

Potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da nimesulida por vitaminas do complexo B

Rodrigues, L.A.¹; Fracasso, J.F.^{1*}; Siqueira, C.E.¹

¹Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, Disciplina de Farmacologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Recebido 06/07/07 / Aceito 03/09/07

RESUMO

Investigou-se os efeitos de algumas vitaminas B associadas ao diclofenaco ou nimesulida, na contorção abdominal em camundongos e edema de pata em ratos apenas com a nimesulida ou sua associação com algumas vitaminas B. Verificou-se que o pré-tratamento com as vitaminas tiamina[B₁], piridoxina[B₆] e cianocobalamina [B₁₂], isoladas ou administradas conjuntamente, não inibiu o edema de pata produzido pela carragenina em ratos, nem as contorções abdominais produzidas pelo ácido acético em camundongos. Por outro lado, a nimesulida [5mg/kg] reduziu o edema de pata em ratos, e a associação das três vitaminas à este fármaco, mas não as vitaminas administradas isoladamente, potencializou seus efeitos nos tempos de duas, três e quatro horas após a carragenina. As contorções abdominais em camundongos foram inibidas pelas doses de 25 ou 50mg/kg de diclofenaco. A associação das três vitaminas ou apenas da cianocobalamina, potencializou as duas doses do diclofenaco utilizadas. As contorções abdominais foram reduzidas também pelo nimesulida [5mg/kg] e a associação das três vitaminas, ou cada uma das vitaminas administradas isoladamente, foram capazes de potencializar os efeitos do nimesulida. É provável que a diferença no mecanismo de ação destes fármacos seja responsável pela diferença dos efeitos das vitaminas. O presente trabalho aponta para a realização de novos estudos com o uso destes antiinflamatórios, combinados com as vitaminas tiamina[B₁], piridoxina[B₆] e cianocobalamina [B₁₂], em doenças inflamatórias crônicas, na tentativa de reduzir a dose destes fármacos e conseqüentemente diminuindo seus efeitos colaterais.

Palavras-chave: diclofenaco; nimesulida; contorção abdominal; edema, cianocobalamina; tiamina.

INTRODUÇÃO

O diclofenaco e o nimesulida são drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINES) muito utilizadas

atualmente e bem toleradas pelo organismo em patologias inflamatórias crônicas (Scholer et al., 1986; Escribano et al., 2003; DeLucia et al., 2007). Vitaminas são nutrientes essenciais para a manutenção das funções normais das células e ainda que as vitaminas do complexo B, por serem hidrossolúveis e não se acumularem no organismo, são conhecidas por serem pouco tóxicas. A toxicidade no entanto acontece quando grandes quantidades são consumidas sem orientação médica (Hu et al., 1995). O efeito de alguns tipos de vitaminas do complexo B foi testado em modelos de hiperalgesia térmica e química (França et al., 2001; Reyes-García et al., 2002). Esses tratamentos inibiram ainda, a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído (teste da formalina), mas não houve inibição no modelo da placa quente (Escribano et al., 2003). O tratamento crônico com a associação das vitaminas, durante sete dias, ou o tratamento agudo com riboflavina, também reduziram parcialmente o edema de pata produzido pela formalina (França et al., 2001). Vários estudos clínicos têm mostrado que a duração do tratamento de dor na coluna vertebral pode ser reduzida usando uma combinação de vitaminas B₁, B₆ e B₁₂ e diclofenaco (Brüggemann et al., 1990; Kuhlwein et al., 1990; Reyes-García et al., 1999). Não encontrou-se evidências na literatura, da associação destas vitaminas com a nimesulida.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a potencialização do efeito antiinflamatório da nimesulida no pré-tratamento agudo, com as vitaminas do complexo B, utilizando o modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético (antinocicepção). Além disso, utilizou-se o modelo de edema de pata em ratos produzido pela carragenina intra-plantar (hiperalgesia) para verificar os efeitos dessas vitaminas quando empregadas em um pré-tratamento agudo, isoladas ou associadas aos AINES.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados ratos machos da raça Wistar, [n=6 para cada grupo], pesando entre 200-300g e camundongos machos da raça Swiss, pesando entre 40 e 55g

*Autor Correspondente: José Francisco Fracasso - Laboratório de Farmacologia - Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia - PANT - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - C.P. 502 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP, Brasil. - Telefone: (16) 3301-6984 - E-mail: fracasso@fcar.unesp.br

oriundos do Biotério Central da UNESP - Botucatu. Os animais foram mantidos em nosso biotério com ciclo de claro-escuro, umidade e temperatura controlada.

