

*Este exemplar
foi devidamente
classificado conforme
resolução CCPA/036/83
Piracicaba 22/09/91*

SERGIO ARMANDO RENSI

EFEITOS DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS VEGETAIS (PAPAINA E ESCINA)
NA VELOCIDADE DE MINERALIZAÇÃO DO OSSO FÊMUR DE RATOS

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campi
nas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências, na área de
Fisiologia e Biofísica do Siste
ma Estomatognático.

Orientador: Prof. Dr. Décio Teixeira

9223467/BC

PIRACICABA - SP

1992

R297e
18058/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICO_ESTA_TRABALHO

À minha esposa e filhos pelo incentivo,
carinho e razão do meu viver.

Aos meus pais, pelos ensinamentos,
incentivo, compreensão e apoio para
a superação dos obstáculos da vida.

Aos meus irmãos pelo valioso
estímulo e exemplo de vida.

Ao Professor Doutor Décio Teixeira, Titular
de Disciplina de Fisiologia e Biofísica e
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em
Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomato-
gátrico da FOP/UNICAMP, pela oportunidade
proporcionada na conclusão do Curso de
Fisiologia e Biofísica do Sistema Estoma-
togátrico e, sobretudo, pela dedicação, empe-
nho, carinho e amizade demonstrados durante
a orientação e execução deste árduo traba-
lho que, efetivamente, servirá para o meu
crescimento tanto intelectual quanto pro-
fissional.

O MEU MUITO OBRIGADO.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Doutor José Dias Sobrinho, Pró-Reitor de Pós-Graduação da UNICAMP, pelo apoio e dedicação aos cursos de Pós-Graduação;
- Ao Professor Doutor Renato Roberto Biral, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela obtenção e incentivo à pesquisa desta faculdade;
- Ao Professor Doutor Thales Rocha de Maltos Filho, Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo dinamismo e apoio aos alunos dos cursos de Pós-Graduação desta faculdade;
- Ao Professor Doutor João Leonel José, Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo carinho, amizade e grandiosa colaboração durante o curso.
- Ao Professor Doutor Alcides Guimarães, Professor Titular da Disciplina de Fisiologia e Biofísica da Faculdade de Odontologia de

Piracicaba, UNICAMP, pela amizade e ensinamentos transmitidos, que muito contribuíram para a consolidação deste trabalho.

- A Professora Doutora Maria Cecília Farias de Arruda Veiga, Assistente da Disciplina de Fisiologia e Biofísica do Departamento de Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelos ensinamentos, amizade e estímulo sempre presentes;
- Ao Professor Doutor Carlos Eduardo Pinheiro, Titular da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, pela colaboração na execução das técnicas usadas neste trabalho;
- Ao Professor Doutor Moustafa Mohamed El-Guindy, Titular da Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pelo incentivo para o desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Professor Doutor Roberto Simionato de Moraes, Professor Assistente Doutor do Departamento de Matemática e Estatística da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela programação e execução da análise estatística deste trabalho.
- Aos senhores Carlos Alberto Aparecido Feliciano e Paulo do Amaral

pela contribuição e apoio técnico.

- A senhora Shirley Rosana Shrivatti Moreto pela incansável atenção e prestívia colaboração nos serviços datilográficos deste trabalho;
- Aos senhores Pedro Duarte Novaes e Marcos Antonio Rapetti pelo auxílio na execução das fotografias e pela confecção dos gráficos;
- A todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a execução desta pesquisa.

CONTÉUDO

Capítulo	Página
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações Gerais sobre a Formação óssea	01
1.2. Metabolismo ósseo	03
1.3. Histofisiologia óssea	05
1.4. Considerações Gerais sobre a Papaina	07
1.5. Considerações Gerais sobre a Escina	09
1.6. Uso e Mecanismo de Ação da Alizarina "Red's"	10
1.7. Proposição	11
Capítulo II	
2. REVISTA DA LITERATURA	12
2.1. Atividades Biológicas da Papaina	12
2.2. Atividades Biológicas de Escina	18
Capítulo III	
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Técnica Utilizada	25

3.2. Tratamento Estatístico 29

Capítulo IV

4. RESULTADOS 30

Capítulo V

5. DISCUSSÃO 46

Capítulo VI

6. CONCLUSÕES 53

Capítulo VII

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

Capítulo VIII

8. RESUMO 65

CONTENTS

9. APÊNDICE 68

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I-INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FORMAÇÃO ÓSSEA (OSTEOGÊNESE)

Cerca de 15 a 20% do peso corporal é constituído pelo esqueleto ósseo, que, virtualmente, quase na sua totalidade, deriva da cartilagem.

Segundo WILLIAMS (1983), a transformação de cartilagem em osso é denominada formação óssea, ou osteogênese endocondral. Quando se analisa o osso, observa-se que 60 a 80% do peso seco é cristal inorgânico e 30 a 35% é material orgânico, representado pela matriz orgânica ou osteoide e 90 a 99% constituído de colágeno.

STRATES & NEUMAN (1968) estudando o mecanismo da calcificação óssea, observaram que durante o período embrionário, as células mesoblásticas, que se acumulam e passam a constituir o centro primitivo do futuro osso, começam a diferenciar-se e formar o esqueleto primordial. A seguir, pelo seu aspecto, conteúdo de glicogénio e glicosaminoglicans sulfatados (condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato) começam a ser reconhecidas como células cartilaginosas.

As células cartilaginosas, ao proliferar, dão forma ao futuro osso, cuja porção central será rodeada de um colar de osso formado pelas células pericondrais. Esse osso primitivo é a matriz cartilaginosa embebida de material mineral, sem ordenamento definido de microcristais de cálcio.

Quando se estuda o processo osteogênico no osso longo pode-se determinar que o colar ósseo inicial começa na diáfise do futuro osso, e os vasos sanguíneos começam logo a formação de cartilagem propriamente dita.

Segundo os mesmos pesquisadores, a remoção condrolítica iniciase na porção cartilaginosa, ao redor do esboço inicial, de modo que se insinua a formação da cavidade medular. Deste modo, o futuro osso será constituído por um tubo diafisário de osso propriamente dito, fechado em cada extremidade epifisária pelas cartilagens. A união de ambas as porções e a metáfise ou cartilagem epifisária remanescente, zona de intenso crescimento e proliferação, constituirá a zona de crescimento longitudinal do osso.

As grandes células cartilaginosas desta região ordenam-se em numerosas fileiras, que elaboram a matriz orgânica intercelular, onde se depositam os sais inorgânicos. Paralelamente ao processo condrolítico, e seguindo os vasos sanguíneos, os osteoblastos vão depositando a matriz óssea, ou osteóide, sobre a rede da matriz cartilaginosa previamente calcificada.

Para a formação do osso maduro é necessária a eliminação do osso primordial (cartilagem calcificada sem orientação osteônica). A destruição do osso primitivo realiza-se primeiramente pelas células de ação osteoclástica (osteoclastos ósseos e sanguíneos) e ocorre também na metáfise, ou cartilagem epifisária, de modo que se mantém somente uma pequena parte de estrutura original, permitindo-se o crescimento longitudinal (alongamento do osso) até o total desaparecimento da faixa metafisária (IRVING, 1973; RAISZ, 1977).

1.2. METABOLISMO_ÓSSEO

O tecido esquelético é constituído de matriz extracelular que contém componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). As células correspondem a uma pequena parte da massa óssea, mas são responsáveis: 1) pela função de regulação da destruição e do conteúdo do componente inorgânico e, portanto, pela manutenção dos níveis circulantes de cálcio (homeostase mineral); 2) pela contínua reabsorção e formação (remodulação) de matriz óssea, fazendo com que o osso responda às forças mecânicas geradas pela sustentação de pesos e atividade física, mantendo a homeostase esquelética (WILLIAMS, 1983).

A matriz extracelular é quase que exclusivamente (90%) composta por uma proteína, o colágeno, que participa de forma importante do processo de mineralização óssea. Os outros 10% compreendem as glicoproteínas, os mucopolissacarídeos ácidos e lipídios cujo papel na fisiologia óssea permanece, em grande parte, obscuro.

Segundo SLOVITK (1984) e FINKELMAN & BUTTLER (1985), a osteocalcina (proteína GLA) corresponde a 1-2% de toda proteína do osso. Esta proteína (peso molecular de 6 KDa) contém três resíduos de ácido gama-carboxiglutâmico (gla) resultantes de modificações pós-traducionais catalizadas por uma enzima dependente de vitamina K.

A osteocalcina liga-se fracamente ao cálcio, mas apresenta uma alta afinidade pela hidroxiapatita (1 mg de osteocalcina liga 17mg de hidroxiapatita). A osteocalcina é sintetizada pelos osteoblastos e também está presente no plasma em concentrações de 5mg/ml. A vitamina

é estimulada a secreção do osteocalcina "in vivo" e "in vitro", porém tem sido difícil estabelecer de que forma esta proteína participa do processo de mineralização óssea.

A osteonectina é uma glicoproteína de peso molecular 32 KDa, presente no tecido ósseo que está sendo mineralizado. Ela liga-se fracamente ao colágeno e apresenta uma alta afinidade pela hidroxiapatita, revelando participar de forma importante no processo da osteogênese.

O componente inorgânico da matriz óssea é composto fundamentalmente de cálcio e fosfato. Inicialmente, o cálcio e o fosfato são depositados como sais amorfos, para mais tarde serem rearranjados numa estrutura cristalina semelhante à hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Devido à grande superfície de troca iônica da microestrutura cristalina da matriz mineral, muitos outros íons, como sódio, potássio, magnésio e bicarbonato também podem ser encontrados em diferentes proporções.

1.3. HISTOFISIOLOGIA_ÓSSEA

Segundo MELLO AIRES (1991) o componente celular do tecido ósseo é constituído de três tipos distintos de células, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

Os osteoblastos, originados a partir da proliferação de células mesenquimais osteoprogenitoras, estão localizados na superfície da formação óssea, sendo responsáveis pela elaboração dos elementos orgânicos da matriz extracelular. Estas células caracterizam-se por apresentarem retículo endoplasmático e complexo de Golgi muito desenvolvidos, devido à biossíntese e à secreção de matriz orgânica. Cerca de 10 dias após ser secretada, a matriz orgânica assume sua estrutura tridimensional e forma o osteóide, dando início à mineralização. Durante esse intervalo de 10 dias, o colágeno é processado por peptidases, dando origem às ligações covalentes inter-moleculares, que vão assegurar a estrutura da fibrila de colágeno e facilitar a calcificação. Essa região, localizada entre o osso mineralizado e o osteóide em via de mineralização, é conhecida por "frente de mineralização óssea".

Os osteócitos são osteoblastos que, após mineralização do osteóide ao seu redor, tornaram-se prisioneiros em lacunas ósseas. Isto não significa, entretanto, que os osteócitos apresentem modificações acentuadas de suas propriedades funcionais ou estejam isolados dos osteoblastos; osteócitos jovens ainda guardam algumas das características ultra-estruturais osteoblásticas, permanecendo em contato com os osteoblastos através de uma vasta rede de extensões

celular, que alcança os osteoblastos através de canalículos ósseos. Na realidade, em vista da presença de numerosas mitocôndrias e vacúolos, acredita-se que os osteócitos participem ativamente da reabsorção óssea; uma elevação dos níveis do paratormônio, resulta em aumento do espaço perilacunar que encarcera o osteócito. Admite-se que esse processo, conhecido como osteólise osteocítica, seja responsável pela transferência tópica de cálcio da matriz óssea para o espaço extracelular (NELLO AIREB, 1991).

A mesma autora, cita ainda que os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, originadas a partir de um precursor monocítico circulante, derivado em última análise de uma célula hematopoética precursora, localizada na medula óssea. Os osteoclastos caracterizam-se pela alta mobilidade e também são encontradas na superfície óssea, em frente de reabsorção óssea; esse tipo celular move-se ao longo da superfície óssea reabsorvendo osso e deixando uma lacuna de reabsorção no seu rastro. O citoplasma contém abundantes mitocôndrias, vacúolos e vesículas envolvidas no processo de reabsorção. Em condições normais, os osteoclastos não reabsorvem osteóide desmineralizado. Não se conhece a sequência exata dos eventos envolvidos na reabsorção óssea; a matriz orgânica é reabsorvida antes que a matriz inorgânica ou vice-versa?

1.4. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A PAPAÍNA

A papaína é uma protease sulfidrídica, obtida do latex da *Carica papaya*, planta dicotiledônea, conhecida também pelo nome de mamão (CHOPRA, 1958). A papaína apresenta uma cadeia polipeptídica de 41 resíduos dobrada em duas partes nitidamente separadas com um sítio ativo localizado na área de separação DRENTH et al (1968).

No comércio, a papaína, é encontrada com o nome de TROMASIN® (Lab. Parke-Davis). As suas propriedades proteolíticas e mucolíticas são conhecidas principalmente pela sua capacidade de lisar tecidos necrosados e exsudatos purulentos resultantes de cirurgia e traumatismos.

O seu mecanismo de ação "in vivo" é o de ativar um constituinte fisiológico, o plasminogênio, transformando-o uma protease fisiológica, a plasmina, que dissolve o fibrinogênio e a fibrina. Pelo seu componente básico a papaína, de baixo peso molecular, tem uma ação de despolimerização da fibrina nos tecidos inflamados, resultando em aumento de permeabilidade e, conseqüentemente, em drenagem e remoção dos tecidos necrosados (MAGNES, 1966).

