



Efeito do tratamento com algumas vitaminas B na potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da talidomida

Nakaema, N.M.K.¹; Fracasso, J.F.^{1*}; Longo, M.C.¹; Siqueira, C.E.¹; Godói, P.H.B.¹; Rodrigues, L.A.¹

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

Recebido 17/08/05 / Aceito 24/04/06

RESUMO

Mostrou-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, o diclofenaco [25 ou 50mg/kg] ou talidomida [45mg/kg] inibiram o edema de pata em ratos, e a associação das três vitaminas à estas drogas, mas não as vitaminas administradas isoladamente, potencializou os efeitos do diclofenaco [25 ou 50mg/kg] no tempo de quatro horas e a talidomida [45mg/kg], 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 inibidas também pela talidomida [45mg/kg] e a associação das três vitaminas, ou cada uma das vitaminas administradas isoladamente, foram capazes de potencializar os efeitos da talidomida. É provável que a diferença no mecanismo de ação destas drogas seja responsável por esta diferença dos efeitos das vitaminas. O presente estudo preconiza o uso de antiinflamatórios, combinados com as vitaminas tiamina[B₁], piridoxina[B₆] e cianocobalamina [B₁₂], em doenças crônicas, diminuindo assim a dose destas drogas e seus efeitos colaterais.

Palavras-chave: Diclofenaco; talidomida; contorção abdominal; piridoxina; cianocobalamina; tiamina.

INTRODUÇÃO

O diclofenaco, droga antiinflamatória não esteroideal (DAINE) muito utilizada atualmente é bem tolerada pelo organismo (Escribano et al., 2003). O pré-tratamento com associação das vitaminas tiamina,

piridoxina e cianocobalamina ou com piridoxina e riboflavina isoladas induziram efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O efeito de alguns tipos de vitaminas B foi testado em modelos de hiperalgisia térmica e química (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. O tratamento crônico com a associação das vitaminas, durante sete dias, ou o tratamento agudo com riboflavina, também reduziram parcialmente o edema de pata injetada com 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).

A talidomida possui um perfil teratogênico, descoberto na década de 60, mas, atualmente, ressurge como um fármaco com boa atividade antiinflamatória, capaz de inibir a hiperalgisia inflamatória em ratos e a resposta nociceptiva no modelo de contorções abdominais em camundongos (Borges & Fröenlich, 2003; Ribeiro et al., 2000).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a potencialização do efeito antiinflamatório do diclofenaco, no tratamento agudo, pelas vitaminas do complexo B, utilizando o modelo de contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético. Além disso, por desconhecimento de trabalhos científicos que mostrem a combinação de vitaminas do complexo B e a talidomida, utilizou-se a técnica de edema de pata em ratos para verificar os efeitos dessas vitaminas quando empregadas em um tratamento agudo com a talidomida.

MATERIAL E MÉTODOS

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

*Autor correspondente: Prof. Dr. José Francisco Fracasso - Lab. de Farmacologia - Depto. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia-PANT - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - C.P. 502 - 14801-902 - Araraquara - SP - Brasil. E-mail: fracasso@fcfar.unesp.br

No edema de pata foi utilizado o éter como anestésico.

Drogas: Heparina [Liquemine Roche], Talidomida {RBI, USA}. Diclofenaco, Tiamina HCl[B₁], Piridoxina HCl [B₆], cianocobalamina [B₁₂] foram obtidas junto à Sigma Che. CO.

