

este exemplar
foi devidamente
revisado e aprovado
conforme
Resolução C.C.P.G. 1036/85
Piracicaba, 21/06/93
Thaís M. T. B.

ELOÁ JANNUZZI HERNANDES / JORDÃO

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO DICLOFENACO
POTÁSSICO E PIROXICAM, SOBRE AS TRANSAMINASES, NO
SORO DE RATOS PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADOS.**

Tese apresentada a Faculdade
de Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP para obtenção do Título
de MESTRE em Ciências - Área de
Farmacologia.

**PIRACICABA
1992**

UNICAMP
BIBLIOTECA GERAL

ELOÁ JANNUZZI HERNANDES JORDÃO ⁹⁶⁵

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO DICLOFENACO
POTÁSSICO E PIROXICAM, SOBRE AS TRANSAMINASES, NO
SORO DE RATOS PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADOS.**

Orientador: Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO ⁷

Tese apresentada a Faculdade
de Odontologia de Piracicaba -
UNICAMP para obtenção do Título
de MESTRE em Ciências - Área de
Farmacologia.

PIRACICABA
1992

"Toda criatura humana possui consigo as sementes da Sabedoria e do Amor; quando ambientar esses divinos germes, dentro de si mesma, e desenvolvê-los amplamente, através dos séculos incessantes, conquistará as qualidades do Sábio e do Anjo, que se revelam na sublime personalidade dos Filhos de Deus, em maioridade divina".

(FRANCISCO C. XAVIER - pelo Espírito Irmão
JACOB)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu marido, JOSE ROBERTO

Não valem somente palavras.

É preciso, antes de tudo, compreensão, amor e
carinho nos momentos certos.

Estas atitudes é que me fizeram buscar, traçar e
conquistar.

Aos meus filhos , ROBERTO e RAFAELA

Por tudo o que representam na minha vida,

dedico este trabalho.

Aos meus pais, que compartilharam meu ideal e o alimentaram, incentivando-me a prosseguir, fossem quais fossem os obstáculos.

As minhas irmãs, minha nona, cunhados e sogra, que sempre me apoiaram e ajudaram.

Meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, pela
orientação segura, competente e amiga.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. CARLOS ALBERTO VOGT, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo apoio ao ensino e à pesquisa em nosso meio universitário.

Ao Prof. Dr. RENATO ROBERTO BIRAL, Diretor da FOP/UNICAMP, pela dedicação e trabalho desenvolvidos em prol do engrandecimento de nossa Faculdade.

À Prof. Dra. MARIA DE LOURDES GARBOGGINI DA GAMA, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação - Área de Farmacologia, da FOP-UNICAMP, pela dedicação para com os alunos.

Ao Prof. RONALDO WADA, pela colaboração na avaliação estatística deste trabalho.

Aos DOCENTES DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA, pelos ensinamentos transmitidos.

À Prof. LUCIANE CRUZ LOPES ARAUJO, farmacêutica-bioquímica, pela eficiência, desprendimento e auxílio na realização da fase experimental deste trabalho.

Aos Srs. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, técnico da Área de Farmacologia e PEDRO SÉRGIO JUSTINO, fotógrafo do Centro de Recursos Audiovisuais, pela atenção dispensada na realização de serviços técnicos prestados.

Ao C.D. FRANCISCO CARLOS GROPPPO, pelo serviços de digitação deste trabalho.

Ao Sr. ADEMIR MARIANO pela colaboração no manuseio dos animais.

As Sras. VILMA BIZUTI DOS SANTOS e MARIA ELIZA DOS SANTOS, pela amizade e solicitude demonstradas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pelo apoio a esta pesquisa, através da concessão de bolsa de estudo.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica Oral, pela atenção dispensada.

A todos aqueles que, embora não citados nominalmente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

CONTEÚDO

CONTEÚDO

1	- INTRODUÇÃO	02
2	- REVISÃO DA LITERATURA	08
3	- PROPOSIÇÃO	24
4	- MATERIAL E MÉTODOS	26
	4.1 - ANIMAIS UTILIZADOS	26
	4.2 - TÉCNICA DE HEPATECTOMIA PARCIAL	26
	4.3 - COLHEITA DO SANGUE PARA DOSEAMENTO DAS TRANSA- MINASES	27
	4.4 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O DOSEAMENTO	27
	4.5 - DOSEAMENTO DAS TRANSAMINASES NO SORO	27
	4.5.1 - MÉTODO UTILIZADO	27
	4.5.2 - FUNDAMENTOS DO MÉTODO	28
	4.5.3 - PROCEDIMENTO	29
	4.5.4 - CURVA DE CALIBRAÇÃO	30
	4.6 - DROGAS UTILIZADAS	30
	4.7 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS	31
5	- SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA	33
	5.1 - ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	33
6	- RESULTADOS	35
7	- DISCUSSÃO	47
8	- CONCLUSÕES	54
9	- RESUMO	56
10	- SUMMARY	58
11	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	APÊNDICE	69

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

As maiores características da regeneração hepática depois da hepatectomia parcial em ratos, são bem conhecidas, e tem sido questão de estudos detalhados desde o trabalho de HIGGINS & ANDERSON (1931), onde é descrita a técnica da retirada parcial do fígado de aproximadamente 65 a 75% do órgão.

Embora um grande número de estudos sobre a bioquímica da célula do fígado em regeneração tenha sido executado, a identidade e o modo de ação do estímulo para o rápido crescimento regenerativo, permanecem essencialmente desconhecidos.

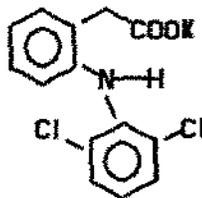
Depois do desenvolvimento do fígado fetal e pós-natal, os hepatócitos não mais se proliferam ativamente. Em adultos humanos e animais adultos, os hepatócitos alcançam longa vida, em torno de 200 a 400 dias ou mais. A replicação do hepatócito no fígado humano ocorre mais frequentemente como uma resposta à injúria hepática causada por agentes químicos, viroses, anoxia, cirrose, bem como em outras condições. Isto pode ser induzido em animais de laboratório através da hepatectomia parcial ou morte celular causada por agentes químicos, onde o tetracloreto de carbono (CCl₄) tem sido muito utilizado. Em todos esses casos, o crescimento hepático é uma resposta compensatória ao decréscimo da massa hepática ou à perda celular (FAUSTO, 1986; FAUSTO & MEAD, 1989).

Por mais de 50 anos de investigação, tem-se pesquisado os fatores mitogênicos, presumivelmente de origem extra-hepática, capazes de induzir a síntese de DNA nos hepatócitos. Apesar do progresso o qual tem ocorrido no isolamento e identificação de tais fatores (LABRECQUE et alii, 1987; NAKAMURA et alii, 1986; THALER & MICHALOPOULOS, 1985), parece improvável que um único fator poderia ser responsável por uma sequência inteira de eventos, dirigindo a replicação dos hepatócitos.

Várias hipóteses tem sido propostas considerando a natureza do estímulo que encoraja as células do fígado a entrarem no ciclo celular: - mudanças na pressão do sangue portal; - alterações no nível de hormônios circulantes; - perda de inibidores de crescimento no tecido; - controle por via sanguínea ou tecido hepático de fatores específicos de crescimento (MORLEY & ROYSE, 1981). Fatores de crescimento do fígado tem sido identificados no soro (MORLEY & KINGDON, 1973), e no fígado em regeneração (LABRECQUE & PESCH, 1975), mas seu exato mecanismo é obscuro.

Através das condições experimentais ao nosso alcance, optou-se por esse modelo experimental, para se avaliar a possível hepatotoxicidade do diclofenaco potássico e piroxicam, muito em uso em Odontologia.

O diclofenaco potássico é um antiinflamatório não-esteróide, derivado do ácido fenilacético. Sua fórmula estrutural está apresentada a seguir:



Nome Químico: [O-(di cloro 2,6 fenil)aminol] fenilacetato de potássio

O diclofenaco potássico injetável caracteriza-se por ser rapidamente absorvido, apresentando picos de concentrações plasmáticas entre 10 e 30 minutos.

As principais reações de transformação metabólica do diclofenaco potássico consistem na formação de ésteres glicurônicos, hidroxilação aromática e formação de derivados fenólicos que são eliminados sob a forma livre ou conjugada.

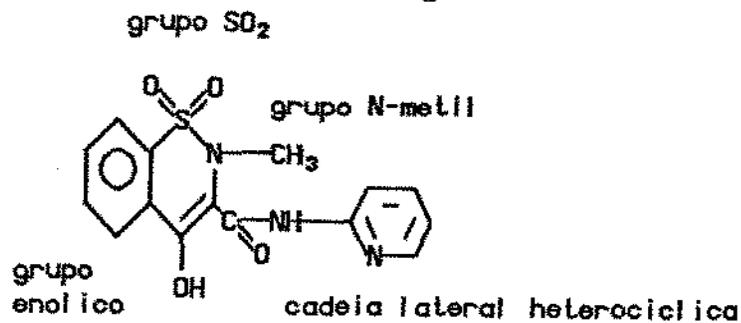
O diclofenaco potássico e seus metabólitos são facilmente eliminados pelo organismo, em grande parte (65%) através da urina e o restante pelas fezes. Mais de 40% do processo de excreção ocorre já nas primeiras 12 horas, sendo a eliminação quase completa ao final de 72 horas. Isto exclui os riscos de acumulação, mesmo em tratamentos prolongados. Liga-se intensamente com proteínas plasmáticas, principalmente à albumina na proporção de 99,7%. Possui alto grau de atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética e é um potente inibidor competitivo da ciclooxigenase, inibindo a síntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxana sendo sua meia vida plasmática de aproximadamente 1 a 2 horas.

Estudos mais recentes, "in vitro" e "in vivo", têm mostrado que o diclofenaco também induz a redução da formação dos leucotrienos e do 5-hidroxi-eicosatetraênico, sugerindo uma interferência também sobre a via lipoxigenase (SCHOLER D.W. et alii, 1986; KU, E.C. et alii, 1986). Possui um índice terapêutico (quociente da dose tóxica DL50 pela dose eficaz DE50), favorável de 114,3 mg/Kg, em roedores, embora existam casos de ocorrência de valores elevados dos níveis de transaminases, icterícia e hepatite (CATAFLAM, s.d.).

Em Odontologia tem sido empregado nos abscessos dentários, alveolites, cirurgia bucomaxilofacial e inflamações pós-traumáticas, principalmente quando a expectativa de desconforto para o paciente é grande e em casos que requeiram, associado a antibióticos.