Segundo GLICK et alii (1974) a papaína apresenta-se nas formas de enzimas: ativa, inativa porém ativável e, enzima inativa não ativável.

Através de seus efeitos anti-flogísticos, nos edemas e processos inflamatórios (abscessos - flebites e tromboflebites - celulites - hematomas - contusões - úlceras arterioscleróticas -

entorse) e no controle do edema e reabsorção de hemorragia local, o
trypsin (uma equivalente a 20.000 unidades Warner - Chilcott de
atividade enzimática 5,0mg) tem sido longamente usado na
terapia, sem entretanto, conhecer-se adequadamente todos os seus
efeitos colaterais.

1.5. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A ESCINA

A Escina é uma saponina (glicosídeo de ação dissolvente) existente nas sementes da castanha da Índia, "Aesculus Hippocastanum" sendo uma mistura de glicosídeos e rabinosídeos (WAGNER, 1967).

No comércio, a Escina é encontrada com o nome de Reparil (Escinato de Sódio) que corresponde a 5 mg de escina, em ampola ou comprimido de 20 mg.

O seu mecanismo de ação é normalizar a permeabilidade capilar, o que permite inibir a transudação capilar, evitando assim a formação de processos exsudativos, sendo, dessa maneira, potente anti-edematoso, detumescente e anti-inflamatório, que tem sido indicado nas profilaxias e tratamento dos edemas traumáticos e cirurgias bucomaxilofacial e otorrinolaringologia (MAGLIULO et alii, 1968).

Observa-se também, a sua indicação para os casos de flebopatias, síndromes dolorosas vertebrais, cervicais ou cervicolumbares e cefaléias pós-comocionais.

A absorção de escina pelo trato gastrointestinal é pequena e muito pouco metabolizado, sendo excretada pela biliar em 2/3 e pela urina em 1/3 (LANG & MENNICKE, 1972).

1.6. USO E MECANISMO DE AÇÃO DA ALIZARINA 'RED'S'

Os corantes vitais têm sido muito utilizados nos estudos de velocidade de mineralização de ossos longos e incisivos de ratos (KATZNER & SCHOUR, 1951; HARRIS, et alii, 1964; PINHEIRO, 1966 e TEIXEIRA, et alii, 1977).

A velocidade de deposição dos sais minerais no osso serve como índice de crescimento do mesmo e compreende uma atividade metabólica das células ósseas.

ROBIOUET & COLIN (1926), foram os primeiros investigadores a identificarem a Alizarina como principal corante de tintura de garança utilizada como corante vital. A sua principal propriedade é a de fixar-se nos ossos e dentes, possivelmente pela sua ligação aos íons minerais.

SCHOUR et alii (1941) e ERICKSON & OGILVIE (1958) estudando o crescimento do crânio, mandíbula e dentes de cobaias através do uso da Alizarina Red's concluíram que a mesma cora especificamente a matriz orgânica em via de calcificar-se, sendo que o cálcio na forma iônica não é, necessariamente, essencial à fixação deste corante.

A Alizarina Red's apresenta propriedades que a selecionam como indicador do crescimento ósseo, tais como: é de fácil aplicação e bem tolerada pelo organismo, principalmente na concentração usada, e produz faixas coloridas bem visíveis e de contornos nítidos. A técnica de inclusão é de fácil preparo (JARABAK & VEHE, LE ROY (1951); CRAVEN (1956); ERICKSON & OGILVIE (1958); LINN (1959); HOYTE (1960); KRAHL (1961); JOHANESSEN (1961); DIXON & HOYTE (1963)).

1.7. PROPOSTA

A alta aplicabilidade e o uso dos anti-inflamatórios de origem vegetal, principalmente nos casos de traumatismos, cirurgias buco-maxilo-facial, flebopatias, síndromes dolorosas vertebrais, cervicais ou cervicolumbares e também como potentes antiflogísticos e antiedematosos em pacientes de qualquer idade, sem entretanto, saber-se os eventuais efeitos iatrogenicos sobre o crescimento e desenvolvimento têm sido o motivo de preocupação de diversos pesquisadores.

Não obstante a existência de inúmeras pesquisas correlacionadas ao assunto, nenhuma delas quantificou a velocidade de mineralização da matriz orgânica do osso.

Desse modo, propõe-se:

a) Com o emprego do corante vital Alizarina Red's, analisar-se os efeitos da Papaina ativa (TROMASIN (R)) em doses terapêuticas e doses 5 vezes maior, sobre a velocidade de mineralização da matriz orgânica do osso fêmur em ratos em fase de crescimento.

b) Com o uso da Alizarina Red's, verificar-se o efeito da Escina (Reparil) tanto em dose terapêutica quanto em dose 5 vezes maior, sobre a velocidade de mineralização da matriz orgânica do osso fêmur de ratos em fase de crescimento.

Capítulo II

REVISTA DA LITERATURA

2. REVISIA DA LITERATURA

2.1. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PAPAÍNA

Diversos pesquisadores têm procurado relacionar os efeitos dos antiinflamatórios (esteróides) e os processos de desenvolvimento e crescimento, sugerindo que o uso prolongado dos glicocorticóides, induzem a uma menor taxa no processo de mineralização (DOMM & LEROY, 1951; GLICKMAN, STONE & CHAWLA, 1953; MOSS, 1955; FORHAN, 1962; TEIXEIRA et alii, 1977).

Por outro lado, os antiinflamatórios enzimáticos, produto de origem vegetal, também têm sido largamente usados, principalmente a papaína e a escina, sem entretanto, conhecer-se adequadamente todos os seus efeitos colaterais, embora alguns pesquisadores tenham demonstrado algumas alterações biológicas provenientes do uso indiscriminado dessas drogas.

Ita (1956) verificou que a papaína em estado natural, quando administrada via intravenosa em coelhos, causava falência auditiva, enquanto que a papaína cristalina perde esta propriedade, com os animais lesionados retornando à normalidade 3 a 4 dias depois.

Do mesmo modo, SPICER & BRYANT (1957) observaram que injeções endovenosas de papaína bruta induziam, após 2 horas de sua administração, mudanças na cartilagem do ouvido de coelhos, com aumento de metacromasia e edema do septo interlacunar e cranacção de condrócitos com destruição dos poros elásticos. Modificações

posteriores, ocorrem após 4 horas da administração da papaina, notadamente pela completa da metacromasia da matriz, aumento da acidofilia e retenção da reação PAS, bem como o retorno normal do septo interlacunar, fibrólos elásticos e dos condrocitos.

Estudos com ratos nos quais a digestão gástrica da proteína foi seguida por exame do estômago foram realizados por AARON et alii (1957). Observaram ainda, que na presença de antiácidos, não há modificação do efeito da papaina na digestão, e que a mesma ingerida oralmente apresenta atividade digestiva "in vivo", não havendo nenhuma evidência de que os conteúdos gástricos afetam a atividade digestiva da enzima.

TSALTAS (1958) encontrou uma acentuada diminuição de condromuco protéico (MCS) e uma redução do conteúdo do sulfato radioativo (³⁵S) da matriz da cartilagem do ouvido de coelho. Essas observações indicam que o colapso dos ouvidos de coelhos, após a injeção endovenosa de papaina, deve-se à perda de condromuco protéicos da cartilagem e pela redução de sulfato de condroitina no condromuco protéicos que permanece.

Injeções endovenosas de papaina crua em coelhos jovens são seguidas do surgimento, no sangue e na urina de um mucopolissacarídeo, semelhante em propriedades químicas e físicas aos sulfatos de condroitina (BRYANT, LEDER & STETTE, 1958).

SPIDER & BYANT (1959) detectaram alterações histológicas nos rins e fígados de ratos após a administração de papaina e observaram diversas hemorragias tubulares renais, depleção de glicogênio e basofilia no fígado.

Outros estudos têm demonstrado que a papaina, quando

administrado em coelhos numa concentração de 10 a 20 mg/kg de peso corporal diariamente, promovia o fechamento prematuro das placas epifisárias com evidente diminuição do crescimento, principalmente do fêmur, falanges e de vertebras, com significantes alterações histológicas e radiológicas das linhas epifisárias (HULT, 1958 a e b).

Ainda com relação aos efeitos da papaína no processo da formação óssea, Mc CLUSKEY & THOMAS (1958) identificaram a papaína cristalina como a responsável pela remoção da matriz cartilaginosa "in vivo".

HULT (1958), administrando papaína (10 a 20 mg/kg) em coelhos jovens verificou um fechamento precoce das placas epifisárias, com diminuição ou parada do crescimento. Observou também o desaparecimento das fileiras de células cartilaginosas das placas epifisárias dos animais que receberam papaína.

Ainda na mesma linha de pesquisa HULT & WESTERBORN (1959) observaram que a papaína bruta causa alterações rápidas nas cartilagens epifisárias de coelhos, camundongos, ratos, cobaias e gatos. Repetidas injeções de papaína bruta causam danos permanentes às cartilagens epifisárias, semelhante ao fechamento ósseo o que leva, conseqüentemente, a um retardo do crescimento longitudinal permanente, com severa deformidade óssea, quando comparados com os animais controle. Verificaram também que a papaína cristalina inativa pode produzir modificações na cartilagem idênticas àsquelas causadas pela injeção de papaína bruta.

Os mesmos autores, também em 1959, estudando a produção experimental do nanismo em coelhos, concluíram que injeções subcutâneas diárias de solução de papaína, durante duas semanas,

provocam o nanismo, incluindo o fechamento das zonas de crescimento epifisárias e a ossificação das extremidades das vértebras. O efeito pode ser comparado com o nanismo condroplástico humano. Os distúrbios causados pela papaína são ainda desconhecidos, mas é sabido que a papaína, como uma enzima proteolítica, produz a liberação do condroitin sulfato das cartilagens, provavelmente pela destruição das ligações destas substâncias às proteínas.

ENGFELDT, HULT & WESTERBORN (1959) estudando o efeito da papaína nos ossos rádio, metacarpo, epífises costal, tíbia e fêmures de cães, os quais receberam 10 mg/kg de peso corporal e sacrificados em intervalos de 12, 24 e 48 horas, e 7 dias após a injeção de papaína, concluíram que, efetivamente, a papaína promove um estreitamento das cartilagens epifisárias, com necrose e epifisiálise, na região limite entre epífise e metáfise com evidente ruptura das fibras colágenas. Todas as alterações mencionadas apareceram no intervalo entre 3 a 4 horas e 7 dias após uma única injeção de papaína bruta.

Uma suspensão de papaína crua quando injetada intraperitonealmente em ratos de 20 a 69 dias de idade, produz má formação do esterno, gradil costal, coluna vertebral e costelas, desorganização cartilaginosa permanente e fechamento das placas epifisárias, resultando em encurtamento dos ossos longos e corpo vertebral. Rigidez da coluna vertebral foi produzida pela degeneração do núcleo pulposo, caracterizado pela participação de fragmentos necróticos eosinofílicos e substituição final da fibrocartilagem hialina (MERKOW & LALICH, 1961).

EMELE, SHANAMAN & WINBURY, (1966) analisaram as atividades

analgésica e anti-inflamatória da papaína e concluíram que a potência da mesma não era significativamente diferente do ácido acetil salicílico.

A papaína, quando inalada mesmo em pequena dose, causou enfisema pulmonar em hamsters, coelhos e cães (SNIDER et alii, 1974).

KVINNSLAND (1974) observou que a papaína quando injetada em ratos, coelhos, gatos e cães em doses sucessivas, promovia redução do crescimento crânio-facial e fechamento precoce nas zonas de crescimento epifisial.

Já MILNE & BRAND (1975) verificaram que a papaína, quando inalada, além de enfisemas pulmonares, induzia também a liberação de histamina e conseqüentemente reações asmáticas agudas.

Em 1976, CACI estudou a ação anti-edematosa da papaína comparada com a prednisolona e observou que havia similitude entre ambos, porém 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 ARAUZ (1982) realizando estudos comparativos dos anti-inflamatórios de origem vegetal (Bromelina, Escina e Papaína) em cirurgias provocadas em ratos concluiu que a bromelina e a escina mostraram-se mais eficazes que a papaína na recuperação dos animais, não observando nenhuma alteração que indicasse retardamento na regeneração óssea, e sim, uma aceleração do processo de cura.

Analisando os efeitos de anti-inflamatórios enzimáticos (Bromelina, Escina e Papaína) no desenvolvimento cranio-facial de ratos foi observado que a Bromelina e Escina promoviam uma redução no comprimento total do crânio, o mesmo acontecendo com os filhotes em

que somente as mães receberam papaína durante a prenhez (BUSATO, 1989).

SILVA et alii (1989) estudando os efeitos de bromelina, escina e papaína no desenvolvimento de crânios e fêmures de ratas verificaram que as três drogas promoviam significativa redução nos ossos.

TEIXEIRA, et alii (1990) administrando a papaína (Promasin) numa concentração de 0,25 mg/kg de peso corporal em ratas e analisando os seus eventuais efeitos da velocidade da mineralização das faces labiais, linguais, mesiais e laterais dos incisivos superiores e inferiores de ratos, observaram que a ação da papaína nos primeiros 15 dias foi a de inibir o crescimento em todas as faces estudadas, tanto dos dentes superiores quanto dos inferiores. Entretanto, os resultados da aplicação da papaína por mais 10 dias revelaram um efeito completamente oposto, havendo um significativo e considerável crescimento em todas as faces analisados e em ambos os incisivos.

