

Imp. 1.

LURDES CATARINA DA SILVA π /38
(Biomédica)

**EFEITO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS ENZIMÁTICOS
(BROMELINA, ESCINA E PAPAÍNA) NO DESENVOLVIMENTO
DE COLUNA VERTEBRAL DE RATAS**

*Esta exemplar foi doada
pelo autor com a finalidade de
a. c. n. s. 036/52
Piracicaba, 30/12/1985
Sociedade de Estudos de Odontologia,
Piracicaba, SP.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Bases Farmacológicas para a Terapêutica Medicamentosa).

PIRACICABA
1984

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À "maior" força existente dentro do meu ser, "DEUS", que sempre esteve ao meu lado, quer nos momentos de alegria, quer nos momentos de tristeza, dando-me apoio e estímulo para levar avante a longa e espinhosa jornada da "vida",

A ANTONIO MARCELINO, por ter-me dado forças, quando eu mais precisava,

ofereço este trabalho.

Aos MEUS PAIS, "in memoriam",
por terem me concebido, concedendo-me a oportunidade de
nascer e lutar por condições
melhores de "vida".

Aos MEUS IRMÃOS E CUNHADOS, que
sempre presenciaram e superestimaram o comportamento escolar
da caçulinha.

Aos MEUS SOBRINHOS, pelo incentivo,
cooperação e carinho, que me dispensaram nessa jornada de luta.

Ao Sr. MÁRIO MANTONI, a quem eu devo muito, por seus incontestáveis exemplos de dedicação e carinho, que compartilhou dos meus ideais e me incentivou a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos, dedico este trabalho, esperando que se constitua em uma pequena amostra do quanto lhe sou grata, por tudo que me proporcionou alcançar.

Ao meu orientador, Dr. SAMIR TUFIC ARBEX
(Tio Sam), a quem muito devo, quer pelo
seu permanente assessoramento intelectual
e científico, quer pela sua liderança
farmacológica e aprimoramento científico
nas lides odontológicas do país, acres-
cento os meus protestos de amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, Prof. Dr. JOSÉ ARISTODEMO PINOTTI, pela manutenção do alto nível desta excelente organização de ensino e pesquisa.

Ao Prof. Dr. ANTONIO CARLOS NEDER, ex-Diretor desta Faculdade e atual Coordenador Geral das Faculdades da Universidade Estadual de Campinas e Presidente da Funcamp, pelo apoio e atenção; pelo muito que tem feito pelo ensino e pesquisa em nossa Faculdade e por tudo o que tem representado para o desenvolvimento da Farmacologia.

Ao Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI, ilustre Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, pela atenção dirigida e pelo estímulo ao contínuo aperfeiçoamento científico.

Ao Prof. Dr. AMADO LEONISIO DE AZEVEDO, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas, pela sua atenção, inestimável apoio e auxílio durante todas as etapas do curso.

Ao companheirismo e incentivo de sempre dos Profs. Drs. MARIA DE LOURDES GARBOGGINI DA GAMA, JOÃO LEONEL JOSÉ e THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, presenças sempre constantes ao nosso lado durante este trabalho.

Ao JOSÉ MARÇAL, companheiro e amigo, pelo amor sempre a mim dedicado, que mesmo em horas roubadas pelas minhas pesquisas, nunca deixou de me dar apoio, força e carinho.

Às Prof^{as}. DULCINA V. FILETTI e MARIA GABRIELA ALVES com suas personalidades marcantes, didática e meiguice, fizeram com que eu me sentisse estimulada a trilhar os seus passos no futuro.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de O dontologia de Piracicaba - Unicamp, pelos ensinamentos e pelo apoio demonstrado.

À Prof.^a Dr.^a SONIA VIEIRA e ao Sr. RONALDO SEICHI WADA, pela amizade demonstrada e pela realização da análise estatística.

Aos colegas MARA SILVIA SALDINI BUSATO e GUSTAVO PECCININI JR., pela parte que compartilhamos durante a fase experimental.

À SUELI DUARTE DE OLIVEIRA SOLIANI, Secretária dos Cursos de Pós-Graduação, pelo companheirismo, pela sua alegria contagiante e pela grande colaboração não só no desenvolvimento deste trabalho, bem como no decorrer de todo o curso.

À amiga-irmã IRIA MARISA GEVARTOSKY, pelo apoio, conforto, carinho e amizade, que me proporcionaram forças para atingir os meus ideais.

Ao Sr. MOYSÉS JOSÉ MARIA DA SILVA, pela eficiente colaboração na parte laboratorial.

Ao Sr. NADIR TASSI, técnico de laboratório do Departamento de

Anatomia da Universidade Metodista de Piracicaba, pelo auxílio prestado na dissecação das peças para esta pesquisa.

Ao Sr. ADÁRIO CANGIANI, pela elaboração e montagem da documentação fotográfica.

À Sr.^a IVANY DO CARMO GUIDOLIM GEROLA, Bibliotecária - Chefe da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, que gentilmente nos auxiliou na ordenação e correção da revisão bibliográfica.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), pela bolsa de estudo concedida para a realização do curso.

À MARIA DE LOURDES BRUNELLI, pela realização dos desenhos e gráficos deste trabalho.

À Sr.^a SONIA MARIA A. SIMIONATO VICTÓRIA FÁVERO, pelos méritos datilográficos deste trabalho.

À Sr.^a VILMA B. DOS SANTOS, pela amizade que me proporcionou tornando mais ameno este trabalho.

Ao Prof. JUAN FRANCISCO SINCLAIR ARAUZ, pelo incentivo, pelas sugestões e pelas drogas que gentilmente foram cedidas para a realização desta pesquisa.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pela amizade e incentivo.

... Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente,
contribuíram para a realização deste trabalho. ...

nossos agradecimentos.

SUMÁRIO

	p.
1. INTRODUÇÃO	2
2. PREPOSIÇÃO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	49

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser considerada como a reação localizada dos vasos, dos gânglios linfáticos e dos tecidos, provocada pela presença de microrganismos ou de irritantes. Representa a reação básica à agressão pela qual o agente deletério tende a ser localizado e, finalmente, destruído. A inflamação é um distúrbio do equilíbrio fisiológico e bioquímico produzido na zona da lesão aguda. Pode ser considerada como a base física dos processos infecciosos. As principais etapas da inflamação podem ser assim enumeradas:

- I. Trauma
- II. Lesão Tecidual
- III. Presença de mediadores inflamatórios
- IV. Sintomas e Sinais Inflamatórios

Esta série de eventos tem como finalidade o restabelecimento da normalidade da área atingida.

A inflamação é uma reação que se inicia no momento da agressão e só termina com a reparação da área da lesão; por isso, é necessário que se tenha em mente que a inflamação não é um estado, mas sim um processo dinâmico de grande importância biológica.

Por isso, a utilização de drogas no combate à inflamação ocupa hoje um lugar de destaque na terapêutica e, nos últimos anos, tem-se acelerado o seu desenvolvimento.

As drogas anti-inflamatórias atualmente são divididas em três grandes grupos, conforme SABBAGH²⁷(1978):

1. Esteróides - constituído por hormônios corticais das supra-renais, hormônio corticotrófico (ACTH), do lobo anterior da hipófise, e os vários produtos sintéticos análogos.

2. Não esteróides e não enzimáticos ou substâncias antiflogísticas - composto pelos derivados salicílicos, pirazolônicos, fenotiazínicos, do ácido mefenâmico, do ácido níflúmico, indometacina, benzinamida, os antihistamínicos e outros.

3. Enzimáticos (enzimas proteolíticas) - formado pela hialuronidase, tripsina, quimiotripsina, alfaquimiotripsina, estreptoquinase, estreptodornase, bromelinas, papaína e escina.

Como vimos, são inúmeros os compostos anti-inflamatórios atualmente em uso. Esta grande quantidade de produtos acaba levando a um uso abusivo pela população, às vezes sem conhecer seus efeitos colaterais no organismo. Em vista disso, sempre que seja necessária a utilização de um anti-inflamatório, devemos levar em consideração uma série de fatores, que podem induzir ao aparecimento de efeitos colaterais indesejados.