Edema de pata: Para os estudos com diclofenaco, foram utilizados três grupos[G] de animais tratados com carragenina para a obtenção do edema de pata. A droga inflamatória, carragenina [200µg/pata], foi administrada por via intra-plantar [i.pl.] no volume de 0,1ml por pata. A administração do diclofenaco [50 ou 25mg/Kg p.o] foi feita 40 minutos antes da carragenina e as vitaminas [B₁ 100mg/kg; B₆ 100 mg/kg e B₁₂ 5 mg/kg ip.] 60 minutos antes da carragenina. O volume da pata foi determinado com a utilização de paquímetro [Mitutoyo 2050-08] (Fracasso et al., 1996), imediatamente antes da injeção das drogas. Registros subsequentes dos volumes da mesma pata foram realizados duas, três e quatro horas após as injeções das drogas e comparados com as leituras iniciais, sendo que G1: Controle [salina 0,9% + carragenina]; G2: diclofenaco + carragenina; G3: Vitaminas B₁, B₆ e B₁₂ + diclofenaco + carragenina. Em outros três grupos [G] de animais, tratados com carragenina, a dose do diclofenaco foi reduzida 50%, para certificar se o antiinflamatório, por si só, não estava produzindo uma resposta antiedematogênica máxima. Estudou-se também outra droga antiinflamatória, a talidomida, através da realização do edema de pata em ratos e do modelo de contorções abdominais. A dose de talidomida utilizada foi de 45mg/kg i.p. A droga inflamatória, carragenina [200µg/pata], foi administrada por via intra-plantar [i.pl.] no volume de 0,1ml por pata. A administração da talidomida [45mg/Kg i.p.] foi feita 40 minutos antes da carragenina e as vitaminas [B₁ 100mg/kg; B₆ 100 mg/kg e B₁₂ 5 mg/kg ip.] 60 minutos antes da carragenina. O volume da pata foi determinado como descrito para o diclofenaco. Foram utilizados seis grupos[G] de animais, agrupados da seguinte forma: G1: Controle [salina 0,9% + carragenina]; G2: Talidomida + carragenina; G3: Vitamina B₁ + talidomida + carragenina; G4: Vitamina B₆ + talidomida + carragenina; G5: Vitamina B₁₂ + talidomida + carragenina; G6: Vitaminas B₁, B₆ e B₁₂ + talidomida + carragenina.

Contorções abdominais: Também utilizou-se o modelo de contorções abdominais, com a administração das vitaminas B₁(100mg/kg), B₆(100mg/kg) e B₁₂(5mg/kg) por via intraperitoneal [i.p.] 60 minutos antes do ácido acético (0.6%, 0,1ml/10g) i.p. e do diclofenaco (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: Grupo 1: Controle [salina 0,9% + ácido acético i.p.]; Grupo 2: Diclofenaco + ácido acético; Grupo 3: Vitamina B₁ + diclofenaco + ácido acético; Grupo 4: Vitamina B₆ + diclofenaco + ácido acético; Grupo 5: Vitamina B₁₂ + diclofenaco + ácido acético; Grupo 6: Vitaminas B₁, B₆, B₁₂ + diclofenaco + ácido acético; G7:

Vitaminas B₁ e B₆ + diclofenaco + ácido acético. A resposta nociceptiva foi observada após a administração das drogas durante vinte minutos. Também utilizou-se o modelo de contorções abdominais, com a administração das vitaminas B₁(100mg/kg), B₆(100mg/kg) e B₁₂(5mg/kg) por via intraperitoneal [i.p.] 60 minutos antes do ácido acético (0.6%, 0,1ml/10g) i.p. e da talidomida[45mg/kg i.p.) 40 minutos antes do ácido acético, como descrito para o diclofenaco. Este procedimento foi realizado com os seguintes grupos de animais: G1: Controle [salina 0,9% + carragenina]; G2: Talidomida + carragenina; G3: Vitamina B₁ + talidomida + carragenina; G4: Vitamina B₆ + talidomida + carragenina; G5: Vitamina B₁₂ + talidomida + carragenina; G6: Vitaminas B₁, B₆ e B₁₂ + talidomida + carragenina.

Análise estatística: A análise estatística dos resultados foi realizada através da ANOVA e as comparações múltiplas 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 B₁, B₆ e B₁₂ não apresentou atividades antiedematogênica ou antinociceptiva, assim como as vitaminas administradas isoladamente não potencializaram a inibição do edema pelo diclofenaco [não mostrados]. Os resultados mostraram que o diclofenaco inibiu significativamente o edema de pata, produzido pela carragenina [P< 0,05]. A associação de vitaminas ao antiinflamatório não potencializou os efeitos do diclofenaco na dose de 50mg/kg p.o (Figura 1) 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. É provável que, nos tempos de duas e três horas, a concentração do diclofenaco no sangue esteja produzindo efeito máximo. 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]. Quando utilizou-se a dose de 25mg/kg p.o do diclofenaco (Figura 2), houve também potencialização significativa pelas vitaminas, do seu efeito antiinflamatório, no tempo de quatro horas após a carragenina, mas duas ou três horas após a carragenina, a potencialização pelas vitaminas não foi estatisticamente significativa. É provável que na dose de 50mg/kg o diclofenaco produza inibição máxima, assim, o tratamento agudo com estas vitaminas não altera as respostas da sua ação antiinflamatória. Porém, mesmo com dose menor, a associação das vitaminas, apesar de melhorar a atividade antiedematogênica do diclofenaco, não foi estatisticamente significativo.