Por outro lado, os mesmos autores, também em 1990, realizando um estudo comparativo dos efeitos da Bromelina, Escina e Papaína sobre a velocidade de mineralização da dentina dos incisivos superiores e inferiores de ratos, concluíram que a bromelina tem a capacidade de diminuir o crescimento nos dois períodos estudados, ou seja, tanto nos 15 primeiros dias de administração quanto nos 10 últimos dias. A escina mostrou um efeito oposto da papaína, estimulando significativamente o crescimento no primeiro período e inibindo no 2º.

2.2. ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESCINA

Não obstante o uso medicinal da castanha da Índia ter sido descrito por VEVEY em 1909, só recentemente, é que foram desenvolvidos estudos mais aprofundados sobre as suas atividades biológicas.

Desse modo, EVERSMAN (1960) analisando 140 pacientes com edemas na região buco-maxilo-facial e administrando a Escina (Reparil) na concentração de 10 a 20 mg/dia num período entre 4 e 5 dias, notou a diminuição dos mesmos, registrando como efeitos colaterais apenas um caso de reação alérgica e outro com forte sensação de vômito.

GIRERD et alii (1961) provocando edema nas patas de ratos e administrando escina endovenosamente, observou uma marcada inibição do edema agudo, sendo que o seu efeito máximo foi atingido no pico de 16 horas após a administração. Com o aumento das dosagens, começaram a aparecer sintomas de toxicidade, desidratação, danos renais, necrose cortical e morte dos animais.

SIERING (1962) observou alterações estruturais em células do carcinoma ascítico de ratos (tumor de Ehrlich) sob a ação da Escina. Primeiramente, verificou uma hipotrofia celular, com perda de potássio e, numa segunda fase, uma hipertrofia, em decorrência de entrada de sódio. Nesse sentido, constatou um desequilíbrio eletrolítico (potássio/sódio), com quociente favorável ao potássio. Não foi encontrada nenhuma citólise, ficando as células tumorais em estado prolífico. Essas alterações nos transportes de íons, parecem ser uma característica das saponinas que se concentram em volta das células e reduzem a tensão superficial das mesmas.

A administração da Escina em concentrações de até 30 mg/dia mostrou-se de boa tolerância, sem nenhuma manifestação alérgica (LUCAS, 1963).

Com relação ao mecanismo de ação da Escina observou-se: 1. A Escina altera a permeabilidade celular, resultando num influxo reduzido em meio hipotônico ou numa eliminação mais rápida do fluido, havendo transferência para o meio isotônico; 2. A Escina causa excreção de fluido edematoso, e 3. A Escina age como substância anti-exsudativa, principalmente antagonizando substâncias flogísticas, opostas da histamina e serotonina (VOGEL, MAREK & STOECKERT, 1963).

VOGEL & MAREK (1963) através de estudos comparativos de diferentes saponinas (saponina do *Aesculus hippocastanum*, saponina de *Agrostema Githago*, *Gypsophila paniculata*, *Cyclamen europaeum*, *Hedera Helix* e *Digitomina*) concluíram que somente a saponina *Aesculus hippocastanum* (Escina) revelava efeitos anti-exsudativos. Esses foram evidentes tanto quando a escina foi administrada profilaticamente, ou seja 16 horas antes de se provocar o edema, quanto no tratamento do edema já formado. Notou-se o efeito pela rápida remoção do fluido edematoso, mostrando um sinal de atividade antiflogística. Fato não ocorrido com as outras saponinas estudadas. Os efeitos diuréticos e natriuréticos da escina foram observados tanto em ratos normais quanto nos hipofisectomizados.

Os mesmos pesquisadores verificaram também, que a Escina é transportada no organismo ligada à proteínas plasmáticas e que, na ausência destas, ela liga-se ao colesterol, sendo que as outras saponinas são transportadas através da ligação, exclusivamente, com a albumina.

ATCHINGER, GISS & VOGEL (1944) estudando o efeito da Escina e do glicosídeo flavone (de frutas cítricas) concluíram que a escina inibia a excreção de água pelos capilares e a seguir, impedia a penetração de micromoléculas na parede capilar.

NAGLIULO et alii (1968) analisando os efeitos antiflogísticos da escina, "in vivo" e "in vitro" através de cultura de eritroblastos, observaram que a mesma induzia uma diminuição da celularidade do exsudato, notadamente, com relação ao número de macrófagos, não havendo alterações na velocidade de locomoção e índice fagocitário das células inflamatórias. Com relação aos eritroblastos "in vivo", detectaram que a Escina não apresentou efeitos maléficos sobre a medula óssea.

Com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação da Escina, VOGEL, MAREK & DETNER (1970) utilizaram-se de vários tipos de inflamação: edemas de pata de rato seguidos de aplicação local de ovoalbumina, dextrano, hialuronidase bradicinina, serotonina, histamina, aerosil caoli, formalina. Um efeito inibitório foi induzido por ovoalbumina, dextrano e bradicinina. Nos outros tipos, o efeito não foi tão eficaz e apareceu posteriormente. A Escina se manifestou ineficaz em processos de reparação tecidual. Os autores deduziram que a mesma tem efeito sobre a redução do número e/ou diâmetro dos poros capilares. Verificaram ainda que a Escina, em altas doses, provoca a morte, devido à maciça hemólise e, em baixas doses, porém por longos períodos conduz a uma toxicidade crônica e também à morte dos animais.

A Escina, em altas concentrações, provocou em bovinos e humanos, uma contração lenta e irreversível de veias (LOCKS, 1974).

HEFTI & KAPPELER (1975) estudando a eficácia da Escina em

pacientes que haviam sofrido fraturas e em outros que tiveram remoção de meniscos de joelhos, comprovaram a eficiência profilática, terapêutica e anti-térmica da droga.

Administrando-se 40 mg de Escina, a 16 pacientes com neoplasias supratentoriais e hipertensão arterial e intracranial, foi observado uma significativa redução em ambas as pressões, iniciando-se 3 a 4 minutos após a aplicação endovenosa (NINGRINO & SCANARINI, 1978).

GOLDENBERG (1979) utilizando a Escina no tratamento preventivo dos edemas provenientes de exodontias de dentes inclusos e em cirurgias buco-maxilo-faciais (afundamento de malar, luxações da articulação temporo-mandibular, prognatismo e micrognatismo) observou que tanto na forma líquida quanto em drágeas, as suas propriedades antiedematosa, antiflogística e fibrinolítica eram efetivas e sem efeitos teratogênicos. Após infusão de 12,5 a 50,0 mg/kg/minuto de prostaglandina (PGE-1) na artéria femoral de coelhos, ocorrem aumento do fluxo de linfa da ordem de 13 a 81%. Doses endovenosas de Escina (0,25 a 0,00 mg/kg) ou de indometacina (2,5 a 20,0 mg/kg) reduziram esse fluxo linfático aumentado, em 45 a 92% e em 19 a 68% respectivamente.

ROTHKOPISCHE BECK & VOGEL (1980), verificaram que a dose efetiva da Escina é de 0,29 mg/kg e da indometacina de 3,4 mg/kg. Os resultados comprovaram que ambas as drogas tiveram efeitos antagônicos sobre o aumento da permeabilidade da barreira plasma-linfa, induzida pela prostaglandina.

SINCLAIR ARAUZ (1982) promovendo estudos radiográficos de mandíbulas fraturadas na região incisal de ratos e a administração em

grupos específicos de bromelina, escina e papaína, concluiu que os 3 antiinflamatórios de origem vegetal aceleram o processo do reparo, sendo que a bromelina e a escina mostraram ser mais eficazes.

A bromelina, escina e papaína, quando administradas em doses terapêuticas em ratos, no período compreendido desde o nascimento até a maturidade óssea, causaram redução no comprimento e deformação das colunas vertebrais (SILVA et alii, 1985).

No mesmo sentido, BUSATO (1985) analisando também os efeitos da bromelina, escina e papaína sobre o crescimento total, largura e comprimento da face de filhotes em cujas mães foram administrados os 3 antiinflamatórios durante toda a prenhez, concluíram que houve redução no crescimento em relação ao grupo controle normal.

SILVA et alii (1989) confirmaram que a escina, bromelina e papaína têm a capacidade de reduzir o crescimento dos fêmures e crânios de ratos.

TEIXEIRA et alii (1990) estudando o efeito da escina na velocidade de mineralização dos incisivos superiores e inferiores de ratos, com emprego de alizarina Red's, detectaram que a administração da escina durante 15 dias (1º período) promovia um maior crescimento em ambos os incisivos. Todavia, com as subsequentes administrações da escina por mais 10 dias (2º período), a droga apresentava um efeito oposto, apresentando um menor crescimento quando comparado com o 1º período e com o grupo controle do mesmo período.

Capítulo III

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinos, 4 star), com 40 dias de idade, pesando em média entre 110 e 130 gramas no início da experimentação.

Os animais foram alimentados antes e durante o período experimental com ração balanceada* e água "ad libitum" e distribuídos, casualmente, em 5 grupos, da seguinte forma:

GRUPO I - CONTROLE NORMAL - Constituído por 10 ratos que receberam doses diárias de solução fisiológica, via intraperitoneal (IP) num volume de 0,5 ml, e duas doses de Alizarina Red's**, na concentração de 100 mg/kg de peso corporal num volume de 0,5 ml, aos 40 e 52 dias de idade respectivamente. Os animais foram sacrificados aos 55 dias de idade.

GRUPO II - PAPAÍNA - Composto por 10 ratos que, à semelhança do grupo anterior, receberam Alizarina Red's na concentração de 100 mg/kg de peso corporal, no volume de 0,5 ml, aos 40 e 52 dias e Papaína, ** (Tromasin(R)) via I.P., na concentração de 0,25 mg/kg de peso (dose terapêutica), com volume máximo de 0,5 ml, durante os 12 dias correspondentes ao período experimental. Os animais foram também sacrificados aos 55 dias de idade.

*Ração balanceada Ceres, Piracicaba.

**Tromasin - Papaína - equivalente a 20.000 unidades WarnerChilcott de atividade enzimática - Lab. Parke - Davis - SP

GRUPO III - PAPAÍNA (dose 5 vezes) - Composto de 10 ratos, os quais receberam Papaína (Tromasín®) na concentração de 1,25 mg/kg de peso corporal, um volume máximo de 0,5 ml, durante os 12 dias do período experimental, aos 40 e aos 52 dias de idade, Alizarina Red's na mesma concentração, volume e via, dos grupos anteriores e sacrificados aos 55 dias de idade.

GRUPO IV - ESCINA - Constituído de 10 ratos que receberam escina (*Reparil®) na concentração de 1,71 mg/kg de peso corporal (dose terapêutica) num volume máximo de 0,5 ml (via I.P.), durante os 12 dias do período experimental e Alizarina Red's 100 mg/kg de peso, num volume de 0,5 ml, aos 40 e 52 dias e sacrificados também aos 55 dias de idade.

GRUPO V - ESCINA (dose 5 vezes) - Formado por 10 ratos, os quais receberam a semelhança do Grupo IV as mesmas doses, concentrações e volumes de Alizarina Red's aos 40 e 52 dias de idade e escina (*Reparil) na concentração de 8,55 mg/kg de peso, num volume de 0,5 ml, via I.P., durante os 12 dias do período experimental e sacrificados com a mesma idade dos grupos anteriores.

Durante o período experimental, os animais foram pesados diariamente, e a avaliação do ganho de peso foi feita pela diferença entre as médias dos pesos inicial e final, isto é, entre 40 e 55 dias de idade.

*Reparil - Escinato de Sódio (correspondente a 5 mg de escina)

Instituto Lorenzini S/A - produtos Terapêuticos Biológicos - SP

3. 3.1. TÉCNICA UTILIZADA

Os ratos foram sacrificados por decapitação, sendo os fêmures imediatamente retirados, e limpos de todas as aderências. Com auxílio de discos de aço, foram separadas as epífises. Das diáfises resultantes, cortouse novamente uma fatia óssea de 2 a 3 mm de espessura, na extremidade diafisária correspondente à epífise proximal do fêmur.

Os ossos foram limpos dos resíduos medulares, lavados, secos e colocados em Bouin a 10% durante 24 horas, e em seguida, incluídos em metil metacrilato, segundo a técnica de YAEGER (1959).

Após a inclusão, com auxílio de lixa d'água, as peças foram desgastadas até atingirem a espessura de 500 micrometros, o que permite a visualização das faixas coradas pela Alizarina.

O polimento final das peças foi feito com óxido de estanho, sendo em seguida, montadas entre lâmina e lamínula.

A mensuração entre as distâncias das duas faixas foi feita para todos os ossos no polo medial, anterior e posterior, com auxílio da ocular micrométrica LEITZ e objetiva 10/0,22 (Figura 1).