Os esteróides, por exemplo, apresentam uma variada gama de efeitos colaterais, que são: cataratas, urticária, púrpura, reações anafilactóides, aumento do tempo de coagulação, pseudo-tumor cerebral, bloqueio da cortisona pelo ACTH, que pode levar as supra-renais ao colapso, espoliação do potássio com retenção de sódio, redução da síntese de mucopolissacarídeos no tecido de granulação, retardando a cicatrização, impedem a proliferação dos fibroblastos, redução da resposta antígeno-anticorpo, linfocitopenia, re

dução da resistência à infecção com agravamento de moléstias a vírus, acidose, hipersecreção gástrica e alteração do metabolismo glicídico, que pode levar à hiperglicemia. SINCLAIR ARAUZ³⁰, 1982.

MILLER²¹, 1978, na sua revisão sobre analgésicos e anti-inflamatórios não esteróides, ressalta que os salicílicos, quando usados em doses baixas, são praticamente inócuos, mas que em doses elevadas podem causar numerosos efeitos tóxicos, tais como: náusea, vômito, dermatite, surdez, vertigem, acidose, hipocoagulabilidade sanguínea, confusão mental, alucinações, delírio e coma; os derivados pirazolônicos podem causar náusea, dor epigástrica, erupções cutâneas, edema, estomatite, hemorragias, ativação de úlcera péptica, hepatite tóxica; os derivados do ácido flufenâmico podem provocar o aparecimento de alterações do trato gastrointestinal, tais como: náusea, vômito e diarreia, em aproximadamente 15% dos casos; os derivados do aminofenol têm efeitos secundários semelhantes aos salicílicos; a indometacina pode causar tonturas, cefaléia, vômitos e perturbações psíquicas, que podem impedir a continuação do tratamento em cerca de 35% dos casos; o ácido metiazínico pode provocar náusea, gastralgia, vômitos e diarreia.

Quanto às enzimas proteolíticas, PRESTES²⁵, em 1979, diz que elas têm sido o produto farmacológico que melhores resultados têm apresentado no tratamento de edemas e que apresentam bom desempenho e relativa tolerância em comparação com outros fármacos; ressalta, porém, que neste grupo, a tripsina, quimiotripsina, estreptoquinase e estreptodornase, por afinidade com elementos constituintes do plasma e soro, podem alterar o sistema imunológico, produzindo

sensibilidade e ocorrência de idiossincrasias.

Em vista do exposto, faremos, mais detalhadamente, algumas considerações sobre os anti-inflamatórios enzimáticos, de origem vegetal, que serão motivo deste trabalho.

BROMELINA

São quatro enzimas proteolíticas muito semelhantes, obtidas do caule e fruta da planta monocotiledônea *Ananas comosus*, vulgo abacaxi. MARTIN¹⁸ e cols., 1962.

O autor cita que a bromelina age sobre diversos substratos, que incluem as matérias proteicas, como a gelatina, caseína, colágeno, elastina, globulinas e fibras musculares, e que o pH, em torno de 7, é o melhor para a atividade proteolítica da bromelina.

NEUBAUER²³(1961) e VESPA³⁴(1966) verificaram que quando utilizavam a bromelina associada a antibióticos, seus efeitos eram muito mais eficazes.

NEUBAUER²³(1961); GIACCA⁸(1964); PEREGALLI²⁴(1964); SIRTORI³¹(1964) e outros, demonstraram que a bromelina é otimamente aceita pelo trato gastro-intestinal e que não provoca nenhum efeito colateral indesejável.

Novamente MARTIN¹⁸ e cols., em 1962, comprovaram que em condições iguais de dosagem, a bromelina é superior aos outros anti-inflamatórios, tais como a papaína, proteases de fungos, tripsina, etc.

Estes mesmos autores, em estudos laboratoriais,

demonstraram que a bromelina, administrada por via oral, não apresentava DL₅₀ em ratos e camundongos, e que mesmo em doses elevadíssimas, de até 10 (dez) gramas por quilo de peso, nenhum efeito desagradável foi observado com relação à toxicidade aguda. Por via intravenosa a DL₅₀, para camundongos, é de 30 (trinta) a 35 (trinta e cinco) mg/kg, e para coelhos, 20 (vinte) mg/kg; por administração intraperitoneal é de 36,7 mg/kg para camundongos, e de 85,2 mg/kg para ratos, doses essas muito elevadas em comparação com outros anti-inflamatórios.

A toxicidade crônica foi testada, também, por MARTIN¹⁸ e cols., em 1962, dando 1,0 (um) por cento de bromelina, por via oral, durante três meses, não se observou aumento de peso significante entre os animais tratados e os animais do grupo controle. Também não houve alterações nas composições morfológicas e químicas do sangue, nem alterações patológicas nos órgãos vitais.

SELTGER²⁹, 1964, em estudo controlado em 53 casos de rinoplastia, constatou que a bromelina oferece uma acentuada proteção contra o edema pós-cirúrgico.

MAMMARELLA¹⁶, 1964, refere que a bromelina tem uma ação particularmente intensa e eficaz na resolução do edema, sem agir sobre o fibrinogênio, não interferindo, portanto, com o mecanismo de coagulação.

FATINI⁷, em 1967, afirma que a bromelina é inócua, mesmo em doses elevadas.

DEMARTIN³, 1972, comparou em 56 (cinquenta e seis) pacientes, a atividade da tetranase, associação da bromelina com tetraciclina, e da tetraciclina sozinha, e verificou ser a tetranase superior, pois a bromelina potenciou

a ação da tetraciclina.

RENZINI e VARENGO²⁶, 1972, comprovaram que a bromelina potencia os antibióticos em aproximadamente 200% e que o antibiótico atingia níveis séricos mais elevados e permanecia nos fluidos orgânicos por muito mais tempo.

ESCINA

É uma mistura de glucosídeos e rahmnosídeos obtida do *Aesculus hippocastanum*, vulgo castanha da Índia.

Farmacologicamente, a escina modifica a capacidade exudativa da membrana capilar, sem alterar o equilíbrio das macromoléculas do plasma, desenvolvendo ação detumescente, anti-edematosa e anti-inflamatória, nos tecidos afetados. Em suma, a escina atua de preferência sobre a membrana capilar, promovendo retorno da permeabilidade, combatendo a inflamação e melhorando as condições circulatórias. GOLDENBERG¹⁰, 1979.

EVERSMANN⁵, em 1960, trabalhando com 140 (cento e quarenta) pacientes, na dosagem de 10-20 mg diárias durante 4-5 dias, verificou um caso de exantema alérgico e um caso de forte sensação de vômito.

SIERING²⁹, 1962, verificou que a escina modificava a capacidade exsudativa da membrana celular, alterando o equilíbrio sódio-potássio, liberando potássio e retraindo sódio. Em 1961, esses autores já tinham estabelecido que a escina provocava uma variação da permeabilidade capilar.

LUCAS¹⁴, 1963, observou que em doses de até

10 (dez) mg por dia, a escina apresenta boa tolerância, sem que haja manifestações alérgicas.

Em 1968, MAGLIULO¹⁵ e cols. verificaram que mesmo que a escina induzisse a uma diminuição da celularidade dos exsudatos, especialmente com relação ao número de macrófagos, não havia alteração na velocidade de locomoção e índice fagocítico das células inflamatórias, e não tinha efeitos indesejados sobre a medula óssea.

KOBERG¹¹, 1968, em pesquisas realizadas com pacientes, observou que 4% dos mesmos apresentaram sinais de intolerância gástrica.

Em 1970, VOGEL³⁶ e cols., em pesquisas laboratoriais, acharam que a escina, quando usada em doses elevadas, provocava toxicidade aguda, com a morte do animal, devido à intensa hemorragia. Apresentava também toxicidade crônica, quando utilizada em tratamentos longos, com doses pequenas, provocando a morte dos animais, provavelmente pela atividade tóxica cerebral da escina.

LOCKS¹³, 1974, verificou que a escina provoca uma contração lenta e irreversível das veias (em bovinos e humanos), quando usada em doses elevadas.

GOLDENBERG¹⁰ e col., 1979, afirmam que a escina não provoca alterações patológicas nos tecidos, nem com prometimentos hemolíticos, nem teratogênicos.