O piroxicam é um antiinflamatório não esteróide, derivado de ácido enólico. Está sendo recentemente utilizado pela sua atividade antiálgica, antitérmica e antiinflamatória. Pertence a uma série de N-carboxamidas heterocíclicas da 1,2-benzotiazina-1, 1-dióxido que recentemente foi designada pelo Committee of United States Approved Names (USAN) como OXICAM.

A fórmula estrutural do piroxicam é a seguinte:



Nome químico: 4 hidroxi - 2 metil - N (2 piridil) 2H - 1,2 benzotiazina - 3 carboxamida 1-1 dióxido.

Acredita-se que o piroxicam participa do ciclo entero-hepático e estima-se que sua meia-vida plasmática seja de aproximadamente 45 horas, no homem. HOBBS & TWOMEY (1979) afirmam que a meia-vida em ratos machos é de 6 horas, e em estudos mais recentes os mesmos autores afirmam que em fêmeas a meia vida é de 16 horas. É um potente inibidor da biossíntese de prostaglandinas, e esta inibição reversível exerce-se através do bloqueio da ação da cicloxigenase, a qual transforma o ácido araquidônico em dois endoperóxidos cíclicos. Além disso, inibe a migração dos monócitos e polimorfonucleares para o local da inflamação. Estes dois efeitos por si mesmos, já seriam suficientes para diminuir a inflamação, uma vez que as prostaglandinas desempenham um papel chave na gênese e sintomas do fenômeno e as células que para esses locais migram, liberam potentes mediadores químicos da reação inflamatória. Pela sua ação ocorre diminuição da formação dos grupamentos hidroxila (citotóxicos) fazendo com que diminua a agressão inflamatória.

Alterações em diferentes parâmetros da função hepática foram observadas, em que alguns pacientes podem desenvolver um aumento dos níveis de transaminases durante o tratamento com piroxicam (FELDENE, 1985).

Já está estabelecido que o piroxicam não altera o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

O piroxicam é determinável no plasma logo nos trinta minutos que se seguem à administração oral, alcançando 80% da sua concentração plasmática máxima ao fim de uma hora apresentando alto grau de ligação proteica (99%). É metabolizado em larga escala, e menos de 5% da dose diária é eliminado sem alteração pela urina e pelas fezes. A via metabólica mais importante é a oxidação do anel piridílico da cadeia lateral, seguida da conjugação com o ácido glicurônico e eliminação urinária.

A DL₅₀ oral nos roedores é de 200 - 300 mg/Kg, em comparação com a DE₅₀ que é de 0,1 mg/Kg nos estados inflamatórios do rato, mostrando ampla margem de segurança sendo indicado numa variedade de doenças que requerem atividade antiinflamatória e/ou analgésica.

II - REVISÃO DA LITERATURA

II - REVISÃO DA LITERATURA

No ser humano normal, tanto o controle do crescimento quanto o da reprodução celular apresentam aspectos ainda não totalmente esclarecidos. Entretanto sabemos que certas células se reproduzem ininterruptamente, tais como as da medula óssea, que dão origem às células sanguíneas, às da camada germinativa da pele e as do epitélio intestinal. No entanto, muitas outras células, tais como as do músculo liso, não se reproduzem durante muitos anos e algumas, como os neurônios e as musculares estriadas, não se reproduzem durante toda a vida do indivíduo. Entretanto, quando o organismo apresenta uma deficiência numérica de alguns tipos de células, estas se multiplicarão com muita rapidez, até que o seu número necessário seja repostado, como ocorre no fígado. Até 7/8 do fígado podem ser removidos cirurgicamente e as células do oitavo restante dividir-se-ão até que a massa hepática retorne quase ao normal. O mesmo fenômeno ocorre em praticamente todas as células glandulares, nas células da medula óssea, no tecido subcutâneo, no epitélio intestinal e na maioria dos tecidos, com exceção das células que apresentam grande diferenciação, como as células nervosas e musculares (GUYTON, 1986).

Sabemos muito pouco sobre os mecanismos que mantêm quantidades apropriadas dos diferentes tipos de células no organismo. Estudos experimentais, entretanto, mostraram que substâncias de controle, denominadas "chalonas", são secretadas pelas diferentes células, causando efeitos de retroalimentação para parar ou diminuir o seu crescimento e divisão quando se formam em excesso. Sabemos que células de qualquer tipo, removidas do organismo e desenvolvidas em cultura de tecidos, podem reproduzir rápida e indefinidamente se o meio no qual se desenvolvem for continuamente renovado. Quando se permite que pequenas quantidades de suas secreções se acumulem no meio, no entanto, elas suspenderão o crescimento, o que apóia a hipótese de que substâncias controladoras limitam o crescimento celular (GUYTON, 1986).

O sincronismo da resposta e sua capacidade de estabelecer o ponto final, deixa claro que a regeneração hepática depois da hepatectomia parcial é rigorosamente regulada por um processo de crescimento não autônomo que deve ser controlado pelos mesmos fatores que são responsáveis pela determinação e manutenção da massa hepática no organismo intacto. A quebra desses mecanismos regulatórios gera um sinal que causa a entrada dos hepatócitos no ciclo celular, síntese de DNA e replicação, mas somente o suficiente para restaurar a massa do órgão. Visto que a regeneração envolve o tecido hepático inteiro, ambos os tipos de células, parenquimais e não-parenquimais, participam da resposta ao crescimento. Durante esse processo, as células do fígado podem responder à sinais intra ou extrahepáticos (mecanismos paracrino e endócrino) e podem também ser capazes de sintetizar fatores que promovam seu próprio crescimento (mecanismos autócrinos) (FAUSTO & MEAD, 1989).

NORRIS et alii (1942) compararam a regeneração do fígado após a hepatectomia parcial em ratos de diferentes idades como: neonatal e fígado de adultos. Os fígados de rato em todas as idades estudadas, tinham grande capacidade de regenerar depois da hepatectomia parcial, mas a taxa e a quantidade total de regeneração variava inversamente com a idade do animal.

Muitos trabalhos descrevem as mudanças que ocorrem nos hepatócitos depois da hepatectomia parcial. Interessante e extensa pesquisa feita por MURRAY et alii (1981), revela que os efeitos específicos relacionados com a regeneração hepática, parecem ser o aumento do volume dos lisossomos em 4-8 horas depois da hepatectomia parcial, e um aumento no número de mitocôndrias em 24 horas após a hepatectomia parcial. O aumento da quantidade de lipídeos e o aparecimento de proteínas, são provavelmente efeitos secundários. A redução maciça dos depósitos de glicogênio imediatamente após a operação, parece ser um efeito não específico provavelmente como resultado do *stress* induzido pela cirurgia. Entre 12 e 20 horas observou-se um reacúmulo de glicogênio, pois há um aumento na concentração de insulina plasmática.

Há novamente uma depleção de glicogênio entre 20 e 24 horas nos animais parcialmente hepatectomizados. Isso provavelmente é resultado de mudanças associadas com o estágio inicial da divisão celular. É mostrado também, que nesse intervalo de tempo, a concentração de insulina continua a aumentar nos animais de operação simulada, então o glicogênio também aumenta. Já nos animais parcialmente hepatectomizados, a concentração de insulina permanece constante e a reserva de glicogênio diminui, o que comprova a diferença do acúmulo do glicogênio.

A regeneração do fígado depois da hepatectomia parcial, é também um excelente modelo para o estudo da regulação molecular envolvida na biogênese de mitocôndria de mamíferos. Duas a três semanas depois da hepatectomia parcial, o peso do fígado é restaurado e concomitantemente há uma ampla síntese de mitocôndrias (TARSIO & HALDAR, 1983). Esses autores mostraram que mitocôndrias isoladas de fígados de ratos dois a três dias depois da hepatectomia parcial, são duas a três vezes mais ativas na incorporação de aminoácidos na proteína, do que mitocôndrias isoladas de animais de operação simulada.

MURRAY et alii (1981) revelam que as mitocôndrias, já mostravam aumento no seu número até 8 horas no fígado de animais parcialmente hepatectomizados. Mas entre 8 e 24 horas cada mitocôndria se divide uma vez, em média, atingindo o dobro do número de mitocôndrias. Esse aumento ocorre como se vê, anteriormente à fase de replicação do DNA nuclear, o que provavelmente pode ser uma reação aos mesmos estímulos que causam a replicação celular. Os mesmos autores mostram que o aumento de volume dos lisossomos era acompanhado por um aumento na concentração de glucagon no plasma sanguíneo, e de AMPc na membrana da célula do fígado. O glucagon causa um aumento no tamanho dos lisossomos por induzir autofagia celular. Esse efeito ocorre entre 3-4 horas após a hepatectomia parcial, sendo o mesmo período de tempo do pico do volume lisossomal depois da hepatectomia parcial. Os valores da concentração de glucagon e AMPc continuaram a aumentar depois de atingido esse pico.

Então um aumento inicial na concentração de glucagon é provavelmente responsável pelo aumento transitório do volume lisossomal. Um aumento no volume e fragilidade da membrana dos lisossomos pode ser um precursor da replicação celular.

DUGUAY et alii (1982) estudaram a influência do etanol em ratos até 3 semanas antes da cirurgia, e cada grupo foi sacrificado em intervalos de 24 horas, durante 3 dias depois da hepatectomia parcial. A administração de etanol resultou numa significativa e persistente redução de renovação das células hepáticas. O pico foi atingido com atraso de 48 horas, significativamente reduzido quando comparado com os picos dos animais do grupo controle. Esses resultados sugeriram que a administração crônica de etanol é um potente inibidor da multiplicação do hepatócito. O efeito era reversível depois de uma semana de abstinência.

PÖSÖ & PÖSÖ (1981), pesquisaram o efeito do etanol sobre o RNA e síntese de proteína em fígado de rato em regeneração. O estudo sugere que o etanol inibe a síntese de proteína a nível de transcrição, por interferir com a síntese de RNA no núcleo.

Depois da hepatectomia parcial, os hepatócitos sintetizam DNA dentro de 24 horas. MIURA & FUKUI (1979) avaliaram a influência da aspirina e indometacina, e verificaram que essas drogas podem suprimir a regeneração hepática depois da hepatectomia parcial em ratos. Esse fato sugeriu um envolvimento das prostaglandinas no fígado em regeneração. Esses anti-inflamatórios sendo inibidores da cicloxigenase, inibem a síntese de prostaglandinas, e assim, com administração dessas drogas, observou-se um decréscimo da síntese de DNA 24 horas após a hepatectomia parcial.