Por valores obtidos das distâncias entre as faixas foi aplicada a fórmula: $\text{valor} \times 0,004$, conforme indicação do manual de

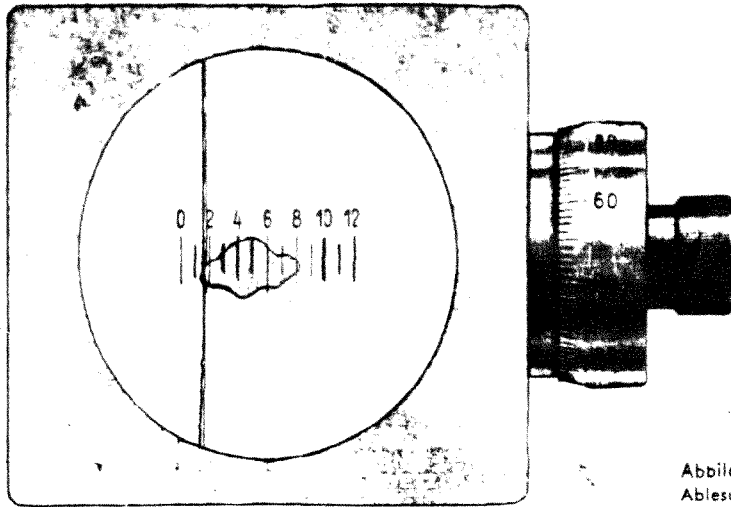
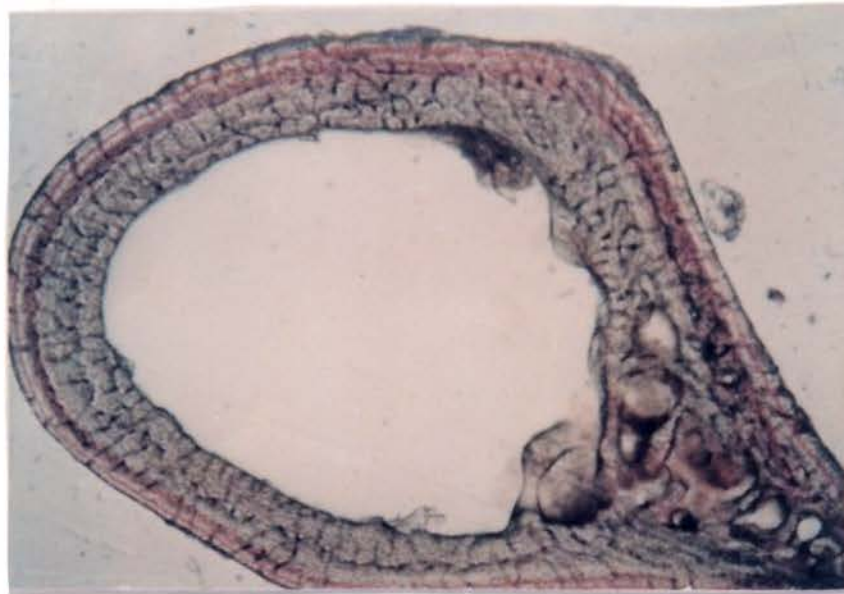


Abbildung 2
Ablesung 167

FIGURA I - Ocular Micrométrica de LEITZ

colo anterior

colo
medial



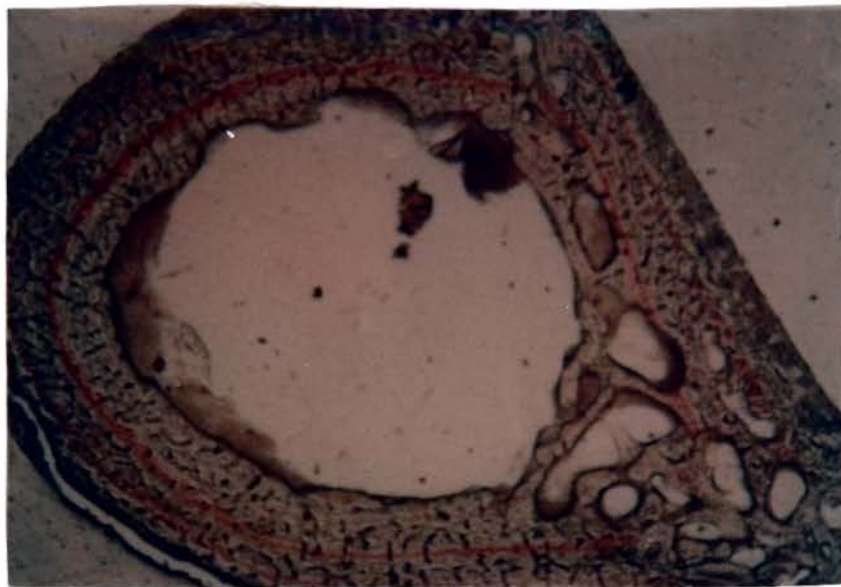
colo
lateral

colo posterior

FIGURA 111 Corte transversal e vista microscópica do fêmur de ratos do grupo controle.

colo anterior

colo
medial



colo
lateral

colo posterior

FIGURA_III: Corte transversal e vista microscópica do fêmur de ratos do grupo Papaina dose 5 vezes.

Essas medidas indicam a deposição de sais minerais no período considerado (12 dias) e, portanto, a velocidade de calcificação.

3.2. TRATAMENTO ESTADÍSTICO

Para as análises estatísticas foram usados os esquemas de análise de variância de ensaios inteiramente casualizados, ou seja:

Q. VARIACÃO	GL
Tratamentos	1 nº de tratamento - 1
Resíduo	1 Diferença (GL total - GL tratamento)
<hr/>	
TOTAL	1 (nº de trat. x nº de Rep.) - 1

Para as comparações das médias (duas a duas) foi usado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, determinando-se as diferenças mínimas significativas através de $\Delta = q \frac{s}{\sqrt{r}}$ onde:

Δ = diferença mínima significativa;

q = valor da amplitude total estudentizada;

s = estimativa do desvio padrão residual;

r = número de repetições.

Capítulo IV

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os valores individuais e médios mensurados entre as distâncias das faixas marcadas pela Alizarina Red's na matriz orgânica dos colos medial, anterior e posterior dos fêmores dos animais do Grupo I (Contrôle Normais) podem ser observados na Tabela I e Foto 1 do apêndice. Nota-se que a média apresentada para o colo medial foi de 0,103 u e para os colos anterior e posterior foi de 0,102 u.

Por outro lado, os animais do Grupo II, os quais receberam Papaina na dose terapêutica revelaram valores médios de 0,075 u para o colo medial e 0,073 e 0,072 u respectivamente para os colos anterior e posterior (Tabela II e Foto 2 do apêndice).

Os animais componentes do Grupo III, os quais receberam doses de Papaina 5 vezes maior que a dose terapêutica revelaram valores médios de 0,149 ; 0,150 e 0,147 u para os colos anterior e posterior respectivamente (Tabela III e Foto 3 do apêndice).

A análise da Tabela IV, que representa os valores individuais e médios obtidos dos animais do Grupo IV, os quais receberam Escina na dose terapêutica, mostra para os colos medial um crescimento médio de 0,070 u, e para o colo anterior 0,070 u e para o posterior 0,070 u.

As médias dos valores encontrados nos animais do Grupo V, os quais receberam Escina na dose 5 vezes maior que a dose terapêutica podem ser observados na Tabela V. Verifica-se que, efetivamente, os animais apresentaram, para o período experimental estudado, um menor crescimento, revelando para o colo medial 0,040 u, para o colo

anterior 0,033 u e para o colo posterior também um valor médio de 0,033 u (Foto 4 do apêndice).

Com os dados apresentados (Tab. I, II, III e IV), foi realizada a análise de variância, com posteriores comparações múltiplas de médias pelo teste de Tukey.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições.

O esquema de análise de variância utilizado foi:

CAUSAS DA VARIAÇÃO		G.L.
tratamentos	1	4
resíduo	1	45
<hr/>		
TOTAL		49

Os resultados dos testes de tratamento, bem como os coeficientes de variação de ensaios foram:

POSICÕES		TESTE		COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (C.V.)
Medial	1	072.4**	1	4.86%
Anterior	1	1189.8**	1	4.62%
Posterior	1	860.1**	1	5.40%
<hr/>				

**Significativa a nível de 1% de probabilidade.

TABELA - I
GRUPO - SORO FISIOLÓGICO (CONTROLE)

RATOS	COLO	MEDIAL	ANTERIOR	POSTERIOR
1		0,104	0,105	0,104
2		0,107	0,108	0,108
3		0,105	0,105	0,105
4		0,101	0,100	0,100
5		0,102	0,100	0,102
6		0,106	0,102	0,102
7		0,103	0,103	0,103
8		0,104	0,100	0,101
9		0,100	0,101	0,100
10		0,102	0,103	0,101
	MÉDIA	0,103	0,102	0,102

VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIAS DAS DISTÂNCIAS EM (Mμ),
ENTRE AS FAIXAS DE ALIZARINA RED'S DOS COLOS MEDIAL,
ANTERIOR E POSTERIOR DO GRUPO I.

TABELA II
GRUPO - PAPAINA DOSE TERAPEUTICA

RATOS	COLO MEDI AL	ANTERI OR	POSTERI OR
1	0,080	0,080	0,080
2	0,080	0,074	0,066
3	0,070	0,074	0,068
4	0,083	0,080	0,081
5	0,072	0,068	0,068
6	0,067	0,062	0,062
7	0,080	0,075	0,078
8	0,067	0,067	0,067
9	0,078	0,072	0,072
10	0,080	0,080	0,080
MÉDIA	0,075	0,073	0,072

VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIAS DAS DISTANCIAS EM (M μ),
ENTRE AS FAIXAS DE ALIZARINA RED'S DOS COLOS MEDIAL,
ANTERIOR E POSTERIOR DO GRUPO II.

TABELA - III
GRUPO - PAPAINA DOSE 5x MAIOR

RATOS	COLO	MEDIAL	ANTERIOR	POSTERIOR
1		0,156	0,153	0,153
2		0,156	0,148	0,144
3		0,156	0,156	0,153
4		0,152	0,153	0,152
5		0,140	0,148	0,140
6		0,144	0,144	0,148
7		0,152	0,152	0,152
8		0,142	0,143	0,142
9		0,152	0,152	0,152
10		0,144	0,148	0,140
MEDIA		0,149	0,150	0,147

VALORES INDIVIDUAIS E MEDIAS DAS DISTANCIAS EM (M μ),
ENTRE AS FAIXAS DE ALIZARINA RED'S DOS COLOS MEDIAL,
ANTERIOR E POSTERIOR DO GRUPO III.

TABELA IV
GRUPO - ESCINA TERAPEUTICA

RATOS	COLO	MEDIAL	ANTERIOR	POSTERIOR
1		0,080	0,070	0,072
2		0,080	0,072	0,072
3		0,080	0,072	0,074
4		0,080	0,073	0,073
5		0,077	0,068	0,066
6		0,080	0,074	0,074
7		0,080	0,066	0,066
8		0,072	0,068	0,068
9		0,072	0,072	0,066
10		0,080	0,074	0,076
MÉDIA		0,078	0,070	0,070

VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIAS DAS DISTANCIAS EM (Mμ),
ENTRE AS FAIXAS DE ALIZARINA RED'S DOS COLOS MEDIAL,
ANTERIOR E POSTERIOR DO GRUPO IV.

TABELA - V
GRUPO - ESCINA DOSE 5x MAIOR

RATOS	COLO	MEDIAL	ANTERIOR	POSTERIOR
1		0,040	0,033	0,034
2		0,040	0,033	0,034
3		0,040	0,034	0,034
4		0,036	0,030	0,034
5		0,042	0,034	0,034
6		0,040	0,033	0,028
7		0,040	0,030	0,030
8		0,040	0,035	0,034
9		0,040	0,034	0,034
10		0,040	0,034	0,036
MÉDIA		0,040	0,033	0,033

VALORES INDIVIDUAIS E MÉDIAS DAS DISTANCIAS EM (M μ),
ENTRE AS FAIXAS DE ALIZARINA RED'S DOS COLOS MEDIAL,
ANTERIOR E POSTERIOR DO GRUPO V.

Como se observa, os valores do teste foram significativos a nível de 1% de probabilidade, mostrando que há 99% de probabilidade de não haver diferenças entre os tratamentos.

Para detectar as diferenças, foi feito o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Desse modo, nota-se que em todos os tratamentos aplicados, quando comparados com o grupo controle, houve diferenças significativas, tanto em nível de 5% quanto em nível de 1% de probabilidade.

Quando aplicou-se o teste de Tukey para comparação de médias de um a duas, verificou-se que, exceção feita à Papaina na dose terapêutica e à Escina também na dose terapêutica, que embora tenham diminuído significativamente o crescimento quando comparados com o grupo controle, não mostraram diferenças entre si tanto ao nível de 5% quanto ao nível de 1% de probabilidades (Tabela VI).

Observa-se ainda que a Papaina, na concentração 5 vezes maior do que a dose terapêutica, apresentou como resultado um crescimento aproximadamente 50% maior que o controle, e que a Escina, na mesma concentração, apresentou resultado inverso.

TABELA VI - Teste de Tukey para médias do colo medular.

TRATAMENTOS	Nº DE RATOS	MÉDIAS	NÍVEL 5%	NÍVEL 1%
Controle	10	0,103	b	B
Papaína T	10	0,076	c	C
Papaína 5x	10	0,147	a	A
Escina T	10	0,078	c	C
Escina 5x	10	0,040	d	D
Diferença Mínima Significativa			0,00552	0,00473

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

- Papaína T (Papaína Terapêutica), Papaína 5x (Papaína dose 5 vezes maior); Escina T (Escina Terapêutica), Escina 5x (Escina dose 5 vezes maior).