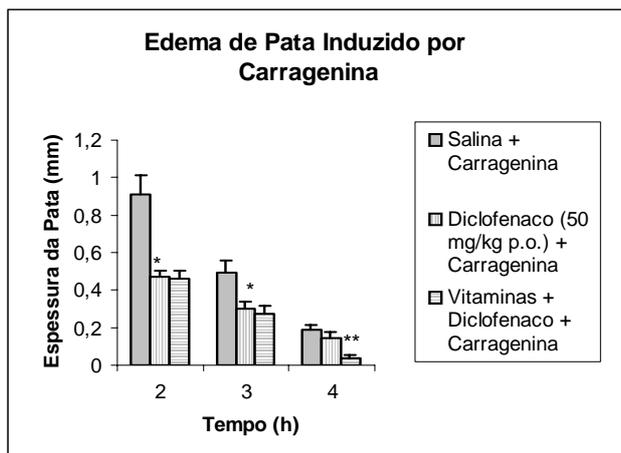


Figura 1 - Potencialização do efeito antiedematogênico do diclofenaco (50 mg/kg p.o.), pelas vitaminas B₁, B₆ e B₁₂, no edema de pata induzido por carragenina em ratos. * P<0,05 em relação ao controle ** P<0,05 em relação ao grupo Diclofenaco + Carragenina no tempo de 4h

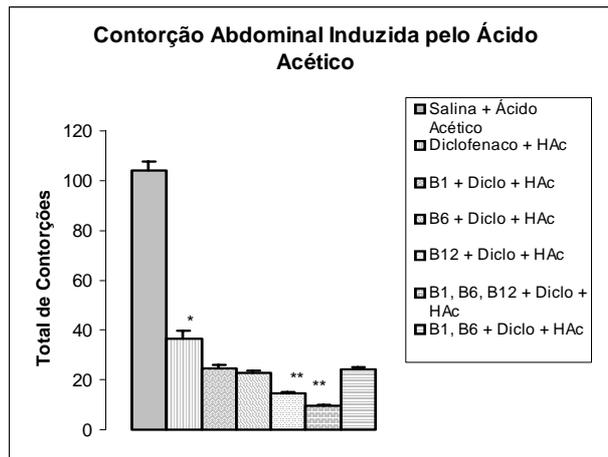


Figura 3 - Potencialização do efeito antinociceptivo do diclofenaco (50 mg/kg) pela cianocobalamina isolada e pela associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina, no modelo de contorções abdominais. *P<0,001 em relação ao controle (salina + ácido acético) **P<0,001 em relação ao grupo diclofenaco [diclo] + ácido acético [HAc]

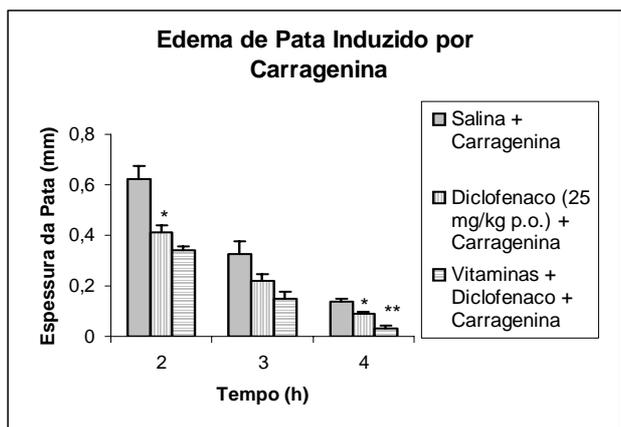


Figura 2 - Potencialização do efeito antiedematogênico do diclofenaco (25 mg/kg p.o.), pelas vitaminas B₁, B₆ e B₁₂, no edema de pata induzido por carragenina em ratos. * P<0,05 em relação ao controle ** P<0,05 em relação ao grupo Diclofenaco + Carragenina no tempo de 4h