PAPAÍNA

É uma protease sulfidrídica obtida do latex da *Carica papaya*, planta dicotiledônea, vulgarmente conhecida pelo nome de mamão.

As preparações comerciais da papaína têm três formas de enzima: 1) enzima ativa; 2) enzima inativa, ativável; 3) enzima inativa, não ativável. GLICK⁹ e col., 1976.

A papaína é obtida por precipitação, utilizando cloreto de sódio e pela cromatografia de afinidade do precipitado redissolvido. BURKE¹ e cols., 1974.

Os efeitos colaterais dessa droga são bastante grandes, de acordo com vários autores, tais como:

MARTIN¹⁷ e cols., em 1957, ao efetuarem estudos comparativos em ratos, com outros seis anti-inflamatórios, acharam que tanto a tripsina quanto a quimiotripsina são mais efetivas que a própria papaína na diminuição do edema, quando injetadas no trato intestinal.

McCLUSKEY²⁰ e col., 1958, verificaram que a papaína causa alterações na matriz da cartilagem, "in vivo", em experiências efetuadas em coelhos.

Em 1959, ENGFELDT⁴ e cols. comprovaram que em cães jovens, a papaína provocava alterações na cartilagem epifisial, causando danos consideráveis nas células em proliferação, nas hipertróficas e alterava a matriz; necrose e epifisiólise, na região limite entre epífise e diáfise, mas que a papaína tinha essa seletividade pela cartilagem dos cães em crescimento e não pela cartilagem de cães adultos.

MERKOW¹⁹ e col., em 1961, verificaram que a

papaína produz fechamento prematuro da placa epifisiária, com retardamento no crescimento longitudinal dos ossos longos, provocando, também, rigidez da coluna vertebral e malformações do tórax. Aparentemente essas malformações decorrem da clivagem do condroitinsulfato da cartilagem, pois há um aumento desse componente na urina do animal de laboratório, após injeção de papaína.

THOREK³³ e col., 1974, referem que, mesmo observando menor grau de inflamação nos pacientes tratados com papaína, quando comparados com o grupo controle, a diferença foi considerada estatisticamente insignificante.

SNIDER³² e cols., em 1974, verificaram que a papaína, inalada em pequenas doses, provoca enfisema em hamsters, coelhos e cachorros.

KVINNSLAND¹², 1974, comprovou que em ratos em crescimento, submetidos a doses repetidas de papaína, esta droga, agindo sobre a cartilagem, causava redução do crescimento crânio-facial e que age também sobre zonas de crescimento epifisial em coelhos, gatos, ratos, cães e camundongos.

Já MILNE²² e col., em 1975, verificaram que a papaína quando inalada, além de enfisemas pulmonares, causa também reações asmáticas agudas.

Em 1976, CACI² fez estudos sobre a ação anti edematosa da papaína, comparada com a prednisolona, e verificou que essa ação é semelhante entre as drogas, mas que a papaína era menos eficaz na diminuição da dor e do trismo, resultantes de casos pós-operatórios de pacientes submetidos a extrações de terceiros molares.

SINCLAIR ARAUZ³⁰, 1982, trabalhando com vá
rias enzimas de origem vegetal, em cirurgia, concluiu que o
tempo de recuperação dos animais tratados com bromelina e
escina, é menor que o dos animais tratados com papaína.

Quanto à segurança da papaína, existe um gran
de número de trabalhos, que levam a concluir que a papaína
é de grande toxicidade. McCLUSKEY²⁰ e cols., 1958; ENGFELDT⁴
e cols., 1959; MERKOW¹⁹ e col., 1961; SNIDER³² e col., 1974;
KVINNSLAND¹², 1974; e MILNE²² e col., 1975.

2. PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem, por objetivo, estudar os efeitos colaterais que os anti-inflamatórios enzimáticos, de origem vegetal (bromelina, escina e papaína), possuem sobre a coluna vertebral de ratas, em diversas condições experimentais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. ANIMAIS

O trabalho foi desenvolvido com a utilização de 44 (quarenta e quatro) ratas, *Rattus norvegicus*, variedade albinos, Rodentia Mammalia, da linhagem Wistar.

No início do trabalho utilizamos 16 (dezeseis) ratas, que foram acasaladas e divididas em quatro grupos.

O restante dos 28 (vinte e oito) animais, resultado da prenhez dos quatro grupos acima citados, foi subdividido em 7 (sete) grupos, de 4 (quatro) animais cada um.

3.1.2. MATERIAL UTILIZADO

- . Seringas (Luer) centesimais de 1,0 ml
- . Agulhas hipodérmicas "descartáveis" 40/6
- . Bisturi e lâminas 3 e 4
- . Campânulas de vidro
- . Tesoura cirúrgica
- . Pinça cirúrgica
- . Balança de laboratório (mg)
- . Balança milimétrica
- . Frascos variados
- . Mesa cirúrgica para ratos

- . Algodão
- . Gase
- . Filmes fotográficos
- . Lupa
- . Paquímetro

3.1.3. DROGAS UTILIZADAS

- . Bromelina - Laboratório Sintofarma - em pó cristalizado;
- . Escina - "Reparil^(R)" - Laboratório Lorenzini;
- . Papaína - "Tromasin^(R)" - Laboratório Warner;
- . Solução salina - 0,9% - NaCl
- . Éter sulfúrico - Indofarma Indústria e Comércio de Produtos Químicos;
- . Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂ - 130 volumes - 10% - Qeel Indústrias Químicas.

3.1.4. DOSAGEM ADMINISTRADA

As doses administradas são de uso terapêutico no homem, tendo sido calculadas de conformidade com as especificações dos respectivos laboratórios, extrapolando-se a porcentagem de sua administração para o peso animal.

Sendo assim, obtivemos:

- . Bromelina - 1,150 mg/kg por dia;
- . Escina - 1,143 mg/kg por dia e
- . Papaína - 1,700 µg/kg por dia.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos em 4 (quatro) grupos e 7 (sete) sub-grupos de 4 (quatro) animais cada um, totalizando 44 (quarenta e quatro) animais.

Grupo I

Quatro ratas prenhas, que não receberam nenhum tipo de droga, constituíram o grupo controle.

Sub-Grupo I.A

Os filhotes desenvolveram-se naturalmente, sob controle de peso semanal, até atingirem a maturidade óssea, quando, então, foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico, sob campânula de vidro, e suas colunas vertebrais, retiradas e dissecadas.

Grupo II

Quatro ratas prenhas receberam, durante a prenhez, aplicações intraperitoniais de bromelina, em doses terapêuticas, diariamente.

Os filhotes que nasceram, foram divididos em 2 (dois) sub-grupos:

- . Sub-grupo II.A e
- . Sub-grupo II.B

Sub-Grupo II.A

Os animais desse sub-grupo não receberam nenhum medicamento. Cresceram até a maturidade óssea, sendo pesados semanalmente, após o que foram sacrificados pelo mesmo pro-

cedimento adotado no Grupo I.

Sub-Grupo II.B

Esses animais receberam, diariamente, o mesmo medicamento administrado à mãe - "Bromelina". A dosagem foi aumentada proporcionalmente à variação de peso semanal, até que os animais atingissem a maturidade, após o que foi utilizado o mesmo procedimento adotado no Grupo I.

Grupo III

Quatro ratas prenhas que receberam aplicações de "Escina", em doses terapêuticas diárias.

Os filhotes que nasceram, foram divididos em 2 (dois) sub-grupos:

- . Sub-grupo III.A e
- . Sub-grupo III.B

Sub-Grupo III.A

Esses animais não receberam nenhum medicamento. Eles foram pesados semanalmente e ao atingirem a maturidade óssea, foram sacrificados pelo mesmo procedimento adotado no Grupo I.

Sub-Grupo III.B

Esses animais receberam, diariamente, o mesmo medicamento administrado à mãe - "Escina". A dosagem foi aumentada proporcionalmente à variação de peso semanal, até que os animais atingissem a maturidade, após o que foi utilizado o mesmo procedimento adotado no Grupo I.

Grupo IV

Quatro ratas prenhas que receberam aplicações de "Papaína", em doses terapêuticas diárias.