Fármacos

Heparina (Liquemine Roche)
Nimesulida (RBI, USA)
Diclofenaco, Tiamina HCl (B_1), Piridoxina HCl (B_6), cianocobalamina (B_{12}) e carragenina foram obtidas junto a (Sigma Che. CO).

Edema de pata

Para os estudos com a nimesulida, foram utilizados três grupos(G) de animais tratados com carragenina para a produção do edema. O fármaco inflamatório/edematogênico, carragenina foi administrado por via intra-plantar (i.pl.) (200 μ g/pata), num volume de 0,1ml por pata. A administração da nimesulida (5mg/Kg i.p.) foi feita 40 minutos antes da carragenina e as vitaminas (B_1 = 100mg/kg; B_6 =100mg/kg e B_{12} =5mg/kg ip.) 60 minutos antes da carragenina. O volume da pata foi medido com a utilização de paquímetro (Mitutoyo 2050-08) (Fracasso et al., 1996), imediatamente antes da injeção dos fármacos. Registros subseqüentes dos volumes da mesma pata foram realizados duas, três e quatro horas após as injeções dos fármacos e comparados com as leituras iniciais, sendo que G1: controle (salina 0,9% + carragenina); G2: nimesulida + carragenina; G3: vitamina B_1 + nimesulida + carragenina; G4: vitamina B_6 + nimesulida + carragenina; G5: vitamina B_{12} + nimesulida + carragenina; G6: vitaminas B_1 , B_6 e B_{12} + nimesulida + carragenina.

Este mesmo protocolo foi feito para o diclofenaco nas doses de (50 e 25mg/kg/p.o.), resultados não mostrados, pois a diminuição da dose não foi seguido de diminuição significativa do edema de pata, quando se associou o diclofenaco às vitaminas.

Contorções abdominais

Utilizou-se o modelo de contorções abdominais em camundongos, com a administração das vitaminas B_1 (100mg/kg), B_6 (100mg/kg) e B_{12} (5mg/kg) por via intra-peritoneal (i.p.) 60 minutos antes do ácido acético [HAc] (0.6%, 0,1ml/10g) i.p. e do diclofenaco [Diclo] (50 ou 25mg/kg) via oral (p.o.) 40 minutos antes do ácido acético. Logo após, o animal foi mantido em um funil para a observação do número de contorções abdominais. Este procedimento foi realizado com os seguintes grupos de animais: G 1: controle (salina 0,9% + ácido acético i.p.); G 2: Diclofenaco + ácido acético; G 3: vitamina B_1 + diclofenaco + ácido acético; G 4: vitamina B_6 + diclofenaco + ácido acético; G 5: vitamina B_{12} + diclofenaco + ácido acético; G 6: vitaminas B_1 , B_6 , B_{12} + diclofenaco + ácido acético; G 7: vitaminas B_1 e B_6 + diclofenaco + ácido acético. A resposta antinociceptiva foi observada após a administração dos fármacos durante um período de vinte

minutos. Utilizou-se o modelo de contorções abdominais, para a avaliação do efeito das vitaminas B_1 (100mg/kg), B_6 (100mg/kg) e B_{12} (5mg/kg) por via intra-peritoneal (i.p.) 60 minutos antes do ácido acético (0.6%, 0,1ml/10g) i.p. e do nimesulida (5mg/kg i.p.) 40 minutos antes do ácido acético, como descrito para o diclofenaco. Este procedimento foi realizado com os seguintes grupos de animais: G 1: controle (salina 0,9% + carragenina); G 2: + carragenina + nimesulida; G 3: vitamina B_1 + nimesulida + carragenina; G 4: vitamina B_6 + nimesulida + carragenina; G 5: vitamina B_{12} + nimesulida + carragenina; G 6: vitaminas B_1 , B_6 e B_{12} + nimesulida + carragenina.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada através da ANOVA e as comparações múltiplas das médias foram feitas através do teste de Bonferroni, tendo como resultado significativo $P<0,05$ (Winer et al., 1991).