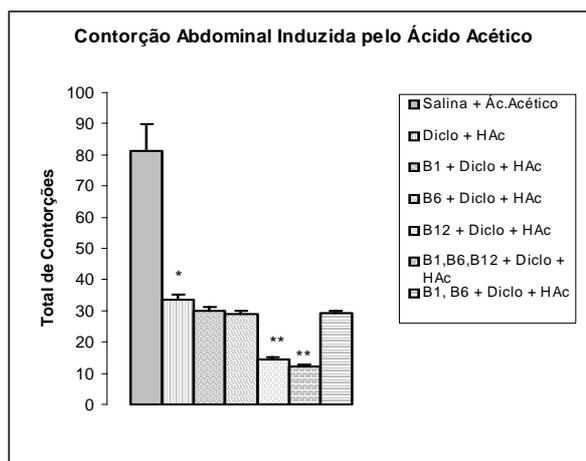


Figura 4 - Potencialização do efeito antinociceptivo do diclofenaco (25 mg/kg) pela cianocobalamina isolada e pela associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina, no modelo de contorções abdominais em camundongos. * P<0,05 em relação ao controle ** P<0,05 em relação ao grupo Diclofenaco [Diclo] + ácido acético [HAc]

A administração da associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina com o diclofenaco (50 ou 25mg/kg) inibiu significativamente [P<0,001] o número de contorções (Figuras 3 e 4). O efeito provocado pela administração do diclofenaco com tiamina ou piridoxina não foi diferente significativamente de quando o diclofenaco foi administrado isoladamente. Entretanto, a injeção de cianocobalamina associada ao diclofenaco [50mg/kg], produziu uma inibição significativa [P<0,005] no número de contorções abdominais. A cianocobalamina e a associação das três vitaminas apresentaram resultados significativos na potencialização do diclofenaco, quando a dose deste antiinflamatório foi diminuída em 50% (Figura 2). Apesar da diminuição da dose do diclofenaco para 25mg/kg, a tiamina e piridoxina não foram capazes de potencializar o efeito do diclofenaco.

Os resultados mostraram que a talidomida (Figura5) inibiu significativamente o edema de pata produzido pela carragenina [P<0,01]. A associação das vitaminas tiamina/piridoxina/cianocobalamina potencializou os efeitos da talidomida [45mg/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 talidomida 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 e a talidomida não se mostraram significativos estatisticamente.

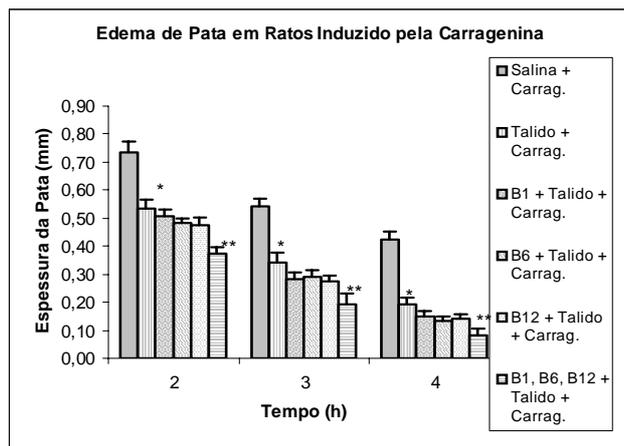


Figura 5 - Potencialização da ação antiedematogênica da talidomida [talido] (45 mg/kg i.p.) pela associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina, no edema de pata em ratos induzido pela carragenina [carrag.].

* P<0,05 em relação ao controle

** P<0,05 em relação ao grupo Talidomida + Carragenina

A talidomida também inibiu significativamente o número de contorções abdominais [P<0,05] (Figura 6). Seu efeito analgésico foi potencializado com a administração da tiamina, piridoxina e cianocobalamina, quando administradas isoladamente ou em associação [P<0,05].

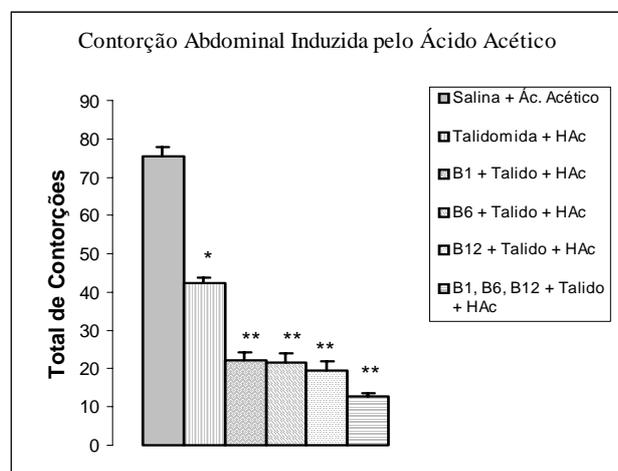


Figura 6 - Potencialização do efeito antinociceptivo da talidomida (45 mg/kg) pela tiamina, piridoxina e cianocobalamina isoladamente e pela associação tiamina/piridoxina/cianocobalamina, no modelo de contorções abdominais em camundongos.