Os filhotes que nasceram, foram divididos em 2 (dois) sub-grupos:

- . Sub-grupo IV.A e
- . Sub-grupo IV.B

Sub-Grupo IV.A

Esses animais não receberam nenhum medicamento. Eles foram pesados semanalmente e ao atingirem a maturidade óssea, foram sacrificados pelo mesmo procedimento adotado no Grupo I.

Sub-Grupo IV.B

Esses animais receberam, diariamente, o mesmo medicamento administrado à mãe - "Papaína". A dosagem foi aumentada proporcionalmente à variação de peso semanal, até que os animais atingissem a maturidade óssea, após o que foi utilizado o mesmo procedimento adotado no Grupo I.

3.2.2. TÉCNICA DE OBTENÇÃO DAS COLUNAS VERTEBRAIS

Logo após o sacrifício dos animais, procedeu-se a remoção de uma grande parte dos tecidos moles e as colunas foram colocadas em uma solução de formól a 10%, por um período de 7 (sete) dias para a sua fixação, quando, então, foram retiradas da mesma e colocadas em água corrente, facilitando, desta forma, a retirada do resto dos tecidos moles com a utilização de pinças, bisturi e lupa, mantendo-se ape

nas a coluna vertebral, que é composta de 7 vértebras cervicais (C 7), 13 vértebras torácicas (T 13), 6 vértebras lombares (L 6), 4 vértebras sacrais (S 4) e 17 a 20 vértebras caudais. (FARRIS E GRIFFITH⁶, 1967).

As colunas vertebrais foram colocadas em uma solução de peróxido de hidrogênio, por 24 horas aproximadamente, até tomar uma cor esbranquiçada. Em seguida, colocou-se em cima de uma tábua em posição original e levou-se ao sol para secar, por um período de 8 horas.

3,2,3. TÉCNICA DE MENSURAÇÃO

As medidas de comprimento das colunas vertebrais foram obtidas através da técnica de mensuração, realizada com um paquímetro "MAUB" polonês, de precisão em décimos de milímetro.

As medidas apresentadas foram calculadas em centímetro, quando tomou-se como referência a primeira cervical (C 1) até a última sacral (S 4), obtendo-se, então, os resultados.

3,2,4. ANÁLISE ESTATÍSTICA UTILIZADA

A análise estatística utilizada foi uma análise de variância inteiramente ao acaso. Obtendo-se resultados significativos, aplicou-se o teste de Tukey.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

A tabela I e os gráficos de número 1 a 3 representam, respectivamente, os valores médios de peso e a curva de crescimento dos animais, que foram submetidos a controle semanal de peso desde o início do experimento até atingirem a maturidade óssea, identificados pelos valores aproximados durante 3 (três) semanas consecutivas.

Na tabela I, portanto, observamos os valores médios de peso de quatro animais, durante todo o seu desenvolvimento, do grupo I - controle - e dos sub-grupos II.A e II.B, submetidos ã Bromelina, III.A e III.B, submetidos ã Escina e IV.A e IV.B, submetidos ã Papaína.

Tabela I - Valores médios de peso dos animais do grupo I - controle - e dos sub-grupos II.A, II.B, III.A, III.B, IV.A e IV.B, desde o desmame até a plenitude do crescimento somático.

semanas grupos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Controle	41,2	55,8	80,3	111,2	136,2	138,5	161,0	173,4	180,0	190,4	195,4	199,8	201,8	210,8	216,6	215,8	219,4
Sub-g. II.A	42,6	55,3	78,6	99,8	124,5	138,0	149,0	159,0	167,7	177,6	182,0	186,2	191,5	193,5	198,0	197,5	202,2
Sub-g. II.B	58,9	74,7	98,9	125,5	145,3	152,3	164,5	178,2	188,7	197,5	205,1	208,5	211,5	213,7	215,3	216,0	220,0
Sub-g. III.A	60,9	78,0	110,7	133,2	158,3	174,0	196,2	209,0	229,5	264,6	275,2	282,0	287,4	298,6	306,4	304,8	295,8
Sub-g. III.B	52,6	67,2	82,6	102,8	120,0	134,1	144,5	153,8	162,4	176,3	181,2	186,6	188,2	192,9	196,3	193,8	198,0
Sub-g. IV.A	43,4	74,6	104,4	125,1	150,7	157,2	172,7	185,8	190,0	202,3	202,7	208,1	211,0	212,2	214,9	218,2	220,0
Sub-g. IV.B	45,4	75,1	104,1	124,0	145,4	159,1	174,7	186,9	197,0	208,1	213,2	217,4	221,8	224,0	236,0	236,6	252,4

Nos gráficos que se seguem, temos:

No gráfico 1, a comparação de crescimento entre o grupo controle e os sub-grupos II.A e II.B.

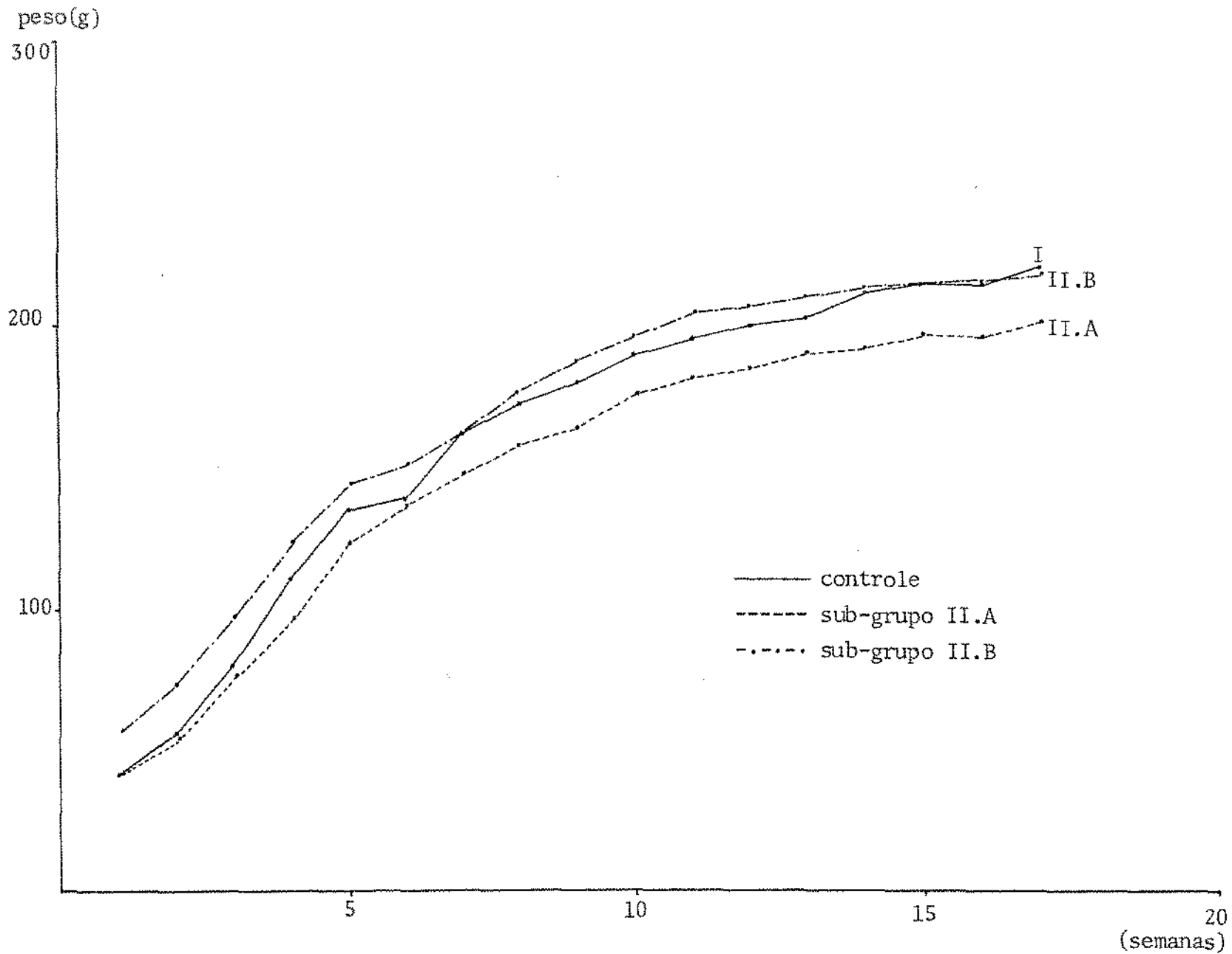


Gráfico 1 - Ganho médio de peso das ratas dos sub-grupos II.A e II.B, submetidas à ação da Bromelina, comparadas com o grupo I.