RESULTADOS

O tratamento apenas com as vitaminas B_1 , B_6 e B_{12} não apresentou atividades antiedematogênica ou antinociceptiva, assim como as vitaminas administradas isoladamente não potencializaram a inibição do edema pelo diclofenaco (não mostrados). A associação de vitaminas ao antiinflamatório não potencializou os efeitos do diclofenaco na dose de 50mg/kg p.o nos tempos de duas e três horas após a carragenina, mas a potencialização do efeito do diclofenaco, pelas vitaminas, foi significativa ($P< 0,01$) no tempo de quatro horas.

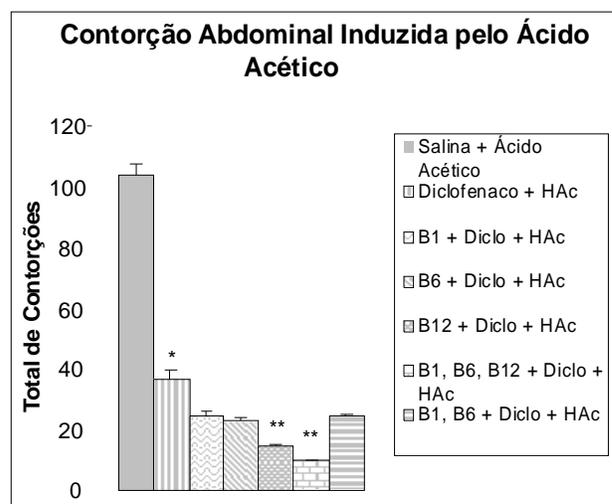


Figura 1. Potencialização do efeito antinociceptivo do diclofenaco (50 mg/kg) pela cianocobalamina isolada e pela associação tiamina/piridoxina/ cianocobalamina, no modelo de contorções abdominais.

* $P<0,001$ em relação ao controle (salina + ácido acético)

** $P<0,001$ em relação ao grupo [diclo] + [HAc]

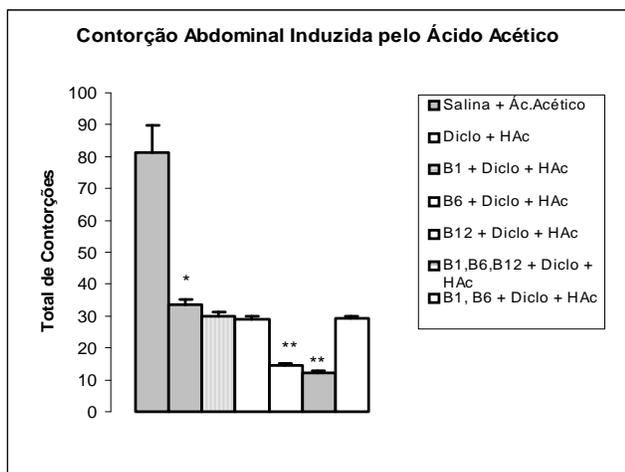


Figura 2. Potencialização do efeito antinociceptivo do diclofenaco (25 mg/kg) pela cianocobalamina isolada e pela associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina no modelo de contorções abdominais em camundongos.

* P<0,05 em relação ao controle (salina + ácido acético)

** P<0,05 em relação ao grupo [Diclo] + [HAc]

A administração das vitaminas B₁, B₆ e B₁₂ com o diclofenaco (50 ou 25mg/kg) inibiu significativamente (P<0,001) o número de contorções (Figuras 1 e 2). O efeito provocado pela administração do diclofenaco com tiamina ou piridoxina não foi significativamente diferente de quando o diclofenaco foi administrado isoladamente. Entretanto, a injeção de cianocobalamina associada à este fármaco (50mg/kg), produziu inibição significativa (P<0,005) no número de contorções abdominais. A vitamina B₁₂ e a associação das três vitaminas apresentaram resultados significativos na potencialização do diclofenaco, quando a dose deste fármaco foi diminuída em 50% (Figura 2), mas as vitaminas B₁ e B₆ não produziram o mesmo efeito.