A análise (a Tabela VII) demonstrou que em todos os tratamentos aplicados, a semelhança do resultado do colo medial, quando comparado com o grupo controle apresentou diferenças significativas em nível de 1% de probabilidade.

A mesma análise mostrou que os efeitos da Papsina e da Escina nas doses terapêuticas são de diminuição de crescimento em relação ao grupo controle.

Por outro lado, a Papsina na concentração 5 vezes maior mostrou um efeito altamente estimulante do crescimento, resultando em considerável aumento (aproximadamente 50%) também quando comparado ao grupo controle.

Há o efeito da Escina na concentração 5 vezes maior que a terapêutica mostrou um efeito inibidor no crescimento, de aproximadamente 70% em relação ao crescimento dos animais do grupo controle.

A mesma análise mostrou que não há diferenças significativas entre os efeitos promovidos pela Papsina e Escina nas doses terapêuticas quando comparadas entre si nos níveis de significâncias analisados.

TABLELA VII - Teste de Tukey para médias do χ^2 anterior.

TRATAMENTOS	Nº DE RATOS	MÉDIAS	INÍVEL 5%	INÍVEL 1%
Controle	10	0,102	b	B
Papaina T	10	0,070	c	C
Papaina 5x	10	0,172	a	A
Escina T	10	0,076	c	C
Escina 5x	10	0,033	d	D
Diferença Mínima				
Significativa			0,00504	0,00014

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

- Papaina T (Papaina Terapêutica); Papaina 5x (Papaina na dose 5 vezes maior); Escina T (Escina Terapêutica); Escina 5x (Escina na dose 5 vezes maior).

A Tabela VIII demonstra os valores médios e a diferença mínima significativa para os valores obtidos do crescimento do colo posterior do fêmur.

Nota-se, à semelhança dos colos medial e anterior, que a Papaina, em doses 5 vezes maiores que a dose terapêutica, promove um crescimento de aproximadamente 50% a maior que o crescimento dos animais pertencentes ao grupo controle.

Por outro lado, a Escina e a Escina em doses terapêuticas inibem o crescimento por volta de 30% em relação ao grupo controle e a Escina em dose 5 vezes maior que a dose terapêutica mostra uma inibição do crescimento de aproximadamente de 70%.

Verifica-se que à exceção feita da Papaina e da Escina nas doses terapêuticas, onde não há diferenças significativas entre si, os demais tratamentos mostram diferenças significativas já ao nível de 1% de probabilidade.

TABLELA VIII - Teste de Tukey para a² do colo posterior.

TRATAMENTO	Nº DE RATOS	MÉDIAS	NÍVEL 5%	NÍVEL 1%
Controle	10	0,102	b	B
Papaina T	10	0,072	c	C
Papaina 5x	10	0,147	a	A
Escina T	10	0,070	c	C
Escina 5x	10	0,033	d	D
Diferença Mínima Significativa	10		0,0585	0,00713

- Papaina T (Papaina Terapêutica); Papaina 5x (Papaina em dose 5 vezes maior); Escina T (Escina Terapêutica); Escina 5x (Escina em dose 5 vezes maior).

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a nível de significância indicada.

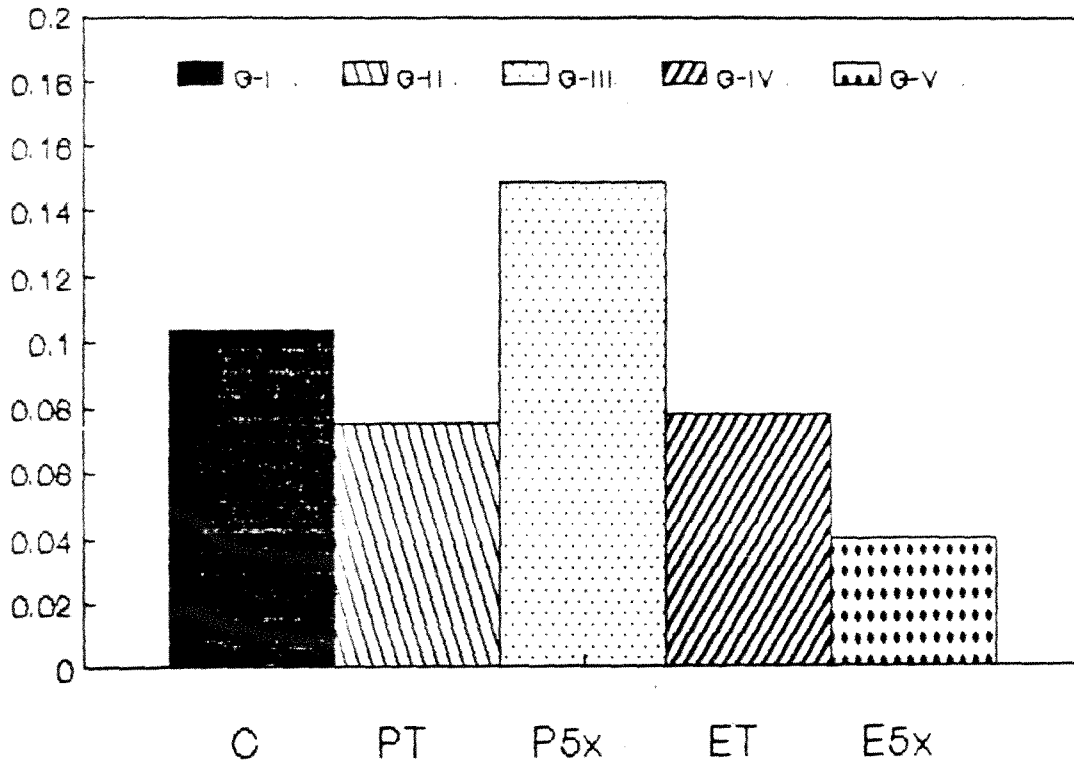


GRÁFICO I:- Valores do crescimento dos fêmures (μ)
do colo medial dos grupos:

- GI - C - Soro Fisiológico
- GII - PT - Papaina Terapêutica
- GIII- P5x- Papaina dose 5x maior
- GIV - ET - Escina Terapêutica
- GV - E5x- Escina dose 5x maior

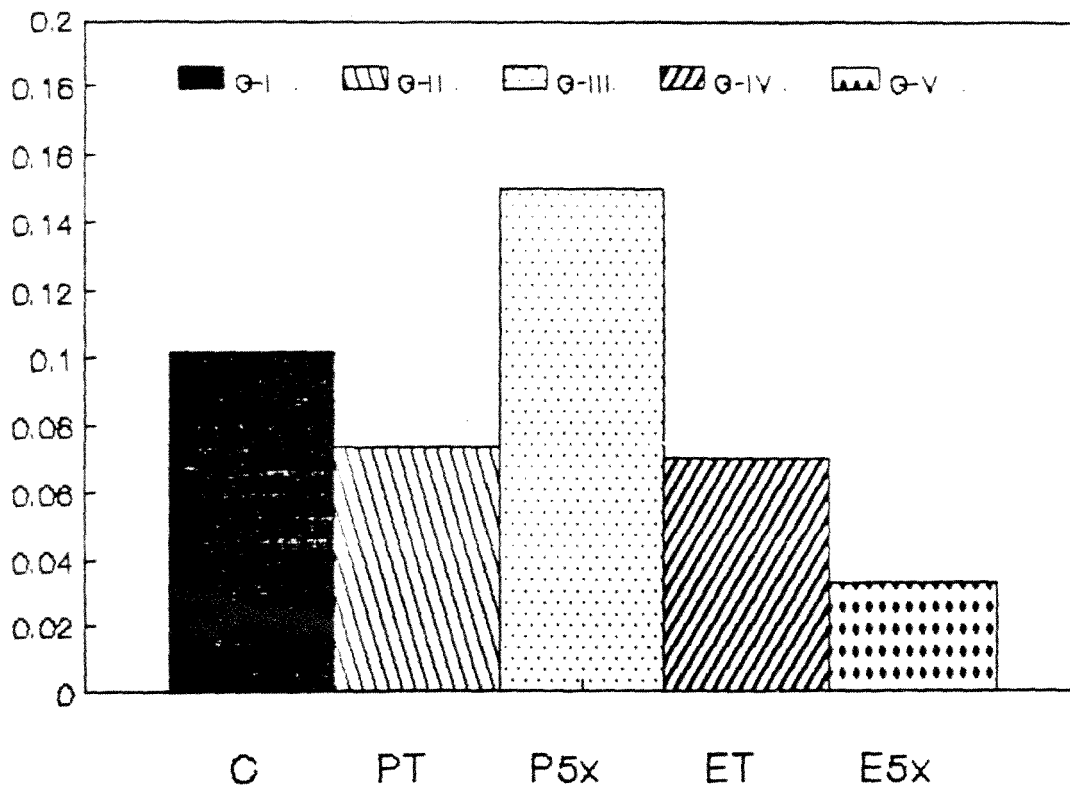


GRÁFICO II - Valores do crescimento dos fêmures (mm) do colo anterior dos grupos:

- GI - C - Soro Fisiológico
- GII - PT - Papaina Terapêutica
- GIII - P5x - Papaina dose 5x maior
- GIV - ET - Escina Terapêutica
- GV - E5x - Escina dose 5x maior

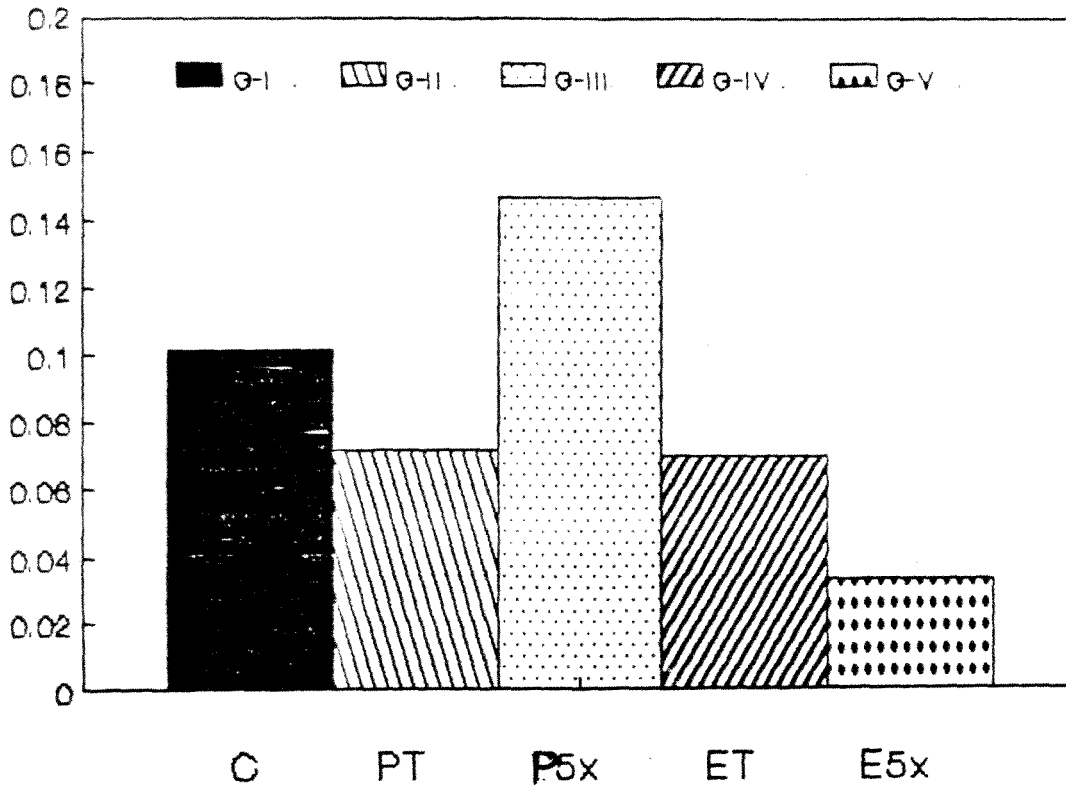


GRÁFICO III - Valores do crescimento dos fêmures (μ)
do colo posterior dos grupos:

- GI - C - Soro Fisiológico
- GII - PT - Papaina Terapêutica
- GIII - P5x - Papaina dose 5x maior
- GIV - ET - Escina Terapêutica
- GV - E5x - Escina dose 5x maior

Capítulo 2

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Para que os efeitos da Papaina e da Escina sobre o crescimento dos colos medial, anterior e posterior, mais precisamente sobre os processos de mineralização da matriz orgânica dos fêmures dos ratos possam ser estudados, impõe-se a comparação entre os valores obtidos dos grupos contróle com aqueles que receberam diferentes doses de Papaina e Escina.

Ao observar-se os resultados apresentados no capítulo anterior, verificarse que tanto a Papaina (Grupo II), quanto a Escina (Grupo IV) em doses terapêuticas, com relação ao grupo contróle (Tab. I), mostraram um menor crescimento, que foi na ordem de 30% aproximadamente para todas as faces estudadas (Gráficos I, II e III). Essas observações foram confirmadas pelas análises de variância e pelo teste de comparações de médias duas a duas de Tukey, sendo significantes ao nível de 5% e 1% de probabilidade.