No gráfico 2, a curva de crescimento comparati
va entre o grupo I - controle - e os sub-grupos III.A e
III.B.

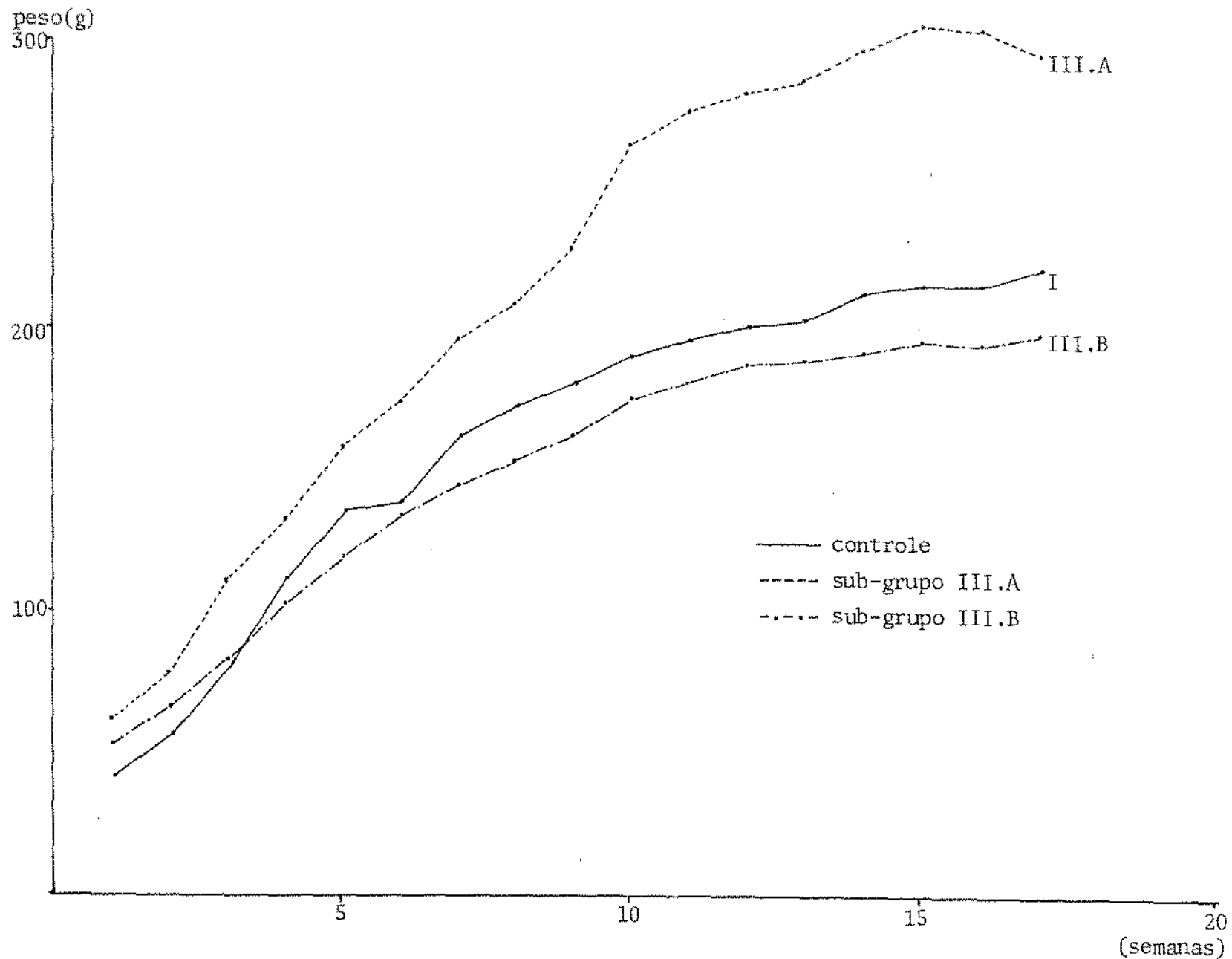


Gráfico 2 - Ganho médio de peso das ratas dos sub-grupos III.A e III.B, submetidas à ação da Escina, comparadas com o grupo I.

No gráfico 3, a curva de crescimento comparativa entre o grupo I - controle - e os sub-grupos IV.A e IV. B.

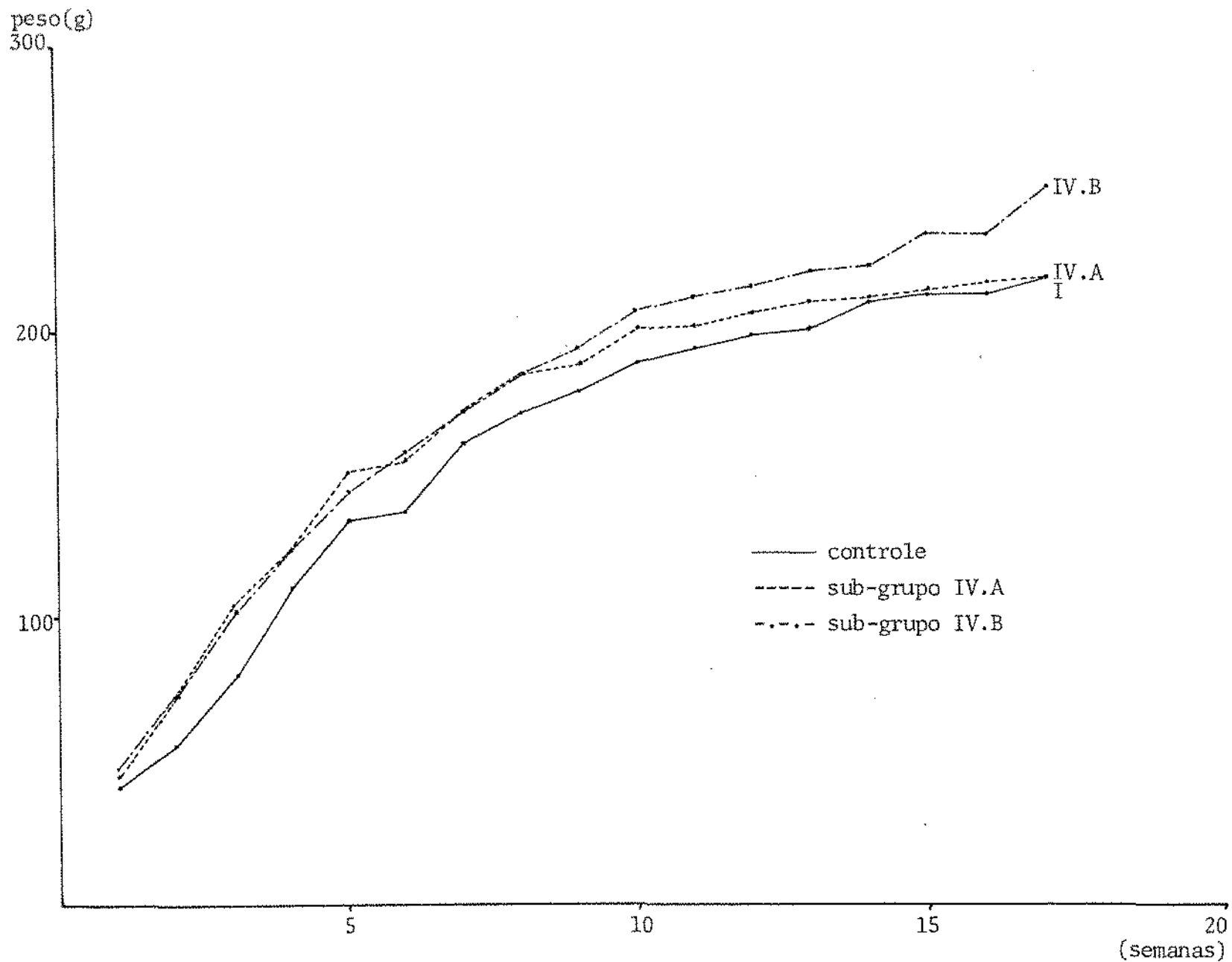


Gráfico 3 - Ganho médio de peso das ratas dos sub-grupos IV.A e IV.B, submetidas à ação da Papaína, comparadas com o grupo I.