RIXON & WHITFIELD (1982), também propõem que as prostaglandinas e tromboxanas podem estar envolvidas no período pré-replicativo dos hepatócitos de ratos parcialmente hepatectomizados.

KANZAKI et alii (1979), mostraram que a tromboxana pode gerar o "gatilho" da transição entre as fases G0 e G1 do ciclo celular.

Posteriormente, HIYAMA et alii (1981) pesquisaram a influência dos metabólitos do ácido araquidônico na regeneração hepática. Grandes quantidades de prostaglandinas e tromboxanas eram formadas após a hepatectomia parcial. Uma interpretação desse resultado seria a de que a hepatectomia parcial causa ativação da fosfolipase A₂ e libera o ácido araquidônico da membrana fosfolipídica. Então um aumento no ácido araquidônico pode levar a uma produção aumentada de prostaglandinas e tromboxanas.

SOBCZAK & DUGUET (1986) realizaram uma importante revisão sobre a biologia molecular do fígado em regeneração. Ao contrário da proliferação celular nos hepatomas, a proliferação celular ativa no fígado em regeneração pára, quando a quantidade de tecido perdido foi compensada. Essas características trazem muitas questões importantes: - quais estímulos disparam o "gatilho", para que as células hepáticas se dividam, e façam com que párem essa divisão? - como são esses estímulos integrados a nível celular? Algumas evidências emergem do estudo do controle fisiológico da regeneração hepática, de modificações que ocorrem na membrana plasmática, e de identificação de mudanças no mRNA, bem como nas proteínas e atividades enzimáticas.

Durante a regeneração, os tipos de células existentes no fígado, não realizam a síntese de DNA e mitose simultaneamente. A incorporação de (³H) timidina no DNA, mostra que o primeiro tipo de célula envolvida é o hepatócito, enquanto que em outros tipos de células ocorre um dia depois (GRISHAM, 1962), como ocorre com as células não parenquimais. Depois do período pré-replicativo de 14-16 horas, a explosão de síntese de DNA começa, atingindo um pico 22-24 horas depois da hepatectomia parcial e decrescendo posteriormente. Uma onda de mitose se segue 6-8 horas mais tarde, e a divisão celular se processa diminuindo a taxa até a massa de fígado ser restaurada.

Isto delinea duas fases: a fase pré-replicativa, chamada "hipertrófica" (a qual também pode ser induzida no fígado normal pelo Epidermal Growth Factor), e a "hiperplásica", começando com a síntese de DNA e correspondendo ao período visível de divisão celular (SOBZAK e DUGUET, 1986).

Em nível histológico, a atividade mitótica no fígado remanescente inicia-se ao redor da área portal e progride através da área centrolobular (GRISHAM, 1962). Uma interpretação disso seria de que as células centrolobulares entram mais vagarosamente no ciclo de divisão do que as células localizadas perto da área portal. Um inibidor da proliferação hepática (Hepatic Proliferation Inhibitor) tem sido localizado nas células centrolobulares do fígado normal (MACMAHON et alii, 1984). Essa molécula tem sido purificada do citoplasma de células hepáticas, e é capaz de inibir a divisão de hepatócitos estimulados *in vitro*. Seria interessante saber se essa molécula é degradada antes do início da síntese de DNA na regeneração hepática. Uma outra interpretação é que um fator mitogênico é transportado pelo sangue portal, difunde da área portal para a centrolobular, desencadeando uma onda de síntese de DNA dentro do lóbulo.

Muitas observações enfatizam a existência dos chamados fatores hepatotróficos, no sangue de ratos parcialmente hepatectomizados. Cruzando a circulação de ratos parcialmente hepatectomizados com ratos normais, ocorre um significativo aumento de síntese de DNA nos fígados de ambos (MOOLTEN & BUCHER, 1967). A fração β -globulina do plasma (especialmente composta de lipoproteínas) é capaz de induzir a síntese de DNA nos hepatócitos de animais não hepatectomizados (SHORT et alii, 1969). Os efeitos de muitos hormônios foram também investigados: infusão de uma mistura de triiodotironina, aminoácidos, glucagon e heparina, produzem síntese de DNA no fígado de animais não hepatectomizados (SHORT et alii, 1972). Assim, parece que várias moléculas plasmáticas são capazes de induzir a síntese de DNA nos hepatócitos, como se o estímulo básico fosse um desequilíbrio na concentração de um ou outro hormônio ou fatores de crescimento.

A síntese de DNA é induzida *in vitro* pela adição de insulina e E.G.F. (Epidermal Growth Factor), mas o efeito mitogênico pode ser bloqueado por um excesso de glucagon. Ao contrário, insulina e glucagon são necessários para a regeneração hepática, e o soro de ratos parcialmente hepatectomizados é mais rico em glucagon do que insulina. Entretanto, nenhum desses dois hormônios é capaz de induzir a síntese de DNA no fígado intacto (SOBCZAK & DUGUET, 1986). A necessidade de insulina e glucagon para um bom restabelecimento depois da hepatectomia parcial, é agora aplicado clinicamente no tratamento do pós-operatório de casos de hepatoma (MIURA & FUKUI, 1979).

Epidermal Growth Factor (E.G.F.), é um polipeptídeo o qual tem mostrado ser capaz de iniciar a síntese de DNA *in vitro* com células de fígado e *in vivo* (RICHMAN et alii, 1976; LEFFERT & KOCH, 1980; BUCHER & WANDS, 1977). EGF isolado ou em conjunto com outros hormônios ou fatores de crescimento do fígado (LABRECQUE & PESCH, 1975), induzem a uma série de eventos culminando com a síntese de DNA e mitose.

O soro de ratos parcialmente hepatectomizados contém substâncias capazes de estimular a síntese de DNA nos hepatócitos (LABRECQUE et alii, 1987; NAKAMURA et alii, 1986; THALER & MICHAPOULOS, 1985). O fato dos fatores de crescimento serem detectados no soro de ratos parcialmente hepatectomizados, não implica necessariamente que os mesmos sejam responsáveis pelo "gatilho" da regeneração hepática. É concebível que os fatores de crescimento encontrados no soro de ratos parcialmente hepatectomizados, sejam produzidos e liberados pelo fígado em regeneração, como uma consequência de algum evento inicial, o qual induziu os hepatócitos a entrarem no ciclo celular.

A identificação dos nervos dentro do fígado tem sido uma difícil tarefa, a qual é sempre resultado de dados conflitantes no tipo (adrenérgico X colinérgico) e extensão da inervação (MORLEY & ROYSE, 1981). Esses autores mostraram que a vagotomia deprimiu marcadamente a proliferação celular seguida da hepatectomia parcial.

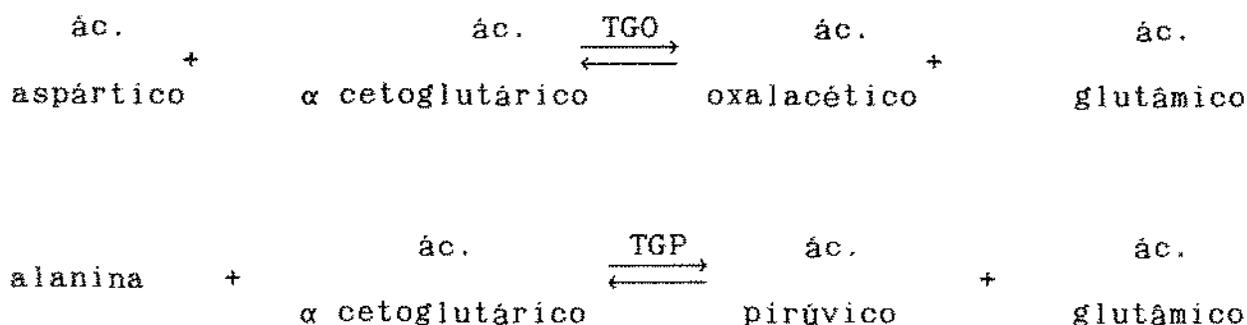
Embora a interpretação desses estudos seja difícil, parece que o sistema nervoso intacto, é um importante componente do sistema regulatório para a regeneração hepática (MORLEY & ROYSE, 1981). O fígado intacto é inervado por fibras simpáticas (adrenérgicas) e fibras parassimpáticas (colinérgicas). A síntese de DNA é estimulada pela secção dos nervos simpáticos, e é inibida pela secção dos nervos parassimpáticos. Além disso, um efeito tardio é reproduzido se uma droga anticolinérgica é administrada a ratos parcialmente hepatectomizados (KATO & SHIMAZU, 1983). Esses achados levaram à conclusão de que a noradrenalina inibe a regeneração hepática, enquanto que a acetilcolina estimula. Todavia, o S.N.A. não é essencial, dado que a síntese de DNA é medida sempre na ausência de acetilcolina. Os resultados obtidos *in vitro* são inesperadamente opostos às observações *in vivo*, visto que a noradrenalina é capaz de estimular (via receptor α) a síntese de DNA em cultura primária de hepatócitos (SOBCZAK & DUGUET, 1986). Esses autores concluem que o que emerge desse tipo de experimento, é que a regeneração hepática não é provavelmente induzida por um único fator. Os experimentos executados *in vitro* podem ajudar a elucidar quais moléculas são capazes de induzir a divisão dos hepatócitos, mas a maioria dos resultados são aparentemente opostos às observações *in vivo*.

Como pudemos observar até o momento, a avaliação da regeneração hepática, pode ser realizada através de inúmeros fatores como síntese de DNA, mRNA, mitose, lisossomos, mitocôndrias, hormônios, etc. De qualquer forma um bom referencial para esse tipo de avaliação, é a produção de proteínas que sem dúvida possibilitam a avaliação do tecido hepático em sua capacidade funcional, de fundamental importância para o metabolismo orgânico.

BENGMARK et alii (1968) realizaram trabalho em que foram sacrificados ratos em intervalos de tempo de 2, 6, 8, 12, 15^o até 18 meses após a hepatectomia parcial, e comparados com ratos não operados de mesma idade.

Nenhuma mudança significativa foi observada durante esse período, em relação ao peso do fígado, concentração de nitrogênio no fígado ou atividade das transaminases TGO e TGP.

As transaminases (ou aminoferases) desempenham um papel importante no metabolismo proteico. São enzimas que catalizam a transferência reversível, de um grupo α amino de um aminoácido para um α cetoácido, com a formação de novos α amino e α cetoácidos, segundo as reações:



Pela nova nomenclatura, a TGO é denominada aspartato aminotransferase (AST), e a TGP, alanina aminotransferase (ALT).