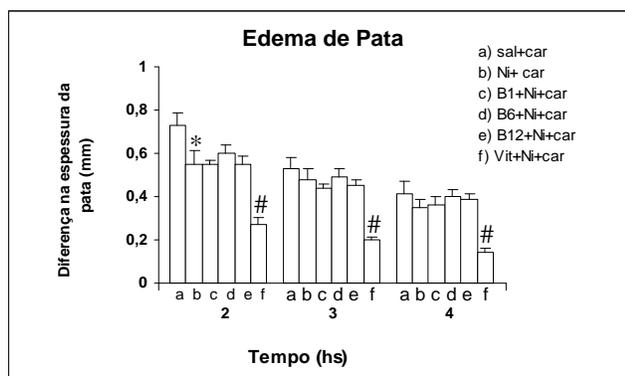


Figura 3. Potencialização da ação antinociceptiva da nimesulida [Ni] (5 mg/kg i.p.) pela tiamina/piridoxina/cianocobalamina isoladas ou em associação no edema de pata em ratos causado pela carragenina (Car) i.pl. após 2, 3 e 4 hs.

* P<0,05 em relação ao controle (sal + Car)

• P<0,05 em relação ao grupo (Ni + Car)

P<0,01 em relação ao grupo [Ni + Car]

Os resultados mostraram que a nimesulida inibiu significativamente o edema de pata produzido pela carragenina (P<0,05) (Figura 3). A associação das vitaminas tiamina/piridoxina/cianocobalamina potencializou os efeitos da nimesulida [5mg/kg i.p]. nos tempos de duas, três e quatro horas após a carragenina, sendo estatisticamente significativo (P< 0,01). Essa potencialização do efeito da nimesulida não se deve a uma dessas três vitaminas em especial e sim ao conjunto delas, pois os resultados obtidos com a associação de uma das vitaminas isoladamente, não se mostraram significativos estatisticamente, sendo que apenas a vitamina B₁, no tempo de três horas apresentou diferença significativa.

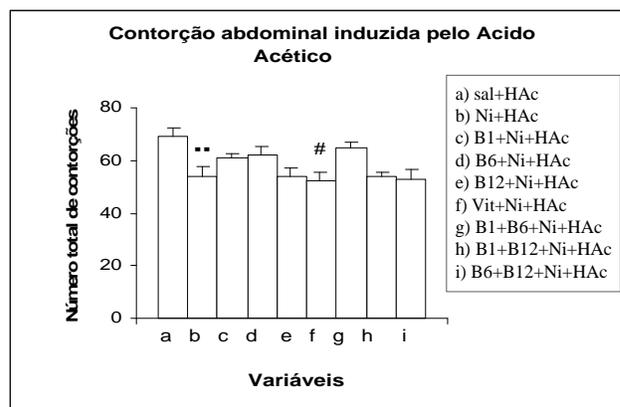


Figura 4. Potencialização da ação antinociceptiva da nimesulida [Ni] (5 mg/kg i.p.) pela tiamina/piridoxina/cianocobalamina isoladas ou em associações nas contorsões abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.

•• P<0,01 em relação ao controle (sal + HAc)

P<0,05 em relação ao grupo [Ni + HAc]

A nimesulida também inibiu significativamente o número de contorções abdominais (P<0,01) (Figura 4). Seu efeito analgésico foi potencializado com a administração da tiamina, piridoxina e cianocobalamina, quando administradas em associação (P<0,05) (Figura 4).