Na sequência fotográfica, podemos observar, através do tamanho das colunas vertebrais, expresso em cm, os diversos grupos em estudo.

Assim sendo, temos:

Na **fotografia 1** - comparamos o grupo I (controle) com o sub-grupo II.A, que foram animais que só as mães tomaram Bromelina, durante a prenhez.

Na **fotografia 2** - comparamos o grupo I (controle) com o sub-grupo II.B, que foram animais que as mães tomaram Bromelina durante a prenhez e os filhotes, durante o seu desenvolvimento.

Na **fotografia 3** - comparamos o grupo I (controle) com o sub-grupo III.A, que foram animais que só as mães tomaram Escina durante a prenhez.

Na **fotografia 4** - comparamos o grupo I (controle) com o sub-grupo III.B, que foram animais que as mães tomaram Escina durante a prenhez e os filhotes, durante o seu desenvolvimento.

Na **fotografia 5** - comparamos o grupo I (controle) com o sub-grupo IV.A, que foram animais que só as mães tomaram Papaína durante a prenhez.

Na **fotografia 6** - comparamos o grupo I (controle) com o sub-grupo IV.B, que foram animais que as mães tomaram Papaína durante a prenhez e os filhotes, durante o seu desenvolvimento.



Fotografia 1 - Colunas vertebrais dos animais do grupo I - controle, comparadas com as dos animais do sub-grupo II.A.



Fotografia 2 - Colunas vertebrais dos animais do Grupo I - controle, comparadas com as dos animais do sub-grupo II.B.



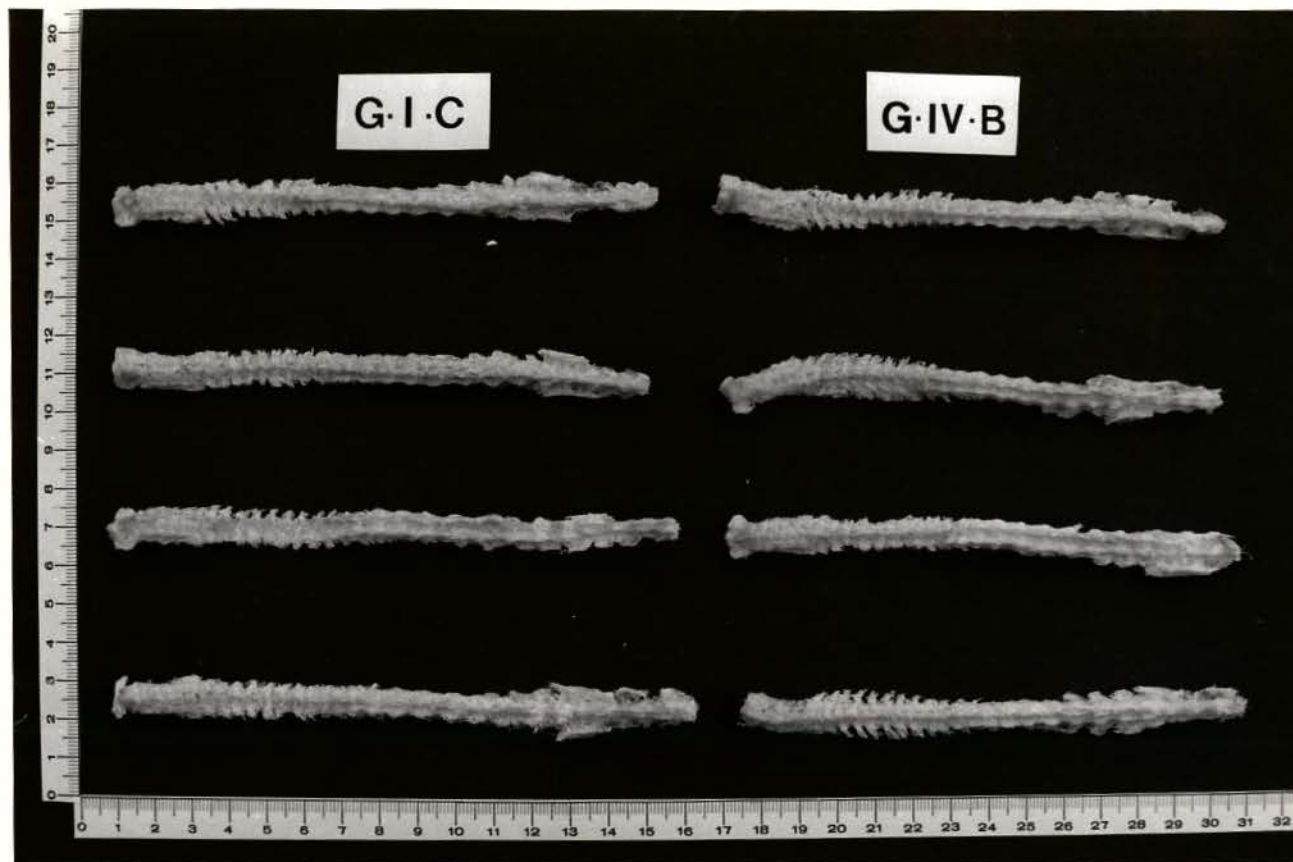
Fotografia 3 - Colunas vertebrais dos animais do grupo I - controle, comparadas com as dos animais do sub-grupo III.A.



Fotografia 4 - Colunas vertebrais dos animais do grupo I - controle, comparadas com as dos animais do sub-grupo III.B.



Fotografia 5 - Colunas vertebrais dos animais do grupo I - controle, comparadas com as dos animais do sub-grupo IV.A.



Fotografia 6 - Colunas vertebrais dos animais do grupo I - controle, comparadas com as dos animais do sub-grupo IV.B.

As medidas de comprimento das colunas vertebrais das ratas, pertencentes aos grupos por nós estudados, são apresentadas na tabela II.

Tabela II - Valores em cm, referentes ao comprimento das colunas vertebrais dos grupos experimentais.

GRUPO CONTROLE	BROMELINA		ESCINA		PAPAÍNA	
	II.A	II.B	III.A	III.B	IV.A	IV.B
13,03	11,12	11,54	11,42	11,44	10,71	11,84
14,09	11,94	12,22	11,88	12,06	11,46	12,12
14,56	11,96	12,25	11,97	12,18	11,84	12,35
14,50	11,98	11,32	12,18	12,42	12,22	13,41

Como verificamos por essa tabela, temos representados os grupos assim distribuídos:

- . Grupo I - controle.
- . Grupo II.A - animais cujas mães receberam Bromelina.
- . Grupo II.B - animais que receberam Bromelina diariamente, até atingirem a maturidade óssea.
- . Grupo III.A - animais cujas mães receberam Escina.
- . Grupo III.B - animais que receberam Escina, diariamente, até atingirem a maturidade óssea.
- . Grupo IV.A - animais cujas mães receberam Papaína.

. Grupo IV.B - animais que receberam Papaína, diariamente, até atingirem a maturidade óssea.

Os dados na tabela II foram submetidos a uma análise de variância inteiramente ao acaso (VIEIRA³⁵, 1981), conforme verificamos na tabela III.

Tabela III - Análise de variância dos valores constantes na tabela II.

CAUSAS DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
TRATAMENTO	6	17,4013	2,9002	9,8278*
RESÍDUO	21	6,1966	0,2951	
TOTAL	27	23,5979		

* nível de significância de 5%

Com base nessa análise, foi possível verificar que existe diferença média entre tratamentos, ao nível de significância de 5%.

Foi feito o teste de Tukey, ao nível de 5%, para determinar a d.m.s. (diferença mínima significante).

Esse valor permite distinguir médias estatisticamente diferentes. As médias e a d.m.s. estão na tabela IV.

Tabela IV - Médias dos tratamentos, obtidas da tabela II.