As transaminases, sobretudo a TGO, estão presentes nas bactérias e em todos os tecidos animais, existindo em quantidades mais apreciáveis no fígado, miocárdio, músculos esqueléticos, cérebro, rins e testículos, de sorte que qualquer lesão com destruição celular desses tecidos (com exceção do cérebro) provoca apreciável aumento dessas enzimas no sangue (OLIVEIRA LIMA et alii, 1985).

Como a TGP existe em maior quantidade no hepatócito e por essa razão o seu aumento, mesmo não sendo maior do que o da TGO, tem maior significação clínica como sinal de lesão hepática (OLIVEIRA LIMA et alii, 1985).

Em condições normais, há um enorme gradiente de concentração enzimática entre o interior e o exterior das células, cuja manutenção exige um grande dispêndio de energia.

Assim, danos mínimos nas células, seja por distúrbios de suprimento de energia, seja por aumento de permeabilidade da membrana, já acarretam um vazamento de enzimas para o espaço extracelular. O grau de elevação dessas enzimas no soro é proporcional à gravidade e extensão da lesão, de modo que se a lesão for bastante intensa e se o início suficientemente agudo, pode estabelecer-se uma acentuada semelhança entre o perfil enzimático do órgão lesado (no caso o fígado) e o perfil enzimático do soro (MILLER, 1984).

Em gastroenterologia, a maior indicação do doseamento das transaminases reside no diagnóstico da hepatite aguda, sobretudo a infecciosa, a mais frequente, quando o teor sanguíneo dessas enzimas, em geral, se eleva de 50 a 100 vezes, fato que não ocorre de modo tão pronunciado em nenhuma outra afecção. Dentre as causas extrahepáticas que amiúde se acompanham de aumento das transaminases, sobretudo a TGO, estão o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca congestiva, as pericardites, os traumatismos musculares (OLIVEIRA LIMA et alii, 1985).

Segundo LATNER (1975) a determinação da TGO fornece elemento de grande significação diagnóstica nas seguintes situações: a) diferenciação entre infarto do miocárdio e insuficiência coronariana (isquemia), não ocorrendo nesta última elevação da TGO; b) diagnóstico de infarto do miocárdio, quando as alterações do ECG não são bem definidos ou por serem de interpretação difícil devido a episódio anterior; c) na avaliação da extensão do infarto.

No infarto do miocárdio os níveis de TGO começam a subir 6 a 8 horas depois do aparecimento da dor. Os valores máximos são alcançados depois de 24 a 48 horas, baixando então até as cifras normais pelo 4º ou 5º dia, desde que não tenha ocorrido novo infarto (MILLER, 1984).

O aumento da TGO tem sido assinalado também na anemia hemolítica aguda, na necrose renal, nas queimaduras graves e no cateterismo cardíaco (OLIVEIRA LIMA et alii, 1985).

As transaminases são enzimas celulares e o aumento de sua concentração plasmática pode indicar lesão hepatocítica. A TGO está presente no citoplasma e nas mitocôndrias, ao passo que a TGP está presente apenas no citoplasma. CURTIS et alii (1972) mostram que existe um padrão no qual as enzimas intracelulares são liberadas na circulação, após uma toxicidade aguda no fígado. Enzimas citoplasmáticas aumentam no soro dentro de poucas horas, e as enzimas encontradas em ambos, citoplasma e mitocôndria, aumentam a seguir, e finalmente as enzimas mitocondriais aparecem. O estudo da relação TGO/TGP pode dar uma idéia do grau de lesão do hepatócito. Na hepatite infecciosa aguda, por exemplo, que se caracteriza por lesão difusa, predominantemente citoplasmática, a relação TGO/TGP em geral está em torno de um. Nas cirroses, a relação é quase sempre superior a 1,5.

ZIEVE et alii (1985) mostram em seu trabalho, o doseamento de várias enzimas hepáticas em ratos, incluindo a TGP, depois da retirada de grandes quantidades de fígado (80-90%), além do modelo padrão que são 2/3, correspondendo a 65-75% do órgão. A massa crítica residual mínima para a regeneração e sobrevivência é maior que 10% e menor que 18% do peso total de fígado. A sobrevivência a 90% de hepatectomia era melhor que 80% se os ratos recebem 20% de glicose na água de beber para prevenir hipoglicemia. O pico da enzima TGP tanto no modelo padrão quanto na retirada de 80-90% do fígado, ocorreu no tempo de 12 horas.

Às 48 horas os valores diminuíram, e às 72 horas atingiram o platô correspondente aos valores normais para os ratos. KANASHIMA et alii (1983) mostram o pico da TGO e TGP em 24 horas após a hepatectomia parcial em ratos. SEKAS & COOK (1979) também mostram o pico da TGO em 24 horas após a cirurgia, voltando ao normal por volta de uma semana.

Existem relatos na literatura, tanto para o diclofenaco como para o piroxicam, indicando que podem ocorrer elevações dos níveis de transaminases com o uso dessas drogas.

Em relação ao diclofenaco, CICCOLUNGI et alii (1978) mostraram que de um total de 268 pacientes, 30 apresentaram valores aumentados em relação aos testes hepáticos. Os autores concluem que 9 alterações poderiam estar relacionadas com a administração da droga.

DUNK et alii (1982) relatam um caso em que um paciente de 52 anos começou tratamento com diclofenaco e quatro meses após observou-se urina escura e icterícia. Os testes no soro sanguíneo para função do fígado, deram resultados coerentes com hepatite aguda. Os testes para hepatite A e B deram negativos. O diclofenaco foi afastado, e a icterícia resolvida completamente em sete dias. Recuperado, o tratamento com diclofenaco foi reiniciado e cinco semanas mais tarde, o paciente apresentou vômito e icterícia. A biópsia do fígado mostrou moderada hepatite aguda e proliferação das células de Kupffer, e eosinófilos no infiltrado inflamatório. O diclofenaco foi afastado, e seus sintomas resolvidos em poucos dias. Os resultados dos testes no soro para função hepática retornaram ao normal dentro de seis semanas e ainda estavam normais tres meses mais tarde. Os dois episódios de hepatite sugerem fortemente que a droga foi a responsável pela injúria do fígado. Para maiores detalhes sobre o diagnóstico de lesão hepática induzida por drogas, ver BIANCHI et alii (1974).

BREEN et alii (1986) descrevem o caso de um paciente de 56 anos que começou tratamento com diclofenaco para osteoartrite em 9 de abril de 1985. Antes, ele não havia tomado qualquer outro medicamento. Foi aplicado uma injeção I.M. de diclofenaco (50 mg) e iniciou tratamento com indometacina 75 mg/dia por 10 dias, e 50 mg/dia as duas semanas seguintes. Em 2 de maio recebeu uma injeção de 50 mg de diclofenaco e a indometacina foi substituída por diclofenaco oral, sendo de 75 mg/dia por 2 semanas e seguida por 100 mg/dia por 5 semanas. O paciente foi para o hospital em 26 de junho. Uma semana antes, sentia anorexia, náusea, desconforto abdominal e urina escura. Na entrada para o hospital estava icterico, mas sem nenhum sinal de doença hepática crônica. Uma semana depois, as investigações laboratoriais estavam de acordo com hepatite fulminante e a sorologia para infecção viral era negativa. O paciente não tinha história de viagem estrangeira, transfusão sanguínea, abuso de álcool, tóxicos ou homossexualidade. Sua condição foi gradativamente se deteriorando ocorrendo o óbito em 20 de julho, 24 dias após a admissão. Os autores concluem que o diclofenaco é o que pode ter causado a hepatite neste paciente, pois isso ocorreu enquanto tomava a droga. Mais alguns casos de hepatotoxicidade por diclofenaco foram relatados, principalmente na literatura francesa (BABANY et alii, 1983; LASGAR et alii 1984; DESHAVES et alii, 1984; BABANY et alii, 1985).

Com o piroxicam, estudos realizados em ratos, camundongos, cães e macacos em que foram utilizados doses que variaram entre 0,3 e 25 mg/Kg/dia, não evidenciaram toxicidade hepática (FELDENE, 1985).

Entretanto, LEE et alii (1986) descrevem um caso fatal, em que um paciente de 66 anos, tomou piroxicam (40mg/dia) por três dias e desenvolveu icterícia apresentando urina escura e fezes esbranquiçadas. A droga foi imediatamente suspensa. Testes para hepatite A e B deram negativos. A biópsia do fígado duas semanas após o ataque de icterícia, mostrou hepatite aguda com necrose.

O óbito ocorreu após 105 dias, e a biópsia do fígado imediatamente após a morte mostrou necrose centrolobular e células no infiltrado inflamatório (necrose hepática subaguda).

RAHMAN et alii (1979) estudaram 45 pacientes com artrite reumatóide tratados com piroxicam com doses entre 20 e 40 mg/dia, durante 910 dias. Em quinze pacientes a droga foi descontinuada devido a vários efeitos colaterais, e um deles apresentou anormalidade em relação aos testes para função hepática.

WOLFE (1986) comenta que o fato do piroxicam ser administrado uma vez ao dia, já indica que é uma alta dose para terapia com drogas anti-inflamatórias não-esteróides. Cita também, a decisão do governo Canadense em reduzir a dose inicial para 10 mg/dia em pacientes mais idosos, e que com essa medida, o número de injúrias e mortes por esta droga foi reduzido.

Segundo ROBBINS (1986) a hepatotoxicidade dos agentes terapêuticos é raramente o efeito tóxico do próprio medicamento sobre as células hepáticas. Quando esses efeitos ocorrem estão implicados dois mecanismos independentes, mas que talvez às vezes cooperem: (1) a biotransformação do medicamento que se processa no fígado com a formação de metabólitos tóxicos; ou (2) o medicamento, ou mais provavelmente, um de seus metabólitos funciona como hapteno para transformar uma proteína intracelular numa molécula imunogênica. A 1ª via é considerada como hepatotoxicidade "direta" e portanto, a última constitui uma hepatotoxicidade "indireta". A hepatotoxicidade de certos agentes terapêuticos pode estar relacionada claramente com uma ou outra dessas vias, porém com frequência o problema é obscuro. Por exemplo, existe documentação substancial de que os efeitos tóxicos do acetaminofen e da isoniazida sobre o fígado são exercidos diretamente por metabólitos bioquímicos dos medicamentos. Por outro lado, ainda persiste controvérsia acerca de se muitos agentes, como o halotano, são hepatotoxinas diretas ou se medeiam seus efeitos através de uma reação de hipersensibilidade.