Por outro lado, a administração de Papaina em doses cinco vezes maior que a terapêutica promoveu um maior crescimento que o grupo de aproximadamente 50% nos colos medial anterior e posterior, sendo essas alterações significantes ao nível de 1% de probabilidade conforme demonstra o teste de Tukey (Tbs. I e II e Gráficos I, II e III).

Constratando aos efeitos da Papaina administrada em doses 5 vezes maior, a Escina também em doses 5 vezes maior que as doses terapêuticas, apresentou uma redução do crescimento por volta de 70% quando comparado ao Grupo I (Contróle) e de 35% em relação ao Grupo da

Escina Triacetata (Tabelas I, IV e V e Gráficos I, II e III), sendo esta significativa ao nível de 5 e 1% de probabilidade conforme mostra o teste de T-test.

O estudo de alguns aspectos do desenvolvimento ósseo realizado neste trabalho, vem, a nosso ver, trazer uma efetiva contribuição e a confirmação dos efeitos do uso desses anti-inflamatórios vegetais sobre o crescimento ósseo.

Os trabalhos que tratam desses assuntos e citados na literatura (HULT, 1958; HULT & WESTERBORN, 1959; MERKOW & LALICH, 1961; SINDAIR ARAUZ, 1982; BUSATO, 1985 e SILVA, 1989) consideraram as alterações radiográficas ou através de medidas realizadas com paquímetros e sobre o crescimento total do osso, enquanto que o presente estudo foi realizado observando-se as modificações na própria zona de crescimento da matriz orgânica.

Evidentemente que outras avaliações no desenvolvimento, crescimento e do metabolismo ósseo (nível de cálcio, fosfatase alcalina, condroitim sulfato), terão que ser realizados para o melhor esclarecimento do mecanismo de ação dessas drogas.

A eficácia do método usado pela Alizarina Red's nos estudos de velocidade de mineralização óssea, ficou registrada através dos trabalhos de SHOUR et alii (1943); ERICKSON & OGILVIE (1958); HARRIS et alii (1944); PINHEIRO (1966); TEIXEIRA et alii (1977) e (1996) onde foi concluído que a mesma cora especificamente a matriz orgânica em via de calcificar-se.

Os efeitos de Papaina e da Escina em doses terapêuticas encontradas nesse trabalho, são concordantes com aqueles citados por HULT (1958); Mc CLUSKEY & THOMAS (1958); HULT & WESTERBORN (1959);

KITAHARA e LALICH (1981), KUTNUSLAND (1974), BUSATO (1969), SILVA et alii (1985 e 1989) e TEIXEIRA et alii (1990), que observaram a ação de fechamento prematuro das placas epifisárias com evidente diminuição de crescimento do fêmur, vértebras, esterno, costelas e tálus, levando até ao nanismo condroplástico humano.

Apesar do presente trabalho não permitir uma análise profunda sobre o mecanismo de ação das drogas utilizadas, pode-se inferir pelas discussões das pesquisas supra citadas que possivelmente as mesmas teriam a ação de remover o sulfato de condroitina, e da matriz cartilaginosa "in vivo".

Entretanto, o mecanismo de mineralização da matriz óssea não é totalmente conhecido. Admite-se que o início de mineralização do osteóide se dê com a exocitose de vesículas osteoblásticas ricas em cálcio e fosfato.

Na matriz óssea, os íons cálcio e fosfato promovem um equilíbrio metastático, ou seja, as suas concentrações excedem o produto de solubilidade ($Ca \times P$), sendo que a formação dos cristais de hidroxiapatita é evitada pela presença de inibidores da calcificação como o pirofosfato inorgânico e possivelmente por esses antiinflamatórios vegetais (Papaina e Escina).

Os osteoblastos contém grandes quantidades de fosfatase alcalina, cuja atividade se encontra aumentada nos estados de ativação de formação óssea.

Dessa forma, acredita-se que a fosfatase alcalina possa facilitar o processo de mineralização pela clivagem dos grupamentos fosfato, levando tanto à diminuição dos inibidores locais de calcificação quanto a um aumento ainda maior de concentração de

fosfato nos locais de mineralização, o que poderia estar coincidendo com um aumento de Fosfina 5 vezes maior.

O controle da formação óssea envolve a diferenciação e proliferação osteoblástica e formação da matriz celular. Atualmente, acredita-se que certos componentes da matriz orgânica contém informações necessárias para indução da formação óssea. Admite-se que existam proteínas quimiotáxicas e morfogenéticas capazes de recrutar células osteoprogenitoras para os sítios de formação óssea e induzir a diferenciação até osteoblastos e osteócitos. Vários assim chamados fatores ósseos de crescimento têm sido isolados (CANALIS, 1985), alguns muito semelhantes à IGF1 e PDGF.

Sabe-se que pelo menos um desses fatores de crescimento, capaz de induzir a formação óssea, é liberado durante a reabsorção óssea. Esse tipo de proteína pode servir como acoplador entre a formação e reabsorção óssea, uma vez que é liberada durante a reabsorção óssea, e é capaz de aumentar a proliferação do progenitor osteoblástico, assegurando a homeostase esquelética.

Muitos outros hormônios e fatores de crescimento sistêmicos podem regular direta ou indiretamente a formação óssea, através da estimulação da proliferação dos precursores osteoblásticos (IGF1, EGF, FGF, PDGF) e/ou modulação da formação da matriz óssea (PTH = di-hidroxi-colecalciferol, insulina, hormônio de crescimento, esteróides sexuais, calcitonina, hormônios tireoideanos e glicocorticóides. Muitos desses fatores atuam indiretamente, talvez através da ativação de mecanismos locais acoplados da reabsorção e formação óssea. Por exemplo, tanto o paratormônio (PTH) quanto o 1,25 (OH)2-D atuam diretamente nos osteoblastos, diminuindo a síntese de

colágeno e reduzindo a formação óssea, entretanto, ambos os agentes aumentam a formação óssea, "in vitro", possivelmente através de mecanismos indiretos.

A calcitonina não age diretamente nos osteoclastos mas aumenta a formação óssea indiretamente através de efeitos inibitórios sobre os osteoclastos. Os glicorticóides reduzem a formação óssea, enquanto que a inulina estimula a síntese de colágeno e a multiplicação dos osteoblastos.

As prostaglandinas, especialmente as da série E, podem ser importantes reguladores da formação óssea, em altas concentrações elas inibem a síntese de colágeno, mas em concentrações mais baixas elas estimulam a função osteoblástica.

Por outro lado, observou-se que a Papaina em doses terapêuticas diminui a velocidade de mineralização, enquanto que a mesma droga em concentrações 5 vezes maior provocou efeitos opostos, aumentando o crescimento em até 70%. Além disso, sabe-se (SLOVIK, 1984 e FINKELMAN & BUTTLER, 1985) que os osteoblastos, pela ação da vitamina D, sintetizam a proteína osteocalcina que tem alta afinidade pela hidroxiapatita, e a osteonectina (glicoproteína) que também se encontra presente no tecido ósseo que está sendo mineralizado, a qual se acha firmemente ligada ao colágeno, porém, fortemente ligada à hidroxiapatita, ambas revelando participação de forma importante no processo da osteogênese. Portanto, esses anti-inflamatórios vegetais (Papaina e Escina), que são enzimas proteolíticas poderiam estar afetando essas ligações e retardando o processo de re-formação óssea, além da liberação do condroitim sulfato das cartilagens (MILT & WESTERBORN, 1959).

Além disso, sabe-se (CHIODINI & LUZZI, 1929 e WILLIAMS, 1988) que o hormônio do crescimento não exerce efeito direto sobre o crescimento da cartilagem e do osso, ambos os quais terão de crescer para poder orientar a estrutura global do animal. Entretanto, o hormônio do crescimento estimula indiretamente seu crescimento fazendo com que várias pequenas proteínas denominadas coletivamente de somatomedina ou fator de crescimento insulínico (IGF-I e II), as quais são formadas no fígado e talvez nos músculos e nos rins, agem diretamente sobre a cartilagem e osso promovendo o seu crescimento. A somatomedina é necessária para a deposição do sulfato de condroitina e de colágeno, ambos os quais são necessários para o crescimento de cartilagem e do osso.

O principal efeito biológico dos fatores de crescimento insulínico (IGFS) é a ativação da mitogênese. Os efeitos sobre a cartilagem são evidenciados pelo estímulo do transporte de aminoácidos, pela síntese de RNA, DNA, proteínas e incorporação de sulfato nos proteoglicanos e de prolina no colágeno (DAUGHADAY, 1977 e VAN WYK & UNDERWOOD, 1978).

Alguns fisiologistas (KOSLYO & ISAKSSON, 1977; DAUGHADAY, 1977; WILLIAMS, 1988; GUYTON, 1991 e NELLO AIRD, 1991) acreditam que a maioria das funções importantes do hormônio do crescimento seja realizada pela mediação desses fatores de crescimento insulínico, já que muitas ações conhecidas do hormônio do crescimento não ocorrem na sua ausência.

Assim sendo, a Papaina e a Escina poderiam, eventualmente, estar agindo nessa mediação do complexo hormônio do crescimento e fatores insulínicos, dificultando a deposição de sulfato de

condroína, colágeno e íons cálcio, diminuindo assim a velocidade de mineralização da matriz orgânica.

Capítulo VI

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

À análise e a discussão dos resultados obtidos dos efeitos da papaina sobre a velocidade de mineralização do osso fêmur em ratos, subdividiam as seguintes conclusões:

1. A administração da Papaina em doses terapêuticas (0,25 mg/kg de peso corporal) durante 12 dias sucessivos promove, efetivamente, uma diminuição na velocidade de mineralização nos colos medial, anterior e posterior da matriz orgânica, conseqüentemente, reduzindo o crescimento ósseo;

2. O uso da Papaina em dose 5 vezes maior que a terapêutica (1,25 mg/kg de peso corporal) durante 12 dias consecutivos, efetua um aumento na velocidade de mineralização nos colos medial, anterior e posterior da matriz orgânica do osso fêmur, e portanto um maior crescimento ósseo;

3. A aplicação da Escina em doses terapêuticas (1,71 mg/kg de peso corporal) durante 12 dias sucessivos provoca uma marcada diminuição na velocidade de mineralização nos colos medial, anterior e posterior da matriz orgânica do osso fêmur e, em conseqüência, um menor desenvolvimento ósseo;

4. A administração da Escina em doses 5 vezes maior que a dose terapêutica (8,55 mg/kg de peso corporal) promove uma diminuição na velocidade de mineralização nos colos medial, anterior e posterior da matriz orgânica do osso fêmur e, por conseqüência, uma incontestável diminuição do crescimento ósseo.

Capítulo VII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. AARON, A.; SCHMIDT, J. R.; SHUMFROG, H. Demonstration of the *in vivo* activity of papain. *Annals New York Academi Sciencas*, 25(2): 323-6, may 16, 1957.
02. AICHINGER, F.; BISS, G.U.; VOGEL, G. Neue Befunde zur Pharmakodynamik von Bioflavonoiden und des Roflaxonien - Saponins Aescin als Grundlage ihrer Anwendung in der Therapie - Arzneim - Forsch. RVg. *Bonn*, 14: 892-896, 1964.
03. BRYANT, H.J.; LEDER, J.G.; STETTEN, D. Jr. The release of chondroitin sulfate from rabbit cartilage following the intravenous infection of crude papain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 24, 122-130, 1958.
04. BUSATO, M.S.S. Efeito de antiinflamatórios enzimáticos (D-omefina, escina e papaína) no desenvolvimento crânio - facial de ratas. Piracicaba, 1985 ETese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia - UNICAMP.
05. CACT, F. & GLUCK, G.M. Double - blind study of prednisolone and papase as inhibitors of complications after oral surgery. *J. Am. Dent. Assn.*, 22(2): 325-7, 1976.

06. SANABLI, E. Effects of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 1977, 244-262, 1977.
07. CHIODINI, P.G. & LIUZZI, A. The regulation of growth hormone secretion. St. Albans, Vt., Eden Medical Research, 1979.
08. CHOPRA, R.N. Indigenous drugs of India. 2nd ed. P.N. CHOPRA, I.C. CHOPRA, K.L. Handa and L.D. KAPUR, Eds. (U.N. Dhar and Sons Pvt. Ltd., Calcutta) 1958, p. 309.
09. CRAVEN, A.H. Growth in width of the head of the macaca rhesus monkey as revealed by vital staining. *Am. J. Anat.*, St. Louis, 42: 341-362, 1956.
10. DIXON, H. & HOYTE, D. A comparison of aut-radiographic and alizarin techniques in the study of bone growth. *Anat. Rec.*, Philadelphia, 145: 101-113, 1963.
11. DOMK, L.V. & LEROY, P. Effect of cortisone on rat foetus. *J. Endocr.*, 20: 488-489, 1951.
12. DAUGHADAY, W.H. Hormonal regulation of growth by somatomedin and other tissue growth factors. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 6: 117, 1977.