CONTROLE	II.A	II.B	III.A	III.B	IV.A	IV.B	dms
14,045	11,75	11,833	11,86	12,02	11,55	12,43	1,25

Com base na comparação entre as diferenças de médias e a d.m.s., conclui-se que:

- 1 em média C > II.A
- 2 em média C > II.B
- 3 em média C > III.A
- 4 em média C > III.B
- 5 em média C > IV.A
- 6 em média C > IV.B

Todos esses resultados são apresentados no gráfico 4, para uma melhor visualização.

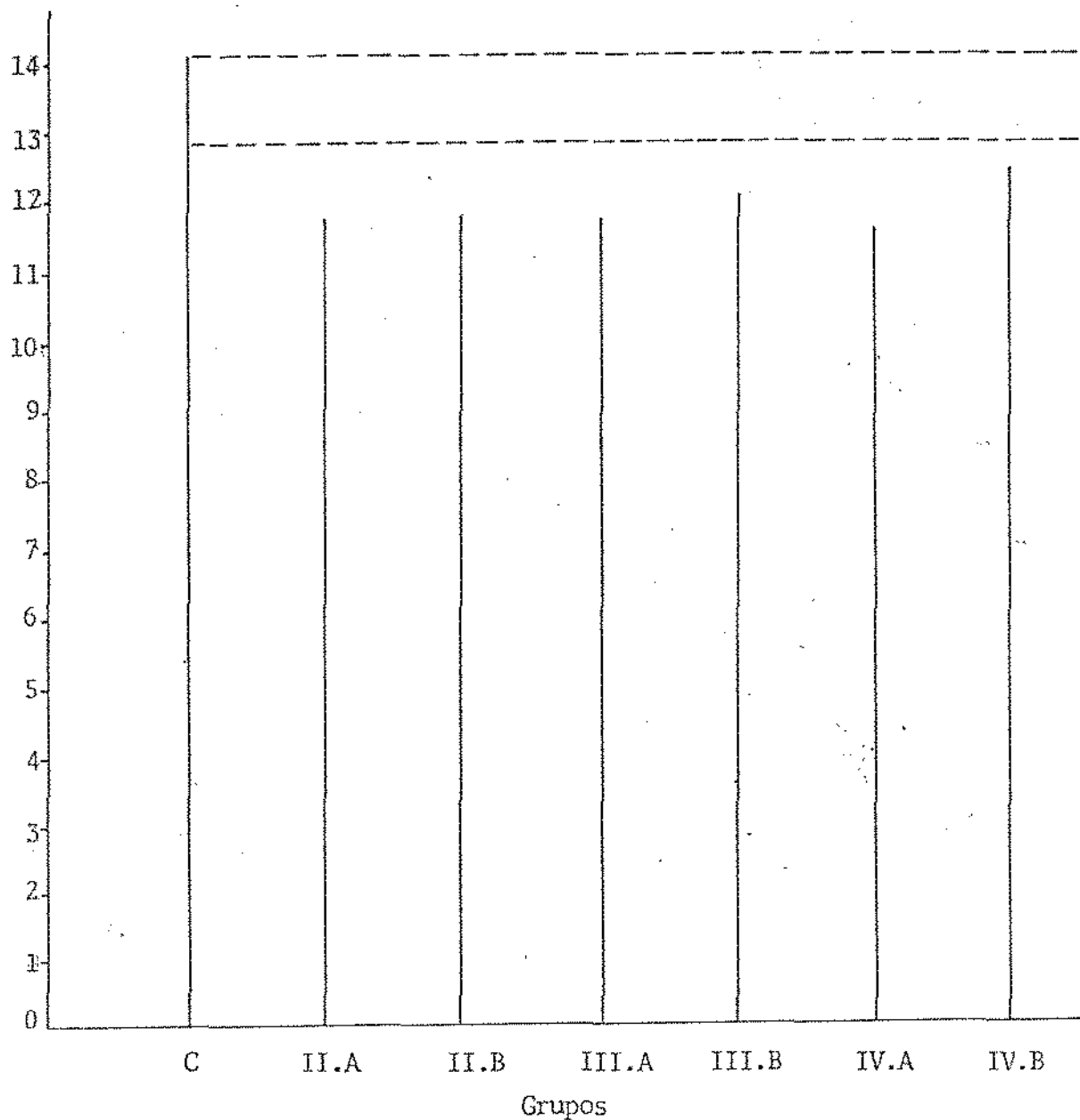


Gráfico 4 - Gráfico de barras para comparação de médias de tratamentos com a respectiva d.m.s..

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Através da revista da bibliografia, verificamos que atualmente os anti-inflamatórios enzimáticos, de origem vegetal, produzem vários efeitos colaterais.

A nossa preocupação inicial prendia-se às observações tanto de McCLUSKEY²⁰ e col., 1958, como de ENGFELDT⁴ e col., 1959, que comprovaram que a papaína provocava alterações na cartilagem epifisial somente dos cães em crescimento.

KVINNSLAND¹², em 1974, observou a mesma coisa em coelhos, gatos, ratos e camundongos, tendo observado, também, que ratos em crescimento, submetidos à dose repetida de papaína, essa droga, agindo sobre a cartilagem, causava redução do crescimento crânio-facial.

Também nos chamou a atenção o trabalho de MERKOW¹⁹ e col., em 1961, que verificaram o fechamento prematuro da placa epifisial e também rigidez da coluna vertebral e má formação do tórax, provocados pela papaína.

Essas mesmas observações nos levaram a verificar esses efeitos sobre a coluna vertebral, mas utilizando não só a papaína como também a bromelina e a escina.

Nossas observações iniciam-se a partir do desmame dos animais, quando então começamos a pesagem dos mesmos.

Esses resultados estão expressos na tabela I e nos gráficos de 1 a 3, que nos permitem comparar o crescimento dos diversos grupos em estudo, com o grupo controle.

Verificamos, de uma maneira bastante evidente, uma diferença significativa do sub-grupo III.A, isto é, os animais que somente as mães tomaram escina durante a pre ne z, quando comparados com o grupo controle.

Esse sub-grupo apresentou um crescimento bastante grande, não só em relação ao grupo controle, como também em relação aos outros sub-grupos em estudo.

Na bibliografia consultada, não encontramos nada que pudesse nos responder o que de fato havia ocorrido para obtermos esses resultados.

Nossos resultados também confirmam os de MAR TIN¹⁸ e cols., em 1962, que administrando bromelina por via oral, observou que não houve alterações de peso significan te entre os animais tratados e os animais do grupo controle.

Em contrapartida, se verificarmos através de um exame visual e mesmo pelas medidas, as fotografias das colunas dos diversos sub-grupos comparadas com as do grupo controle, constatamos que de fato há uma deformação da estrutura da coluna vertebral, fato esse bastante nítido no sub-grupo III.B, isto é, aqueles animais que tomaram a esci na durante todo o seu período de crescimento.

Além das alterações morfológicas verificadas nas colunas, podemos também observar nas fotografias que há uma diminuição no comprimento das mesmas.

Todas essas colunas foram medidas no seu com pr imento e os seus valores estão expressos na tabela II.

Esses resultados receberam um tratamento es tatístico de análise de variância e também teste de Tukey

ao nível de 5%, para se determinar a diferença mínima significante.

Com base nestas análises, concluímos que as colunas do grupo controle são, em média, maiores que as dos demais sub-grupos, dando-nos, assim, a certeza de que as três drogas, por nós utilizadas, realmente produziram um efeito de retardamento no crescimento das colunas vertebrais.

O gráfico 4 nos dá uma visão ampla do que foi citado anteriormente, onde podemos observar que o grupo mais atingido no bloqueio do crescimento das colunas foi o sub-grupo IV.A, isto é, aqueles animais que somente as mães tomaram papaína durante o período de prenhez.

Por outro lado, verificamos que os animais menos atingidos no desenvolvimento de suas colunas foram os do sub-grupo IV.B, isto é, aqueles animais que tomaram pa-paína durante o seu período de desenvolvimento.

Os resultados encontrados nos sub-grupos II.A, II.B e III.A, isto é, animais que sô as mães receberam bromelina, animais que receberam bromelina durante o desen-volvimento e animais que as mães receberam escina durante a prenhez, respectivamente, foram praticamente os mesmos, ape-sar de na média, como já foi citado, terem sido menores do que o do grupo controle.