A emergência de metabólitos tóxicos envolve a formação de poderosos agentes alquilantes ou acilantes que se fixam covalentemente a macromoléculas importantes para a viabilidade dos hepatócitos. Convém lembrar que esse mesmo sistema enzimático participa no metabolismo de inúmeras outras substâncias, como o álcool, fenobarbital, CCl_4 e os hidrocarbonetos carcinogênicos. Assim a exposição prolongada, por exemplo, ao álcool ou fenobarbital, resulta em aumento adaptativo na capacidade funcional do sistema enzimático hepático, caracterizando indução e exacerbando, possivelmente, a formação de metabólitos hepatotóxicos. Entretanto, pode haver competição pelos locais de fixação enzimática nas células hepáticas e essa inibição competitiva pode reduzir o ritmo da biotransformação metabólica. Certos agentes participam de inúmeras reações morfológicas: halotano, isoniazida e acetaminofen, por exemplo (LUDWIG & AXELSEN, 1983), podem causar necrose centrolobular ou submaciça, dependendo da dose e da vulnerabilidade do hospedeiro. De maneira análoga, a α metildopa pode ser responsável por hepatite aguda a crônica, ou às vezes, por necrose maciça.

III - PROPOSIÇÃO

III - PROPOSIÇÃO

Pretendeu-se medir a atividade de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) no soro de ratos submetidos ao tratamento com os diclofenaco potássico e piroxicam, em diferentes tempos após a realização da hepatectomia parcial.

IV - MATERIAL E MÉTODOS

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. - ANIMAIS UTILIZADOS

As experiências foram feitas em ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, criados em condições padronizadas desde o nascimento. Eram animais SPF (Specific Pathogen Free), com 60 dias de idade ao início do experimento e com pesos que variaram entre 174,5 e 243 gramas.

Os animais foram tratados com ração granulada PURINA, para animais de laboratório (Apêndice 01) e receberam água "ad libitum".

Nesse estudo foi escolhido o rato, pois esta espécie resiste bem aos processos cirúrgicos, e a mortalidade no pós operatório é baixa, além de ter uma resistência natural à infecções, o que é muito desejável, devido aos riscos da cirurgia.

4.2. - TÉCNICA DE HEPATECTOMIA PARCIAL

A técnica de hepatectomia parcial foi realizada de acordo com HIGGINS & ANDERSON (1931), descrita por MATTOS FILHO (1976) a qual permite a extirpação de 65 a 75% da massa hepática total. A referida técnica era utilizada do modo a seguir.

Após anestesia por inalação de éter sulfúrico foi realizada tricotomia na região abdominal e desinfecção do campo operatório com álcool iodado.

A seguir foi feita uma incisão de 3 a 4 cm de comprimento, na linha mediana, à partir do apêndice xifóide do osso esterno. Uma vez aberta a cavidade abdominal e localizado o fígado do animal, através de compressão lateral com as pontas dos dedos, expunha-se os lóbulos hepáticos mediano e lateral esquerdo. Os ligamentos suspensores eram seccionados, procedia-se a ligadura com o fio de algodão, e a seguir, os lóbulos eram extirpados. Os lóbulos lateral direito e o pequeno caudado permaneciam na cavidade abdominal.

Procedia-se então à sutura do abdômen com fio de algodão, em duas etapas: inicialmente a musculatura e a seguir a pele. A região novamente foi submetida à antissepsia. Todas as cirurgias foram realizadas entre 9 e 12 horas da manhã.

4.3. - COLHEITA DO SANGUE PARA DOSEAMENTO DAS TRANSAMINASES

O sangue para doseamento das transaminases, foi colhido através de secção da cauda do animal em sua porção terminal com tesoura apropriada (HADDAD, 1990). Para tal, o animal foi anestesiado com éter sulfúrico, e para a antissepsia da cauda foi utilizado álcool etílico. A cauda foi colocada num tubo de centrifuga a fim de aparar o sangue, o qual fluía pela ação da gravidade.

4.4. - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA O DOSEAMENTO:

O sangue foi colhido sem anticoagulante e deixado em repouso em estufa a 37°C durante 20 a 30 minutos. Transcorrido esse tempo, centrifugou-se os tubos a 2.500 r.p.m. (Porta-centrifuga TOMY moldel IC - 15 AN, TOMY SEIKO Co., LTD, Tokyo, Japan), durante 10 minutos, e depois de sedimentado o coágulo, pipetou-se o sobrenadante (KOZLOWSKI, 1991). O soro obtido, isento de hemólise, foi analisado no mesmo dia da colheita (BIOLAB, 1991).

4.5. - DOSEAMENTO DAS TRANSAMINASES NO SORO

4.5.1. Método utilizado:

Foi utilizado o método de REITMAN & FRANKEL** (1957) para determinação colorimétrica da atividade das transaminases, TGO (Transaminase Glutâmica Oxaloacética - *E.C. 2.6.1.1.) e TGP (Transaminase Glutâmica Pirúvica *E.C. 2.6.1.2.). Foram utilizados para análise, os reativos contidos no kit do Laboratório BIOLAB-MERRIEX.

* - E.C. = Enzyme Commission

** - Método adotado pelo fabricante para determinação de atividade enzimática - ver Biolab - Bioquímica clínica - enzimas: transaminases, s.L.p., 1991.

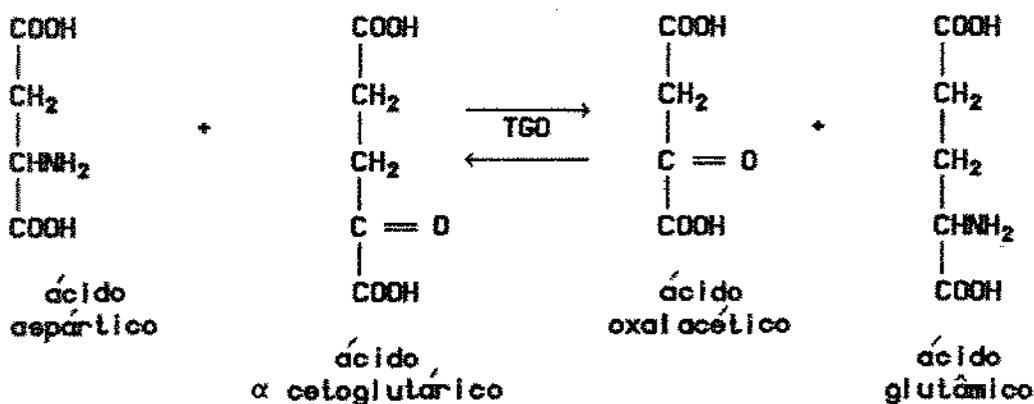
4.5.2. - FUNDAMENTOS DO MÉTODO

Os produtos formados nas reações catalizadas pelas enzimas TGO e TGP produzem uma coloração com 2,4 - dinitrofenilhidrazina em meio alcalino, cuja intensidade é proporcional à sua concentração.

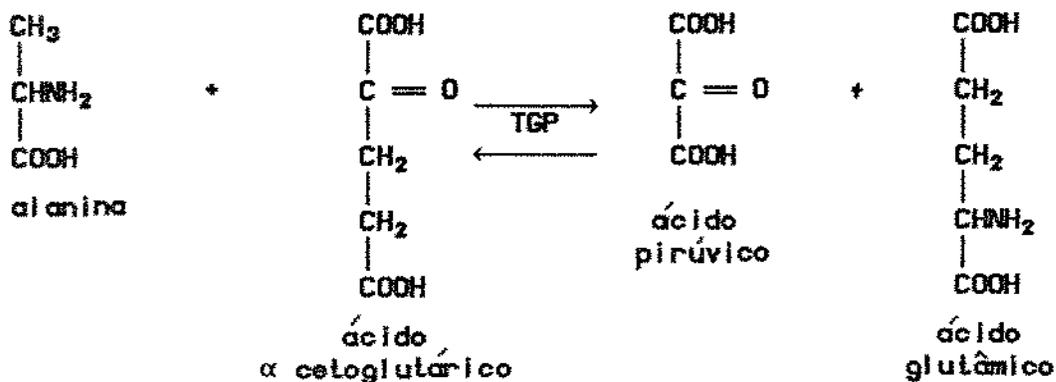
O método de doseamento consiste em apreciar a quantidade de ácido pirúvico ou ácido oxalacético obtida no curso da reação de transaminação, por intermédio da formação das correspondentes 2,4-dinitrofenilhidrazinas.

As transaminases (TGO e TGP) catalizam as seguintes reações:

reação TGO:



reação TGP:



4.5.3. - PROCEDIMENTO:

Para cada amostra de soro a examinar, foram preparados dois tubos de ensaio do seguinte modo:

- Um tubo foi rotulado com "O" para TGO e outro com "P" para TGP.

- Colocou-se 0,5 ml de substrato TGO (reativo 2) para o tubo "O", e 0,5 ml de substrato TGP (reativo 3) para o tubo "P".

- Os tubos foram incubados por 5 minutos em banho-maria a 37°C.

- Foram adicionados 0,2 ml da amostra para o tubo "O", e 0,1 ml da amostra para o tubo "P", misturou-se bem.

- Foram incubados em banho maria a 37°C por exatamente 30 minutos.

- Adicionou-se 5,0 ml de hidróxido de sódio 0,4 N a cada tubo e misturou-se bem.

Aguardou-se 5 minutos e as leituras fotométricas foram efetuadas em 505 nm em condições idênticas às utilizadas para o estabelecimento da curva de calibração (ver procedimento adiante).

Resultados:

Determinou-se com auxílio da Curva de Calibração, o número de unidades TGO e TGP por mililitro de soro.

Segundo a Comissão Internacional para Nomenclatura Bioquímica, uma Unidade Internacional (U) de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que consome 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de substrato, ou que produz 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de produto, sobre as condições do ensaio (temperatura, pH, substrato, tampão) ou análise (GOTZ, 1980).

Portanto, a atividade catalítica não é referida à quantidade ou ao peso da enzima, porque ainda não se pôde isolar puras um grande número delas. As atividades catalíticas nos líquidos biológicos são em geral referidas a 1 ml ou a 1 litro.

Por isso são expressas em mU/ml ou U/l, sendo numericamente idênticas, embora atualmente prefira-se a designação internacional U/l (KOSLOWSKI, 1991), tal como neste experimento.

4.5.4. - CURVA DE CALIBRAÇÃO

Preparou-se uma série de tubos de ensaio com os seguintes reativos e volumes (em ml):

Tubos	1	2	3	4	5	6
Água destilada	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reativo 2/3	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Reativo 1	---	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Reativo 4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Misturou-se e aguardou-se à temperatura ambiente por 20 minutos.						
Homogeneizou-se bem e aguardou-se por 5 min à temperatura ambiente. Fez-se a leitura.						
Unidades TGO	0	22	55	95	150	215
Unidades TGP	0	25	50	83	126	---

A partir desses dados estabeleceu-se a curva de calibração:

- em abcissa: lançou-se o número de unidades por mililitro.
- em ordenada: locou-se as correspondentes absorvâncias (papel milimetrado).