DISCUSSÃO

A eficácia dos AINEs, como o diclofenaco e a nimesulida (Mitchell et al., 1994; Rang et al., 1999) em reduzir a dor é resultado da capacidade em inibir as ciclooxigenases 1 e 2, enzimas importantes na síntese de prostaglandinas, que contribuem para a sensibilização do nociceptor (Escribano et al., 2003; DeLucia et al., 2007). O diclofenaco também dessensibiliza os nociceptores, através da estimulação da via NO/GMPc (Ferreira, 2002). Existem dados na literatura mostrando que as vitaminas B, quando usadas isoladas ou em associação diminuem o efeito antinociceptivo (França et al., 2001; Reyes-Garcia et al., 2002). No presente estudo não se conseguiu reproduzir estes

resultados com apenas a associação destas vitaminas. Porém, resultados obtidos em nosso laboratório mostraram que a associação das vitaminas potencializou o efeito antiedematogênico do diclofenaco nas doses de 25 e 50mg/kg após quatro horas. É provável que, nos tempos de duas e três horas, a concentração do diclofenaco no sangue esteja produzindo efeito máximo. Assim, o tratamento agudo com estas vitaminas não altera as respostas da sua ação antiinflamatória. Com o passar do tempo, a diminuição da sua concentração plasmática, pelo metabolismo, pode estar reduzindo sua atividade antiinflamatória, e com isto, as vitaminas conseguem potencializar seus efeitos antiinflamatórios (tempo de quatro horas após a carragenina). Porém, mesmo com a dose menor de diclofenaco, a associação das vitaminas, apesar de melhorar a atividade antiedematogênica deste fármaco, não foi estatisticamente significativo, nos tempos de duas e três horas, após a carragenina. Novos estudos estão sendo realizados para verificar-se este fenômeno.

Por outro lado, a associação das vitaminas foi eficaz em potencializar os efeitos da nimesulida na dose de 5mg/kg, avaliadas duas, três e quatro horas após a carragenina, assim como inibição das contorções abdominais, sendo que apenas a vitamina B₁₂ administrada isoladamente, foi eficaz em potencializar esta ação do diclofenaco, o que aponta para a realização de novos estudos com o uso combinado destes antiinflamatórios com estas vitaminas ou principalmente a B₁₂, para maior esclarecimento dos seus mecanismos, com a possibilidade de reduzir os efeitos adversos dos antiinflamatórios (Martinelli & Durighetto Júnior, 1986).

Deve-se salientar que as concentrações das vitaminas e do diclofenaco ou nimesulida utilizadas são comparáveis às concentrações utilizadas no homem. É interessante notar também, que os animais foram tratados por via oral com o diclofenaco, o que estabelece uma correlação mais próxima com a via que é utilizada em humanos. É sabido que as vitaminas do complexo B são indispensáveis a uma série de reações do metabolismo intermediário e que sua ausência determina o aparecimento de várias entidades patológicas, como edema, anormalidades cerebrais, cardiovasculares e neurológicas periféricas (Guyton, 1988; Raffa et al., 2006). Estudos de nociceção em animais, como contorção abdominal, confirmam as propriedades analgésicas destas vitaminas descritas por Bromm et al. (1995).

A aplicação de um estímulo inflamatório, como a carragenina, produz liberação de uma cascata de citocinas iniciada pelo TNF- α , que ativa duas vias: uma que é responsável pela indução da ciclooxigenases 1 e 2 e subsequente síntese de eicosanóides via liberação de interleucina 1 β ; a outra que promove a indução da produção de aminas via interleucina-8. Dependendo da intensidade e natureza do estímulo, a liberação de TNF- α é precedida pela formação de bradicinina (Ribeiro et al., 2000). Estudos futuros devem avaliar a participação da Interleucina 1 β e do TNF- α . nos efeitos descritos no presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às senhoras Rosana Finoti Pupim Silva e Elisabete Zocal Paro Lepera pelos excelentes trabalhos técnicos prestados e pela assessoria em informática e estatística e a senhora Ana Lucia Minale Barbosa da Silva pela prestimosa digitação e revisão do manuscrito.