13. ORENTH, F.; JANSOMTUS, J.P.; KOEKOCK, R.; SVEN, O.M.; WOTHERS, B.R. Structure of papain. *Nature*, 212: 929-930, 1968.
14. SMELL, J.F.; SHANAHAN, J.; WINBURY, M.M. The analgesic and anti-inflammatory activity of papain. *Arch. Intl. Pharmacodyn.*, 222, no 1, 1966.
15. ENCSBT, B.; HULT, A.; WESTERBORN, O. Effect of papain on bone. *Arch. Path.*, 42: 600-614, 1959.
16. ERICKSON, L.C. & OGILVIE, A.L. Aspects of growth in the cranium, mandible and teeth of the rabbit as revealed through the use of alizarin and metallic implants. *Anat. Rec. Chicago*, 28: 47-56, 1950.
17. EVERSOMANN, R. The drug treatment of oedema after maxillofacial operations. *Dtsch. Zahnärztl. Z.*, 24: 238, 1960.
18. FINKELMAN, R.D. & BUTTLER, W.T. Vitamin D and skeletal tissues. *J. Dent. Res.*, 14: 1191-215, 1935.
19. FERHAN, P.H. The adrenals, 1962. In: *Textbook of Endocrinology* Edit. Williams R.H. Philadelphia, W.B. Saunders and Co., 3rd ed., 1963, p. 309.

20. GIBBS, R.J.L.; DI SACCOBOLI, B.; STEINER, P.O.; REACH, M.L.; PEARL, W. The anti-edema properties of mercin. *Arbeitsblätter Pharmakologie*, 1: 127-136, 1961.
21. GLICK, E. & BRU BACKER, L.J. An examination of the rat's assay to determine the active-site normality of papain. *Analytical Biochemistry*, 22: 419-492, 1976.
22. GOLDENBERG, N. & PRESTES, N.M. Tratamento preventivo dos edemas em cirurgia buco-maxilo-facial com o emprego da escina (estudo experimental) in V Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial, São Paulo, 1979.
23. GLICKMAN, J.; STONE, I.C.; CHAWLA, T.N. The effect of the systemic administration of cortisone up the periodontium of white mice. *J. Periodont.*, 24: 161-167, 1953.
24. GUYTON, A.C. *Textbook of Medical Physiology* W.B. Saunders Company, E.U.A. 1991.
25. HARRIS, W.H.; TRAVIS, D.F.; FRIBERG, O.; ERIC, P. The *in vivo* inhibition of bone formation by Alizarin Red. *Journal of bone and joint surgery*, 46: 493-508, 1964.
26. HEFFI, F. & KAPPELER, U. Clinical investigation of mercin ampoules in cases of post operative and post-traumatic edema. *Schweiz. Bundesarchiv Med. (PRAXIS)* 64, 1975.

27. HOYTE, D. Alizarin as an indicator of bone growth. *J. Dental*, 21: 438-440, 1960.
28. HULT, A.M.D. The growth inhibiting effect by papain on young rabbits. *Acta Orthop. Scandinavica*, 27: 167-70, 1958.
29. _____; WESTERBORN, O. Experimental production of dwarfs in rabbits papain. *Experimental Cell Research*, 543-47, 1959.
30. _____; SWEDEN, V. The effect of crude papain on the epiphyseal cartilage of laboratory animals. *The Journal of Bone and Joint Surgery*; 41B(4), 1959.
31. IRVING, J.T. Calcium and Phosphorus Metabolism. New York, Academic Press., 1973.
32. JARABAK, J.P. & VERE, Le ROY. Alizarin as an indicator of bone growth. *J. Dent. Res.*, 29: 512, 1951.
33. JOHANSSON, L.D. Dentine apposition in the mandibular first molars of albino rats. *Archiv. Oral Biol.*, 5: 81-91, 1961.
34. KOSTYO, J.L. & ISAKSSON, D. Growth hormone and the regulation of somatic growth. *Int. Rev. Physiol.*, 12: 255, 1977.

35. PUTNICKI, S. Gross facial skeletal changes in young rats induced by prolonged papain administration. *Growth* 28(3): 381-2, 1974.
36. LANE, H. & MENNICK, H.H. Pharmacokinetic study on tritiated Escin in mouse and rat. *Arzneim-Forsch*, 22: 1979-1982, 1973.
37. LINN, R.H. Alizarin red's vital dye in the study of wound healing in the jaws of hamsters. *J. Am. dent. Ass.*, 58: 31-35, 1959.
38. LOCKS, H. The influence of horse chestnut Extracts on various tons. *Arzneim-Forsch*, 24: 1347-1350, 1972.
39. LUCAS, J. Experiência com a escina em terapia interna. *Medicbe Well-futea*, 16: 913-16, 1963.
40. MAGLIULO, E.; CARCO, F.P.; GORINI, S.; BARIGAZZI, G.M. In Vivo and In Vitro Researches on the Antiphlogistic Action of the escine. *Arch. Sci. Med.*, 125: 207-210, 1968.
41. MAGNIE, G.D. Proteolytic enzymes in oral surgery. *J.A.D.A.*, 22: 1420-1425, 1966.
42. McCLUSKEY, R.T. & THOMAS, L. The removal of cartilage matrix in vivo, by papain. Identification of crystalline papain protease as the cause of the phenomenon. *J. Bone-J. Med.*, 100: 371-83, 1958.

43. MATTOS ALPES, B. Livro de Fisiologia. 1a. Ed. Guanabara Koogan S/A. Rio de Janeiro, 1991.
44. MERKOV, L. & LAJICH, J.J. Skeletal changes in suckling rats, induced by prolonged papain administration. *J. Bone Min. Res.*, 42: 670-86, 1961.
45. MILNE, J. & BRAND, S. Occupational asthma after inhalation of dust of the proteolytic enzyme papain. *Br. J. Ind. Med.*, 24: 302-7, 1975.
46. MINORINO, S. & SCANARINI, M. Effects Antiedema Dell'Escina A Livello Cerebrale. *Minerva Anestesiologica*, 44: 355-360, 1978.
47. MOSS, M.L. Morphological changes in the growing rat skull following administration of cortisone acetate. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 29: 648-650, 1955.
48. PINHEIRO, C.E. Estudo de alguns aspectos da ossificação em ratos (*Rattus Norvegicus Albinus*) diabéticos aloxânicos. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, 1966.
49. RAISZ, L.G. Bone metabolism and calcium regulation. In: AVIDLI, L.V. & KRANE, S.M. Metabolic bone disease. Vol. I. New York, Academic Press, 1977.

50. SANCIONI, E. & POLTRON - Apud SCHODD, J. et alii. Vital staining of growing horse and teeth with silver nitrate. *J. Dent. Res.*, 20: 411-419, 1941.
51. POTHOFF-ISCHEBECK, M. & VOGEL, G. The effect of Prostaglandin E₁ (PGE₁) on the plasma-lymph barrier of the Hind Limb of Rabbits and its antagonization by Aescin and Indo Methacin. *Lyngbytidsskr.*, 12: 47-53, 1990.
52. STERINS, H. The permeability of cell membranes for ions under the influence of aescin. *Arzneimittelforsch.*, 12: 376-378, 1962.
53. SILVA, L.C.; ARBEX, S.T.; NEDER, A.C. Efeitos de antiinflamatórios enzimáticos (Bromelina, Escina e Papaina) no desenvolvimento da coluna vertebral de ratos. *Rev. Méd.*, 21: 5-8, 1985.
54. _____; _____; JOSÉ, J.L. Efeito de antiinflamatórios enzimáticos (bromelina, escina e papaina) no desenvolvimento de crânios e vértebras de ratos. *Rev. Méd.*, 22: 187-189, 1987.
55. SINCLAIR ARAUZ, J.F. Estudo comparativo dos antiinflamatórios de origem vegetal (bromelina, escina e papaina) em cirurgia. Piracicaba, 1992 [Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia - UNICAMP].

56. SLOTH, I., ROFF SHAN, M.H., SARNAT, B.C., ENGEL, M.B. (1941) Staining of growing bone and teeth with Alizarin Red's. *J. Dent. Res.*, 20: 411-418, 1941.
57. SLOTH, D.M. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting. *J. CLIN. END. METABOLIC.*, 59, 298, 1984.
58. SNIDER, G.L., HAYES, J.A., FRAZBLAU, C., KOGAN, H.M., STONE, P.S., KORTHY, A.L. Relationship between elastolytic activity and experimental emphysema. Induced properties of papain preparations. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 11: 254-262, 1974.
59. SPICER, S.S. & BRYANT, J.H. Cartilage changes in papain treated rabbits. *Am. J. Pathol.*, 32: 1237-45, 1957.
60. _____ & _____. Systemic effects in rabbits receiving injections of papain and chondroitin sulfate. *Am. J. Pathol.*, 24: 61-75, 1956.
61. STRATES, B. & NEUMAN, W.F. On the mechanism of calcification. *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, New York, 22: 688, 1968.
62. TEIXEIRA, D., PAES DE FREITAS, M.A., DELLA PIAZZA BUENO, R., GUIMARÃES, A. Effects of hydrocortisone in the mineralization speed of the dentine. *Anat. Dent. J.*, 22: 13-16, 1977.

63. NEIMY, S., N.F., TEIXEIRA, B., JOSÉ, J.L. Efeito da Papaina na velocidade de mineralização da dentina dos incisivos superiores e inferiores de ratos. *Anais_SBBQ*, vol 6, 1990.
64. _____; ARRUDA VEIGA, N.C.F. Efeito da Escina na velocidade de mineralização de dentina de incisivos superiores e inferiores de ratos. *Anais_da_SBBQ*, vol. 6, 1990.
65. _____; GUIMARÃES, A. Estudo comparativo do efeito da bromelina, escina e papaina na velocidade de mineralização de incisivos superiores e inferiores de ratos. *Anais_da_SBBQ*, vol. 6, 1990.
66. THOMAS, L. Reversible collapse of rabbit ears after intravenous papain and prevention of recovery by cortisone. *J. Exper. Med.*, 122: 245-252, 1954.
67. TSALTOS, T.T. Pepsin induced changes in rabbit cartilage. Alterations in the chemical structure of the cartilage matrix. *J. Exper. Med.*, 122: 507-510, 1968.
68. VAN LYS, J. & UNDERWOOD, L.E. The somatomedins and their actions. *Biochem. Actions Horm.*, 5: 101, 1976.

69. UPNEY, A. Rev. de Therap. Med. Chiurg. 1896, ibid 1909. *Annals of Medicine*, 1909.
70. VOGEL, G., MAREK, M.L., STOECKERT, I. Weitere untersuchungen zum wirkungsmechanismus des Rofkastanien-Saponins Aescin. *Arzneimittelforsch. (Drug Res.)*, 13: 59-60, 1963.
71. _____, _____, OTTNER, R. Studies on the mechanism of therapeutic and toxic action of the horse chestnut saponin escin. *Arzneimittelforsch.*, 20: 649-700, 1970.
72. _____, _____; STOECKERT, I. Weitere untersuchungen zum wirkungsmechanismus des Rofkastanien - Saponins Aescin - *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 13: 59-60, 1963.
73. WAGNER, J. On the components of the seeds of horse chestnut. 4th Communication. *Arzneim. Forsch.*, 12: 546-551, 1967.
74. WILLIAMS, R.P. Textbook of endocrinology 6th. ed. Philadelphia, N.E. Saunders Co. 1963.
75. YAEGER, J.A. Methacrylate embedding and sectioning of calcified bone. *Stain-Technol.*, New York, 22: 229-239, 1958.

Capítulo VIII

RESUMÓ

8. RESUMO

O presente trabalho foi realizado com a finalidade de estudar os eventuais efeitos dos anti-inflamatórios de origem vegetal (Papaina e Escina) sobre a velocidade de mineralização do osso fêmur de ratos.

Foram utilizados 50 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), com 40 dias de idade, pesando em média entre 110 e 120 gramas no início da experimentação e distribuídos da seguinte forma:

Grupo I - Controle Normal - 10 ratos que receberam doses diárias de solução fisiológica (via I.P.) e duas doses de Alizarina Red's (100 mg/kg peso aos 40 e 52 dias, respectivamente, e sacrificados aos 55 dias de idade.

Grupo II - Papaina - 10 ratos, que além das doses de Alizarina Red's semelhantes ao grupo anterior receberam Papaina (Tromasín®) via I.P., na concentração de 0,25 mg/kg de peso durante 12 dias. Os animais também foram sacrificados aos 55 dias de idade.

Grupo III - Papaina (dose 5 vezes) - 10 ratos que receberam durante os 12 dias experimentais papaina (Tromasín®) na concentração de 1,25 mg/kg de peso. Aos 40 e 52 dias de idade foram administradas as doses de Alizarina Red's e sacrificados aos 55 dias.

Grupo IV - Escina - constituído de 10 ratos os quais receberam escina (Reparil) na concentração de 1,71 mg/kg de peso (dose terapêutica) durante os 12 dias do período experimental e Alizarina Red's aos 40 e 52 dias e sacrificados aos 55 dias de idade.

Grupo V Escina (dose 5 vezes) - formado por 10 ratos, nos quais foram administrados durante 30 dias consecutivos Escina (10 mg/kg de peso) e Reparil (8,55 mg/kg de peso) e Alizarina (0,1 mg/kg) nos 40 e 52 dias e sacrificados aos 55 dias de idade.

Os animais foram sacrificados por decapitação e imediatamente os fêmures retirados, limpos, e uma fatia justa de 2 a 2 mm de espessura, da extremidade epifisária, foram incluídos em metacrilato, seguindo a técnica de YAEGER (1958).

As peças foram cortadas transversalmente e despolidas até 500 microns para a perfeita visualização das faixas de Alizarina.