Para a realização dos doseamentos utilizou-se o aparelho Micronal Espectrofotômetro Digital B34211 sendo as leituras feitas no comprimento de onda de 505 nm. Zerou-se o aparelho com água destilada e deionizada.

4.6. - DROGAS UTILIZADAS

- 1 - diclofenaco potássico - injetável (Cataflam[®]), do Laboratório Biogalênica (produtos Ciba-Geigy).

- 2 - piroxicam - injetável (Feldene[®]), do Laboratório Pfizer.
- 3 - cloreto de sódio - Laboratório MERK
Solução preparada a 0,9%.

4.7. - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os valores obtidos foram submetidos a uma análise de variância e ao teste de Tukey ($p < 0,05$); teste t de Student ($p < 0,05$) bilateral para comparação entre início e final (VIEIRA, 1985).

V - SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA

V - SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA

Os 30 animais foram divididos em três grupos de dez. Foram colhidas amostras de sangue nos tempos de 0, 24, 48 horas, 7 e 14 dias, após a hepatectomia parcial, quando então a massa de fígado original está restaurada (BUCHER, 1963).

Cada grupo de 10 animais, recebeu as drogas abaixo discriminadas nas respectivas doses:

diclofenaco potássico (D)	1,5 mg/Kg/dia
piroxicam (P)	0,5 mg/Kg/dia
Solução de NaCl a 0,9% (C)	

5.1. - ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS

As drogas foram administradas intraperitonealmente (I.P.) durante todo o experimento. Foi feita uma aplicação diária, com exceção do diclofenaco que foi fracionado em duas vezes no dia. A primeira dose foi dada 30 minutos antes de se realizar a hepatectomia parcial, e a última dose imediatamente antes do sacrifício dos animais.

VI - RESULTADOS

VI - RESULTADOS

Os valores médios apresentados nas tabelas 01 (página 43) e 02 (página 44) foram calculados a partir dos resultados obtidos, que podem ser encontrados nos apêndices 02 a 11 (páginas 70 a 79).

Para compararmos os grupos D, P e C quanto ao TGO e TGP procedeu-se a análise de variância inteiramente ao acaso, ao nível de significância de 5%, nos tempos 0, 24, 48 horas, 7 e 14 dias.

TGO - Para acompanhar a análise a seguir, ver fig. 1 página 43:

Para o tempo "0", obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 02 pág.70. Como o valor de F é significativo ao nível de 5%, procedeu-se a comparação das médias dos grupos D, P e C, no tempo "0" apresentadas a seguir:

Média de TGO (U/l) no tempo "0" segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	85,620
P	69,600
C	69,840

Com a aplicação do teste de TUKEY ao nível de significância de 5%, obtivemos o seguinte resultado:

- O valor médio de TGO do grupo tratado com diclofenaco é significativamente maior que a média dos grupos piroxicam e controle no tempo "0" (d.m.s.=14,279).

Para o tempo 24 horas, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 03 pág. 71. Como o valor de F não é significativo, não houve efeito de grupos, isto é, não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos que estão apresentadas a seguir:

Média de TGO (U/l) no tempo 24 horas segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	300,480
P	244,800
C	176,640

Embora o diclofenaco se apresente 70,11% maior que o controle, estatisticamente não é significativo, observa-se uma certa tendência. O mesmo ocorre com o piroxicam, apresentando-se 38,59% maior que o controle, e o diclofenaco 22,74% maior que o piroxicam.

Para o tempo 48 horas, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 04 pág. 72. Como o valor de F foi significativo ao nível de 5%, procedeu-se a comparação das médias dos grupos D, P e C, no tempo 48 horas apresentadas a seguir:

Média de TGO (U/l) no tempo 48 horas segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	133,664
P	107,040
C	89,973

Com a aplicação do teste de TUKEY ao nível de significância de 5%, obtivemos o seguinte resultado:

- O valor médio de TGO do grupo tratado com diclofenaco é significativamente maior que a média do grupo controle no tempo 48 horas (d.m.s.=27,596).
- O valor médio de TGO do grupo tratado com piroxicam não é estatisticamente significativo em relação ao grupo controle no tempo 48 horas (d.m.s.=24,041).
- O valor médio de TGO do grupo diclofenaco não é estatisticamente significativo em relação ao piroxicam no tempo 48 horas (d.m.s.=28,206).

Para o tempo 7 dias, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 05 pág. 73. Como o valor de F não é significativo, não houve efeito de grupos, isto é, não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos que estão apresentadas a seguir:

Média de TGO (U/l) no tempo 7 dias segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	73,8511
P	83,040
C	80,800

Para o tempo 14 dias, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 06 pág. 74. Como o valor de F não é significativo, não houve efeito de grupos, isto é, não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos que estão apresentadas a seguir:

Média de TGO (U/l) no tempo 14 dias segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	128,340
P	87,936
C	88,032

Embora o diclofenaco se apresente 45,79% maior que o controle, estatisticamente não é significativo, observa-se somente uma certa tendência.

Para compararmos as médias de TGO, entre o início e final do experimento, entre cada grupo (apresentadas a seguir), aplicou-se o teste "t" de Student bilateral, ao nível de significância de 5% (fig 03, página 45).

Média de TGO (U/l) no início e final segundo o grupo:

GRUPO	INÍCIO	FINAL
D	85,620	128,340
P	69,600	87,936
C	69,840	88,032

Obteve-se os seguintes resultados:

- a) O valor médio de TGO do grupo diclofenaco no tempo 14 dias, é significativamente maior que a média no tempo "0" ($t=2,2131$).
- b) Embora o valor médio de TGO do grupo piroxicam no tempo 14 dias seja 26,34% maior que a média no tempo "0", estatisticamente não é significativa ($t=1,3688$), observa-se somente uma certa tendência. O mesmo ocorre com o grupo controle, isto é, estatisticamente não significativa ($t=1,5984$), que se apresenta no tempo 14 dias, 26,05% maior que o tempo "0".

TGP - Para acompanhar a análise feita a seguir, ver fig. 02, página 44:

Para o tempo "0", obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 07 pág. 75. Como o valor de F não é significativo, não houve efeito de grupos, isto é, não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos que estão apresentadas a seguir:

Média de TGP (U/l) no tempo "0" segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	25,227
P	23,088
C	20,304

Embora o diclofenaco se apresente 24,25% maior que o controle, estatisticamente não é significativa, observa-se somente uma certa tendência. O mesmo ocorre com o piroxicam, apresentando-se 13,11% maior em relação ao controle e o diclofenaco apresentando-se 9,26% maior em relação ao piroxicam.

Para o tempo 24 horas, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 08 pág. 76. Como o valor de F não é significativa, não houve efeito de grupos, isto é, não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos que estão apresentadas a seguir:

Média de TGP (U/l) no tempo 24 horas segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	173,333
P	175,240
C	120,000

Embora o diclofenaco se apresente 44,44% maior que o controle, estatisticamente não é significativa, observa-se somente uma certa tendência. O mesmo ocorre com o piroxicam, apresentando-se 46,03% maior em relação ao controle.

Para o tempo 48 horas, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 09 pág. 77. Como o valor de F é significativa ao nível de 5%, procedeu-se a comparação da médias dos grupos D, P e C, no tempo 48 horas apresentadas a seguir:

Média de TGP (U/l) no tempo 48 horas segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	91,200
P	51,467
C	45,264

Com a aplicação do teste de TUKEY ao nível de significância de 5%, obtivemos o seguintes resultados:

- a) O valor médio de TGP do grupo tratado com diclofenaco é significativamente maior que a média do grupo controle no tempo 48 horas (d.m.s.=31,146).
- b) O valor médio de TGP do grupo tratado com piroxicam não é estatisticamente significante em relação ao grupo controle no tempo 48 horas (d.m.s.=27,712).
- c) O valor médio de TGP do grupo diclofenaco é estatisticamente significante em relação ao piroxicam no tempo 48 horas (d.m.s.=31,788).

Para o tempo 7 dias, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 10 pág. 78. Como o valor de F não é significante, não houve efeito de grupos, isto é, não há diferença estatisticamente significante entre as médias dos grupos que estão apresentadas a seguir:

Média de TGP (U/l) no tempo 7 dias segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	22,880
P	26,400
C	22,453

Embora o piroxicam se apresente 17,58% maior que o controle, estatisticamente não é significante, observa-se somente uma certa tendência.

Para o tempo 14 dias, obtivemos a tabela de análise de variância que consta no apêndice 11 pág. 79. Como o valor de F é significante ao nível de 5%, procedeu-se a comparação da médias dos grupos D, P e C, no tempo 14 dias apresentadas a seguir:

Média de TGP (U/l) no tempo 14 dias segundo o grupo:

GRUPO	MÉDIA
D	33,000
P	27,888
C	24,624

Com a aplicação do teste de TUKEY ao nível de significância de 5%, obtivemos os seguintes resultados:

- a) O valor médio de TGP do grupo tratado com diclofenaco é significativamente maior que a média do grupo controle no tempo 14 dias (d.m.s.= 6,270).
- b) O valor médio de TGP do grupo tratado com piroxicam não é estatisticamente significativo em relação ao grupo controle no tempo 14 dias (d.m.s.= 5,911).
- c) O valor médio de TGP do grupo diclofenaco não é estatisticamente significativo em relação ao piroxicam no tempo 14 dias (d.m.s.=6,270).

Para compararmos as médias de TGP, entre o início e final do experimento, entre cada grupo (apresentadas a seguir), aplicou-se o teste "t" de Student bilateral, ao nível de significância de 5% (fig. 04, pág. 45).

Média de TGP (U/l) no início e final segundo o grupo:

GRUPO	INÍCIO	FINAL
D	25,227	33,000
P	23,088	27,888
C	20,304	24,624

Obteve-se os seguintes resultados:

- a) O valor médio de TGP do grupo diclofenaco no tempo tempo 14 dias, é significativamente maior que a média no tempo "0" ($t=3,5082$).

b) Embora o valor médio de TGP do grupo piroxicam no tempo 14 dias seja 20,79% maior que a média no tempo "0", estatisticamente não é significativa ($t=1,7833$), observa-se somente uma certa tendência. O mesmo ocorre com o grupo controle, isto é, estatisticamente não significativa ($t=2,058$), que se apresenta no tempo 14 dias, 21,28% maior que o tempo "0".