Outro sub-grupo, que também pouco se diferen-ciou do grupo controle, foi o sub-grupo III.B, isto é, ani-mais que tomaram escina durante todo o seu desenvolvimento, fato esse também observado em relação ao sub-grupo II.B, cu-jos animais tomaram bromelina durante o seu desenvolvimento.

Esses resultados nos surpreendeu, pois como

verificamos pela bibliografia consultada, era de se esperar que ocorresse uma diminuição das colunas exatamente nos ani mais que tomaram a droga durante o período de crescimento, fato este que não aconteceu.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, concluimos que:

1. As três drogas anti-inflamatórias de origem vegetal, Bromelina, Escina e Papaína, causaram redução do crescimento das colunas vertebrais de ratas.

2. O sub-grupo IV.A, onde só as mães tomaram papaína durante a prenhez, foi o mais atingido no crescimento da coluna vertebral e o sub-grupo IV.B, onde as mães e os filhotes tomaram a papaína, foi o menos atingido.

3. Quanto ao crescimento, o sub-grupo III.A, composto por animais que tomaram escina durante a prenhez, apresentou um aumento de peso significativo em relação ao grupo controle.

4. Quanto à má formação da coluna vertebral, todos os sub-grupos apresentaram leves deformações em relação ao grupo controle, sendo que o sub-grupo III.B, onde as mães e os filhotes tomaram escina, foi o que apresentou maior deformação na estrutura da coluna vertebral.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. BURKE, D.E.; LEWIS, S.D.; SHAFER, J.A. A two-step procedure for purification of papain from extract of papaya latex. Archs Biochem. Biophys., 164(1): 30-6, 1974.
2. CACI, F. & GLUCK, G.M. Double-blind study of prednisolone and papase as inhibitors of complications after oral surgery. J. Am. dent. Ass., 93(2): 325-7, 1976.
3. DEMARTIN, F. Sperimentazione clinica controllata della specialità medicinale tetranase in ortopedia e traumatologia. Minerva med., Roma, 63: 3233-44, 1972.
4. ENGFELDT, B.; HULTH, A.; WESTERBORN, O. Effect of papain on bone. Archs Path., 68: 600-14, 1959.
5. EVERSMAAN, R. O tratamento medicamentoso do edema após intervenções cirúrgicas no maxilar. Dt.zahnarztl.Z., 24: 238, 1960.
6. FARRIS, E.J. & GRIFFITH JR., J.Q., eds. The rat in laboratory investigation. 2. ed. New York, Hafner Publ., 1967. cap. 3, p.24.
7. FATINI, G.; GALLENGA, G.C.; VELTRONI, A. Un nuovo enzima vegetale (bromelina) nella terapia chirurgica. Minerva chir., 65: 814, 1967.

8. GIACCA, S. Sperimentazione clinica dell'Ananase. Mi-
nerva med., Roma, 55(98): 3925-28, 1964.
9. GLICK, B. & BRUBACKER, L.J. An examination of the rate
assay to determine the active-site normality of pa
pain. Analyt. Biochem., 73: 419-32, 1976.
10. GOLDENBERG, N. & PRESTES, N.M. Tratamento preventivo
dos edemas em cirurgia bucomaxilofacial com o empre
go da escina (estudo experimental). In: CONGRESSO
BRASILEIRO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO -
FACIAL, 5., São Paulo, 1979. [Separata]
11. KOBERG, W. Profilaxia e terapia dos edemas pós-operatô
rios da face e do maxilar. Zentbl. Chir., 93(10) :
381-7, 1968.
12. KVINNSLAND, S. Craniofacial skeletal changes in young
rats induced by prolonged papain administration. Gro-
wth, 38(3): 381-7, 1974.
13. LOCKS, H. The influence of horse chestnut extracts on
venous tone. Arzneimittel-Forsch, 24(9): 1347-50,
1974.
14. LUCAS, J. Experiência com a escina em terapia interna.
Medsche Welt, Stuttg., 16: 913-6, 1963. [Tradução]
15. MAGLIULO, E.; CARCÓ, F.P.; GORINI, S.; BARIGAZZI, G.M.
In vivo and in vitro researches on the antiphlogis
tic action of the escine. Archs Sci. méd., 125(6) :

207-18, 1968.

16. MAMMARELLA, E. Osservazioni cliniche sulla possibilità di impiego in oculistica della bromelina. Minerva med., Roma, 55(98): 3935, 1964.
17. MARTIN, G.J.; BRENDDEL, R.; BEILER, J.M. Absorption of enzymes from the intestinal tract. Am. J. Pharm., 129: 194-7, 1957.
18. _____; EHRENREICH, M.A.; ASBELL, N. Bromelain. Pine apple protease with anti-edema-activity. Expl. Med. Surg., 20: 227-47, 1962.
19. MERKOW, L. & LALICH, J.J. Skeletal changes in suckling rats, induced by prolonged papain administration. J. Bone Jt Surg., 43: 670-86, 1961.
20. McCLUSKEY, R.T. & THOMAZ, L. The removal of cartilage matrix, in vivo, by papain. Identification of crystalline papain protease as the cause of the phenomenon. J. exp. Med., 108: 371-83, 1958.
21. MILLER, O. Analgésicos e anti-inflamatórios não esteróides. Revisão e atualização. Odontólogo Mod., 5 (5): 5-13, 1978.
22. MILNE, J. & BRAND, S. Occupational asthma after inhalation of dust of the proteolytic enzyme. Papain. Br. J. ind. Med., 34(4): 302-7, 1975.

23. NEUBAUER, R.A. A plant protease for potentiation and possible replacement of antibiotics. Expl Med.Surg., 19: 143-60, 1961.
24. PEREGALLI, P.F. Impiego orale della bromelina (Ananase) nel trattamento degli edemi ed ematomi nella pratica ortopedico-traumatologica. Minerva med., Roma, 55 (98): 3932-5, 1964.
25. PRESTES, N.M. Vantagens do uso da escina no tratamento e profiloxina dos edemas em cirurgia oral menor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ODONTOLOGIA, 14. Porto Alegre, 1979. [Separata]
26. RENZINI, G. & VARENGO, M. Assorbimento della tetraciclina in associazione con bromelina per via orale. Minerva med., Roma, 63: 3213-8, 1972.
27. SABBAGH, A. Efeitos colaterais das drogas anti-inflamatórias sobre os valores hematológicos e os fatores da autohemostasia. Ars Curandi Odont., 5(7): 4-14, 1978.
28. SELTZER, A.P. Riduzione dell'edema posto-operatorio e dell'equimosi per mezzo di un enzima orale (bromelina). Minerva med., Roma, 55(98): 3958-60, 1964.
29. SIERING, H. The permeability of cell membranes for ions under the influence of aescin. Arzneimittel-Forsch., 12: 376-8, 1962.

30. SINCLAIR ARAUZ, J.F. Estudo comparativo dos anti-inflamatórios de origem vegetal (bromelina, escina e papaína) em cirurgia. Piracicaba, 1982. |Tese (Mestrado) - Fac. Odontologia - Unicamp|
31. SIRTORI, C.M. Sperimentazione clinica della specialità - Ananase -. Minerva med., Roma, 55(98): 3228-32, 1964.
32. SNIDER, G.L.; HAYES, J.A.; FRANZBLAU, C.; KAGAN, H.M.; STONE, P.S.; KORTHY, A.L. Relationship between elastolytic activity and experimental emphysema. Induced properties of papain preparations. A. Rev. Respir. Dis., 11(3): 254-62, 1974.
33. THOREK, P. & PANDIT, J.K. Proteolytic enzymes in wound repair. Immediate post-operative effects. Appl. Ther., 6: 323-5, 1974.
34. VESPA, N. Sperimentazione clinica controllata del tranase in campo odontoiatrico. Minerva med., Roma, 62: 3219-25, 1966.
35. VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro, Ed. Campus, 1981. 294 p. cap. 14, p. 223-45.
36. VOGEL, G.; MAREK, M.L.; OETNER, R. Studies on the mechanisms of therapeutic and toxic action of the horse chestnut saponin escin. Arzneimittel-Forsch., 20(5) : 699-703, 1970.