A mensuração entre as distâncias das duas faixas foi feita para todos os ossos no colo medial, anterior e posterior; com auxílio da ocular micrométrica de Leitz e objetiva 10/0,22.

A análise de variância dos dados obtidos revelou a ocorrência de diferenças significativas nos grupos estudados, tanto ao nível de 5% quanto ao nível de 1% de probabilidades.

Os resultados revelaram que a papaina em doses terapêuticas (grupo II) promoveu uma diminuição da distância entre as faixas de aproximadamente 30% em relação ao grupo controle.

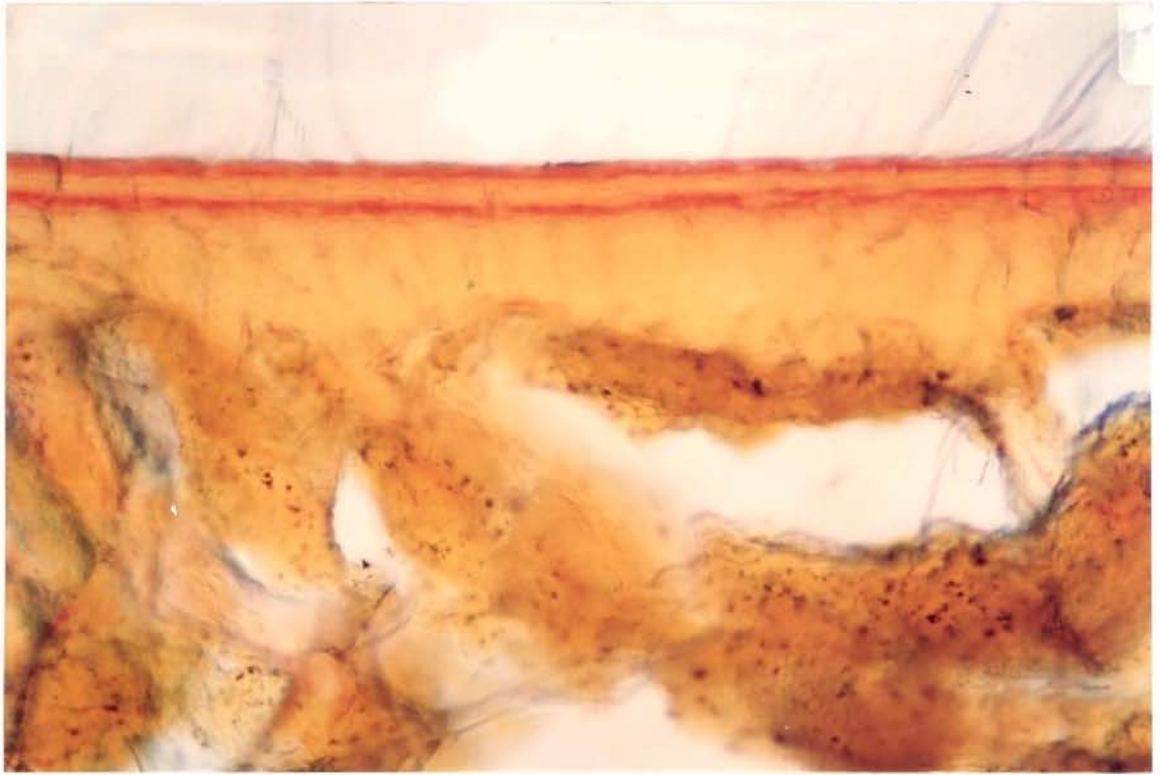
Por outro lado, a papaina com doses 5 vezes maiores que a terapêutica (grupo III) demonstrou um aumento de aproximadamente 50% em relação ao Grupo I (Controle).

Os animais do Grupo IV, os quais receberam Escina na dose terapêutica mostraram uma redução de 30% nos três colos estudados, enquanto a escina em doses 5 vezes maior que a dose terapêutica (grupo V) revelaram uma diminuição de aproximadamente 70% em relação ao grupo I e de 37% quando comparados com o grupo IV.

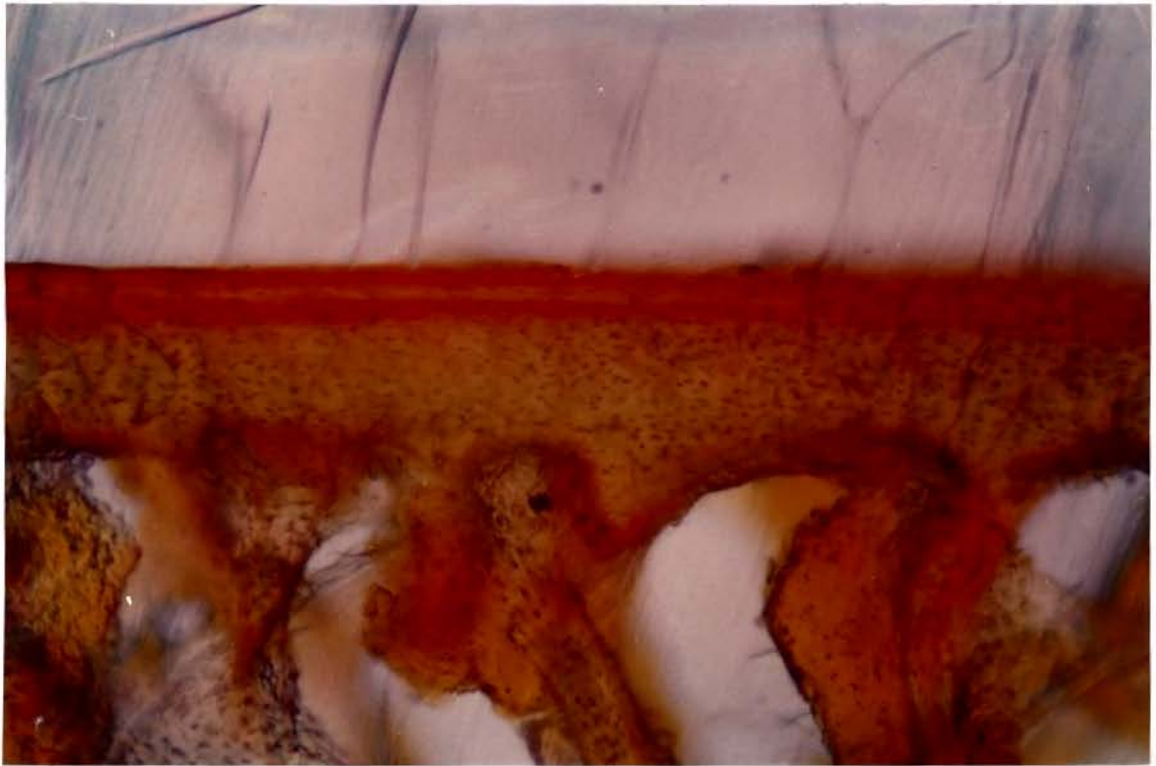
Por esse modo, nota-se que a ação feita a quente demonstra uma maior distância entre os feixes que por conseguinte uma menor velocidade no processo de mineralização e portanto um menor crescimento ósseo.

Capítulo IX

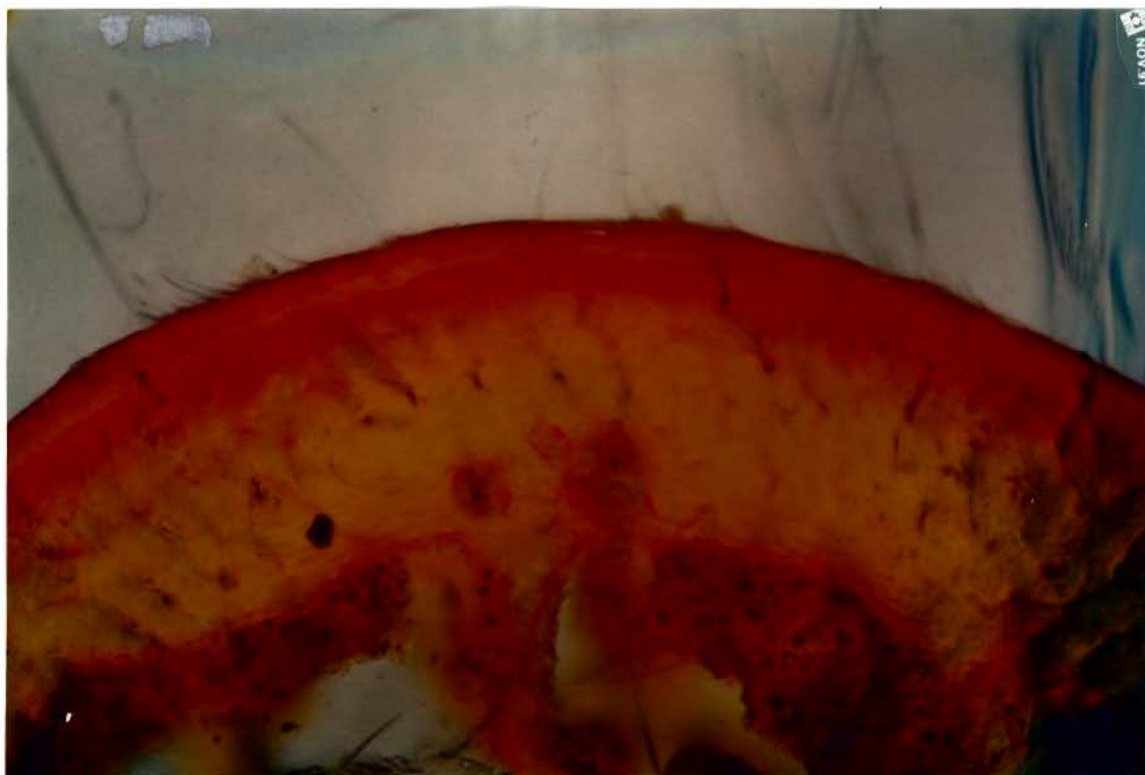
APÉNDICE



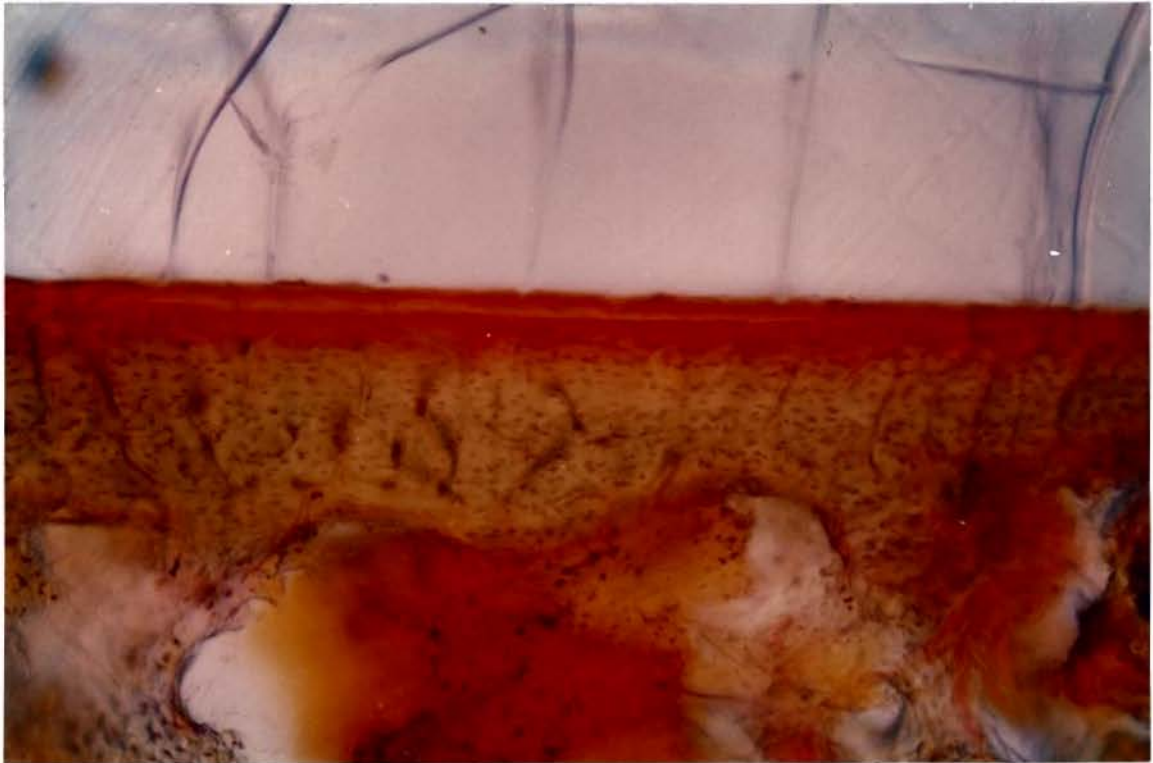
EQ10.1:- Fotomicrografia subjetiva de arteira a 1,25x de vista parcial do anel elástico interno dos 1.º e 2.º do grupo controlé.



EQ1Q_21: Fisiologia e fisiopatologia (objetiva 16h optovar 2,25) -
visão principal do polo anterior dos animais do
grupo papaina terapêutica.



E01Q_31- Fotomicrografia (objetiva 16x ocular 1,25x) de
vista parcial do colo medial dos anéis do
grupo papilar dose 5x maior.



EQIQ_41- Fotomicrografia objetiva (40x aumento (1,25) da vista a cima) do colo anterior dos animais do grupo E com dose 5x maior.