Tabela 01: Valores médios do doseamento da TGO (U/l) no soro sanguíneo, no tempo 0, 24, 48 horas, 7 e 14 dias, nos grupos D, P e C.

TGO (U/l)					
Intervalos de Tempo					
GRUPOS	0	24	48	7	14
DICLOFENACO	85,620	300,480	133,664	73,851	128,340
PIROXICAM	69,600	244,800	107,040	83,040	87,936
CONTROLE	69,840	176,640	89,973	80,800	88,032

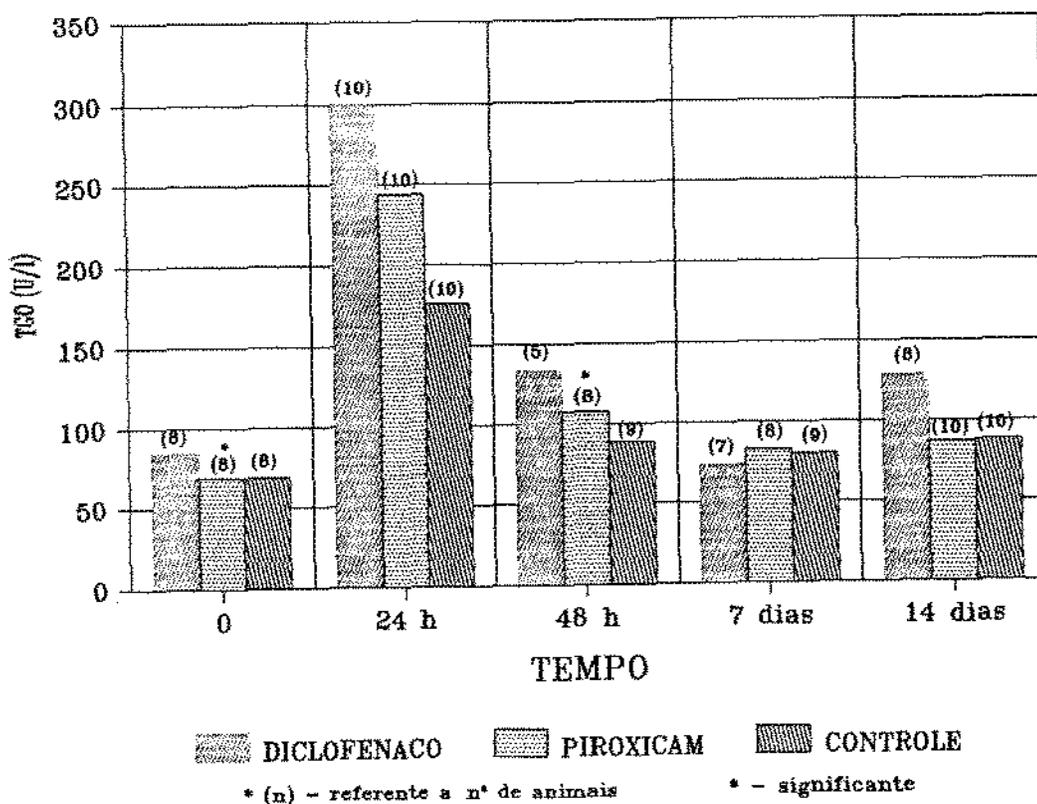


Fig. 01 - Representação gráfica dos valores médios de TGO (U/l) nos diferentes grupos experimentais, em função dos tempos de estudo.

Tabela 02: Valores médios do doseamento da TGP (U/l) no soro sanguíneo, no tempo 0, 24, 48 horas, 7 e 14 dias, nos grupos D, P e C.

TGP (U/l)					
Intervalos de Tempo					
GRUPOS	0	24	48	7	14
DICLOFENACO	25,227	173,333	91,200	22,880	33,000
PIROXICAM	23,088	175,240	51,467	26,400	27,888
CONTROLE	20,304	120,000	45,264	22,453	24,624

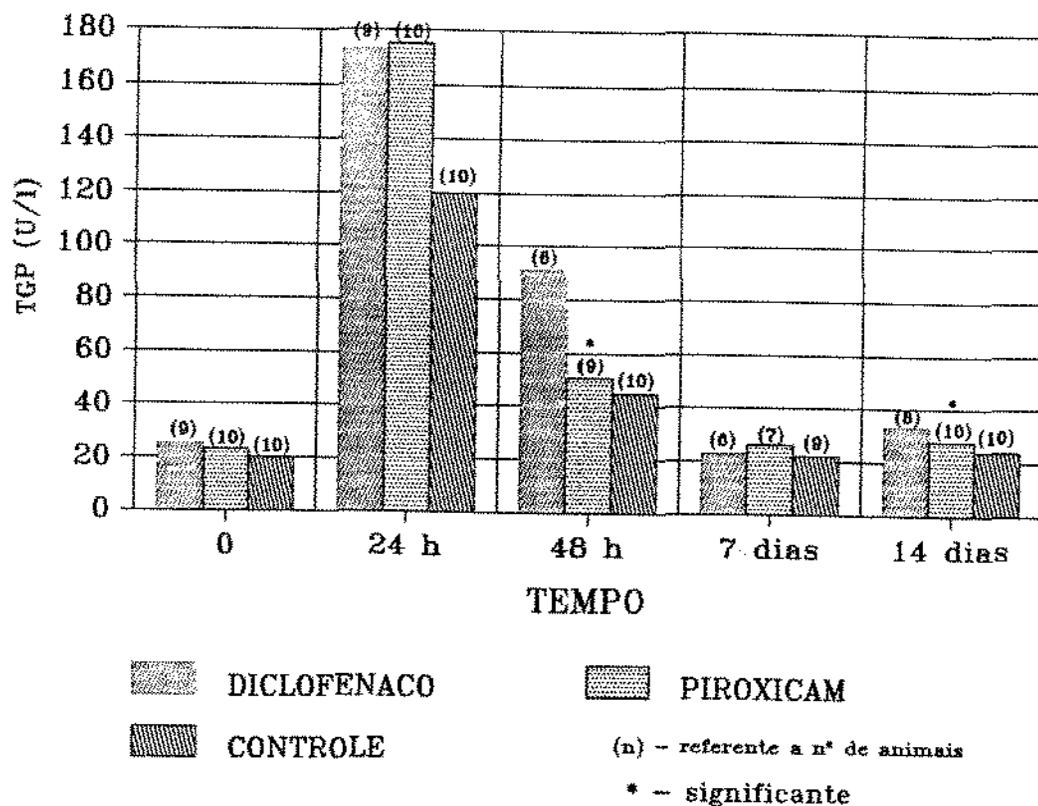
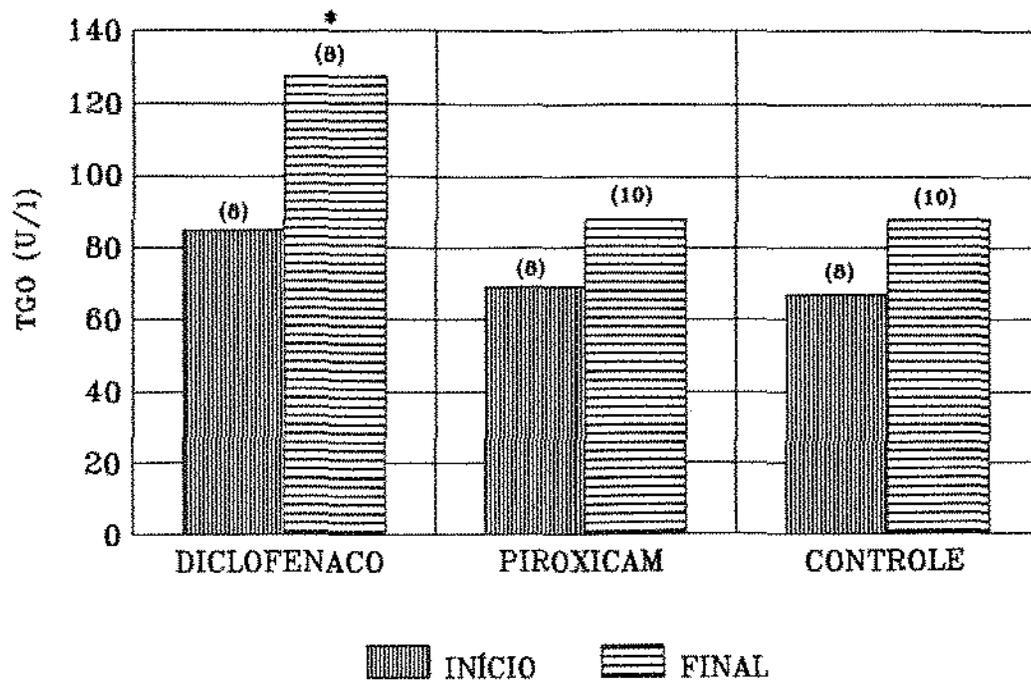


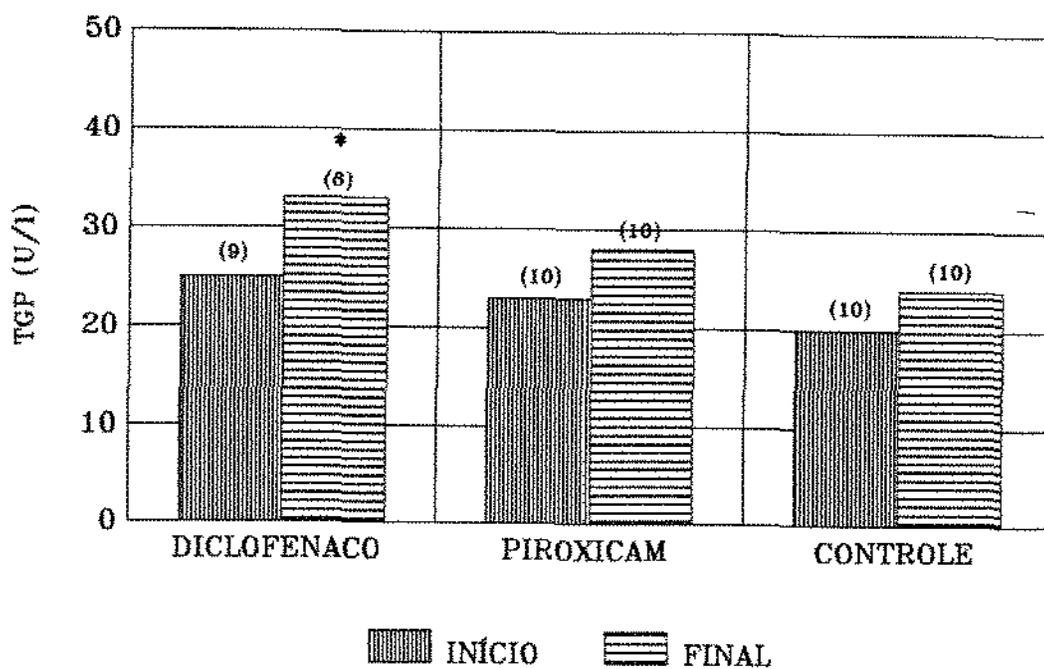
Fig. 02 - Representação gráfica dos valores médios de TGP (U/l) nos diferentes grupos experimentais, em função dos tempos de estudo.



