidade do conjuntivo	Organização do conjuntivo	Presença de vasos sanguíneos
1	+	+	+	+	+	++	+
2	+	+	++	0	++	+++	++
3	+	++	+++	0	++	+++	++
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	++	0	++	+++	+
6	+	+	+++	+	+++	++	++
7	+	++	+	0	++	++	++
8	+	+	+	0	+	+	++
9	+	+	++	0	++	++	+++