ABSTRACT

Potentiating effect of pretreatment with some B vitamins on the anti-inflammatory and antinociceptive properties of nimesulide and diclofenac

The effects of a combination of some B vitamins and diclofenac or nimesulide on chemical nociception in mice or paw edema in rats were investigated. While the vitamins alone had no effect, combination of thiamine (B₁), pyridoxine (B₆) and cyanocobalamin (B₁₂), given i.p. in doses of 100mg and 5mg/kg, respectively, potentiated the inhibition by nimesulide (5mg/kg) of paw edema induced by carrageenin in rats. Antinociceptive effects of diclofenac and nimesulide (inhibition of abdominal writhing induced by acetic acid in mice) were also potentiated by the combination of the vitamins B₁, B₆ and B₁₂. Thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin given singly were effective in potentiating antinociceptive effects of nimesulide, but only cyanocobalamin potentiated these effects of diclofenac, probably reflecting the differing mechanisms of action of the two drugs. The results document the positive influence of B vitamins on the antinociceptive effects of diclofenac or nimesulide and support the use of B vitamins to shorten the treatment time and reduce the daily dose of anti-inflammatories.

Keywords: diclofenac; nimesulide; abdominal writhing test; paw edema; cyanocobalamin; thiamine.

REFERÊNCIAS

- Bromm K, Herrmann WM, Schulz H. Do the B-vitamins exhibit antinociceptive efficacy in men? Results of a placebo-controlled repeated-measures double-blind study. *Neuropsychobiology* 1995; 31(3):156-65.
- Brüggemann G, Koehler CO, Koch EMW. The therapy of acute lumbago with diclofenac and B-vitamins - Results of a double-blind clinical study. *Klin Wochenschr* 1990; 68(2):116-20.
- DeLucia R, Oliveira-Filho RM, Planeta CS, Gallacci M, Avellar MCW. *Farmacologia integrada*. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2007. p.339-62.
- Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obach R, Doménech J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19:203-10.

- Ferreira SH. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *Int J Clin Pract Suppl* 2002; (128):2-10.
- Fracasso JF, Nunes-de-Souza RL, Teixeira CE, Castro RC, Lepera EZP, Silva RFP. Effect of dipyrrone, L-name and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29(11):1543-8.
- França DS, Souza ALS, Almeida KR, Dolabella SS, Martinelli C, Coelho MM. B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *Eur J Pharmacol* 2001; 421(3):157-64.
- Guyton AC. *Fisiologia humana*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p.436-7.
- Hu ML, Chen YK, Lin YF. The antioxidant and prooxidant activity of some B vitamins and vitamin-like compounds. *Chem Biol Interac*. 1995, 97(1):63-73.
- Kuhlwein A, Meyer HJ, Koehler CO. Reduced need for diclofenac with concomitant B-vitamin therapy: results of a double-blind clinical study with reduced diclofenac- dosage (75mg diclofenac vs. 75mg diclofenac plus B-vitamins daily). *Klin Wochenschr* 1990; 68(2):107-15.
- Martinelli C, Durigetto Júnior AF. Efeito anti-edema e antiinflamatório das vitaminas do complexo B. *RGO* 1986; 34(2):132-4.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann G, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 90:11693-7.
- Raffa RB, Rawls SM, Beyzarov EP. *Atlas de farmacologia de Netter*. São Paulo: Artmed; 2006. p.375-6.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Pharmacology*. 4th.ed. London: Churchill Livingstone; 1999. p.229-47.
- Ribeiro RA, Vale ML, Ferreira SH, Cunha FQ. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 2000; 391(1/2):97-103.
- Reyes-García G, Medina-Santillán R, Terán-Rosales F, Castillo-Henkel C, Mateos-García E. Characterization of the potentiation of the antinociceptive effect of diclofenac by vitamin B complex in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999; 42(2):73-7.
- Reyes-García G, Medina-Santillán R, Terán-Rosales F, Castillo-Henkel C, Viadal-Cantú GC, Caram-Salas NL, Granados-Soto V. B vitamins increase the anti-hyperalgesic effect of diclofenac in the rat. *Proc West Pharmacol Soc* 2002; 45:147-9.
- Scholer DW, Ku EC, Boettcher I, Schweizer A. Pharmacology of diclofenac sodium. *Am J Med* 1986; 80(4B):34-8.
- Winer BJ, Brown DR, Michelis KM. *Statistical principles in experimental design*. 3rd.ed. New York: McGraw Hill; 1991. p.100-65.