* P<0,05 em relação ao controle

** P<0,05 em relação ao grupo Talidomida [talido] + Ácido Acético [HAc]

DISCUSSÃO

A eficácia das DAINES, como o diclofenaco, 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). 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 (Reyes-Garcia et al., 2002 e França et al., 2001). No presente estudo não se conseguiu reproduzir estes resultados com estas vitaminas. A associação das vitaminas potencializou o efeito antiedematogênico do diclofenaco, em todas as doses estudadas, quatro horas após a carragenina, assim como inibiu das contorções abdominais, sendo que apenas a vitamina B₁₂ administrada isoladamente, foi eficaz em potencializar esta ação do diclofenaco, o que preconiza o uso combinado deste antiinflamatório com estas vitaminas ou, principalmente a B₁₂, em doenças crônicas, reduzindo assim seus efeitos colaterais. Deve-se salientar que as concentrações das vitaminas e do diclofenaco 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 que é utilizada em humanos. É sabido que as vitaminas do complexo B são indispensáveis a uma série de metabolismos intermediários e que sua ausência determina o aparecimento de várias entidades patológicas, como edema. Estudos de nocicepção em animais, como contorção abdominal, parecem confirmar as propriedades analgésicas destas vitaminas (Bromm et al., 1995).

Foi descrito que a talidomida possui atividade analgésica devido ao bloqueio exercido na produção do fator de necrose tumoral (TNF- α), um mediador da inflamação. 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 ciclooxigenase 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).

A talidomida demonstrou possuir ação antiedematogênica, podendo ter seu efeito potencializado apenas quando o tratamento é associado às três vitaminas do complexo B. Diferente porém, do diclofenaco, a associação das três vitaminas foi eficaz em inibir o edema nos tempos de duas, três e quatro horas após a carragenina, o que parece indicar mecanismos diferentes de ação destas drogas antiinflamatórias. Por outro lado, as vitaminas utilizadas isoladamente ou em associação, também foram eficazes em potencializar o efeito antinociceptivo da talidomida, no teste de contorção abdominal, o que neste caso, preconiza o uso destas vitaminas isoladas ou associadas, junto com esta droga. É importante levantar a hipótese se estudos posteriores com doses menores de talidomida poderiam ser potencializados pelas vitaminas, assim, doses menores desta droga antiinflamatória poderiam

ser empregadas, diminuindo seus efeitos colaterais. Porém devido à sua ação teratogênica, não se recomenda seu uso durante a gravidez (Rang & Dale, 1993).

AGRADECIMENTO

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

ABSTRACT

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

The effects of some B vitamins on chemical nociception in mice or paw edema in rats were investigated. A combination of thiamine (B₁), pyridoxine (B₆) and cyanocobalamin (B₁₂), in doses of 100, 100 and 5mg/kg, i.p., respectively, potentiated the inhibition by diclofenac or thalidomide of paw edema induced by carrageenin in rat. Antinociceptive effects of diclofenac and thalidomide inhibition of abdominal contortion 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 thalidomide, 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 antinociceptive effects of diclofenac or thalidomide and support the use of B vitamins to shorten the treatment time and reduce the daily dose of anti-inflammatories.

Keywords: Diclofenac; thalidomide; abdominal contortion; pyridoxine; cyanocobalamin; thiamine.

REFERÊNCIAS

Borges LG, Fröenlich PE. Talidomida – novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. *Rev Assoc Med Bras* 2003;49(1):96-102.
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.

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 dipyron, 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.

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 (75 mg diclofenac vs. 75 mg diclofenac plus B-vitamins daily). *Klin Wochenschr* 1990;68(2):107-15.

Rang HP, Dale MM. *Farmacologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993. p.550-61.

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

Ribeiro RA, Vale ML, Ferreira SH, Cunha FQ. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur J Pharmacol* 2000;391(1/2):97-103.

Winer BJ, Brown DR, Michelis KM. *Statistical principles in experimental design*. 3rd.ed. New York: McGraw Hill; 1991. p.100-65