(n) - referente a n° de animais

* - significante

Fig. 03 - Representação gráfica dos valores médios de TGO (U/l), no início e final do experimento nos diferentes grupos.



(n) - referente a n° de animais

* - significante

Fig. 04 - Representação gráfica dos valores médios de TGP (U/l), no início e final do experimento nos diferentes grupos.

VII - DISCUSSÃO

VII - DISCUSSÃO

Tem-se mostrado de grande valor clínico o doseamento de diversas enzimas no soro para fins de avaliação do grau de disfunção hepatocelular no decurso de doenças hepáticas. Baseia-se esse tipo de exame no conceito de que o achado no soro de teores anormalmente elevados de enzimas intracelulares significa existir alteração funcional ou orgânica das células que as contêm, o que permite fuga das enzimas e sua passagem para o meio circulante. O aparecimento de valores elevados das enzimas no soro, pode ser devido à alteração da permeabilidade da membrana celular, necrose celular e síntese (indução) com liberação aumentada das enzimas (SEKAS & COOK, 1979). Quanto mais grave for a lesão celular o comprometimento afetará de maneira progressiva, primeiro o citoplasma (TGO e TGP), depois as organelas (mitocôndrias-TGO) (CURTIS et alii, 1972), e por fim o núcleo (MILLER, 1984), fazendo aumentar progressivamente a quantidade de enzimas que passam da célula para o plasma. Pode-se dizer de maneira geral, que quanto mais elevados forem os níveis enzimáticos no soro, mais intensa será a lesão celular. Evidentemente, não se pode tentar inferir exatamente a extensão da lesão e sua reversibilidade a partir exclusivamente dos teores enzimáticos séricos, mas a repetição frequente desses exames é de valor inestimável no acompanhamento das lesões evolutivas (MILLER, 1984).

Os resultados da TGO para o tempo 0, mostraram que para o grupo tratado com piroxicam, não houve diferença na análise estatística, mas sim para o grupo tratado com diclofenaco quando comparado com o grupo controle como mostra a figura 1 (pág. 43).

Para o diclofenaco, esse resultado tem relação com casos registrados na literatura. O estudo de CICCOLUNGI et alii (1978) mostra que há aumento nos resultados dos testes para função hepática.

De 268 pacientes portadores de doenças reumáticas, em tratamento com diclofenaco, 38 apresentaram, aumento do nível sérico de enzimas, os autores atribuíram 9 casos ao uso da droga. DUNK et alii (1982) relatam um caso em que o paciente apresentou dois episódios de hepatite, sugerindo que a droga foi a responsável pela injúria do fígado. A presença de eosinófilos no infiltrado inflamatório da biópsia do fígado, favorece a etiologia para a droga, além de que o paciente não tinha sido exposto a nenhum fator de risco para hepatite não-A não-B. Além disso, a hepatite não-A não-B segue geralmente um curso crônico, e no referido caso o paciente apresentou os testes para função hepática, normais entre os dois episódios, os quais foram resolvidos rápida e totalmente depois que o tratamento com a droga foi suspenso.

BRENN et alii (1986) descrevem um caso de hepatite fulminante com diclofenaco. A análise do caso, mostrou que haviam três possibilidades: hepatite viral, intoxicação por indometacina ou por diclofenaco. Os testes para hepatite viral deram negativos, e o tratamento com indometacina não apresentou efeitos adversos ou sinais de hipersensibilidade. Portanto os autores concluíram que diclofenaco é o que pode ter causado a hepatite neste paciente. A moléstia do paciente em questão pode estar associada com sinais de reação de hipersensibilidade, mas o mecanismo não é claro. Os mesmos autores citam estudos de casos publicados de hepatite por diclofenaco: BABANY et alii, 1983; DESHAYES et alii, 1984; LASGAR et alii, 1984; BABANY et alii, 1985. Três autores sugerem o dano hepático desses casos, por metabólitos tóxicos, e um autor sugere mecanismo imunoalérgico. Esses comentários também justificam os resultados da TGO e TGP para o tempo 48 horas, e TGP para o tempo 14 dias com o diclofenaco, onde o grupo se mostra significativamente maior que o grupo controle. Observando a figura 01, verificamos que existe uma tendência ao aumento também para o TGO nesse período de tempo (14 dias), embora os resultados não tenham se mostrado estatisticamente significantes ao nível de 5%.

Três outros agentes do mesmo grupo do diclofenaco têm se mostrado hepatotóxicos. O ibufenac foi afastado do comércio devido ao frequente aumento das transaminases no soro de pacientes em tratamento; o uso do benoxaprofen foi afastado na Inglaterra depois da morte de dez pacientes com hepatite, e mais recentemente tem sido pesquisado um caso fatal de hepatite por piroprofen (BREEN et alii, 1986). Esse comentário vem de encontro com os resultados obtidos nesse trabalho, mesmo sabendo que os princípios ativos não são os mesmos, mas os mecanismos de ação das drogas do grupo são semelhantes.

Com relação ao piroxicam, a literatura mostra que existe risco de toxicidade hepática com o seu uso (LEE et alii, 1986; RAHMAN et alii, 1979). WOLFE (1986) comenta em seu trabalho, que o governo Canadense reduziu para 10 mg a dose da droga para pacientes com mais de 65 anos. Recomenda a utilização de 20 mg somente em casos de maior necessidade, e com acompanhamento mais cuidadoso, devido aos efeitos adversos gastrintestinais que, se houverem, podem produzir algum efeito hepatotóxico.

Nossos resultados não mostraram alteração de TGO e TGP quando se utilizou piroxicam. Entretanto devemos considerar que foram utilizados animais adultos jovens e a droga em doses terapêuticas diárias, apesar de que HOBBS & TWOMEY (1979) propõem que para o rato macho, a meia-vida plasmática do piroxicam é de 6 horas, enquanto que para o ser humano é por volta de 45 horas.

Para os intervalos de tempo de 24 horas e de 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos experimentais, tanto para o TGO como o TGP. Entretanto pode-se verificar uma tendência para o aumento do nível das enzimas nos grupos tratados com piroxicam e diclofenaco em relação ao controle, no tempo de 24 horas. Portanto, mesmo se considerando a questão já discutida da meia vida plasmática do piroxicam, é aceitável inferir que com doses maiores poderíamos ter alterações significativas.

Os resultados com relação ao grupo controle eram esperados, pois estão coerentes com o trabalho de SEKAS & COOK (1979) em que o pico para a TGO em ratos, ocorre em 24 horas após a hepatectomia parcial e, para o TGO e TGP, de acordo com KANASHIMA et alii (1983), isso também ocorre. ZIEVE et alii (1985) mostram o pico da TGP em 12 horas, resultado de acordo com CURTIS et alii (1972) que afirma que as enzimas citoplasmáticas aumentam no soro antes das enzimas presentes na mitocôndria (TGO), fato que não pudemos comprovar em nossos experimentos, por não termos feito avaliação no período de 12 horas.

Para o grupo piroxicam, no tempo 14 dias, não houve diferença significativa tanto para o TGO como para o TGP. Mas se analisarmos as figuras 01 (pág. 43) e 02 (pág. 44), verificamos que durante o experimento, o grupo mostra uma tendência para o aumento em relação ao grupo controle. Os trabalhos anteriormente citados, mostram dados de hepatotoxicidade em relação à essa droga. Os resultados entre os tempos final e inicial do grupo piroxicam, mostraram-se estatisticamente não significantes ao nível de 5 %, tanto para o TGO como para o TGP, como mostram as figuras 3 e 4 (pág. 45).

Com relação ao diclofenaco a média do tempo 14 dias para as transaminases, é significativamente maior que a do tempo zero, como mostram o figuras 03 e 04 (pág. 45). Esse resultado alterado do nível das transaminases, pode sugerir que o diclofenaco seja o responsável, pois segundo BUCHER (1963) e HIGGINS & ANDERSON (1931), a massa hepática deve estar restaurada por volta desse período de tempo e, conseqüentemente, a função do órgão restabelecida. A metabolização da droga também foi alterada durante a regeneração, devido à redução da massa hepática o que pode sugerir liberação aumentada das enzimas. Esses resultados estão coerentes com os casos relatados por DUNK et alii (1982), BREEN et alii (1986), CICCOLUNGI et alii (1978), já comentados anteriormente.

Com relação ao grupo controle, o teste estatístico comparando os níveis plasmáticos das enzimas no tempo zero com os do décimo quarto dia de regeneração, não foi significativo ao nível de 5%. Nos trabalhos da literatura os autores realizaram colheitas de sangue 6 horas (SEKAS & COOK, 1979; ZIEVE et alii, 1985), e 24 horas (KANASHIMA et alii, 1983) após a hepatectomia parcial, tendo os autores considerado os valores para o tempo zero aos 7 dias (ZIEVE et alii, 1985) e aos 14 dias (KANASHIMA et alii, 1983), quando os resultados apresentaram uma estabilização por eles considerada como valores normais.

O fato isolado do grupo diclofenaco ter se apresentado com elevações séricas das enzimas hepáticas TGO e TGP, não é indicador de que exista uma possível toxicidade hepática como resultado de sua administração. Entretanto, as doses utilizadas para este experimento, foram baseadas nas doses terapêuticas para o ser humano, e convertidas para o uso em ratos. Considerando que a grande maioria dos medicamentos disponíveis no comércio possui ampla margem de segurança, talvez se nesse trabalho fossem utilizadas doses maiores, mesmo que não tóxicas para ratos, poderíamos obter resultados estatisticamente significantes em todos os períodos após a hepatectomia parcial, inclusive para o grupo piroxicam.

Essa hipótese ganha maior respaldo quando se considera que o tecido hepático remanescente da cirurgia é teoricamente são, não estando afetado por processo inflamatório ou tecido de granulação (FAUSTO & MEAD, 1989). Contudo, em clínica odontológica se o paciente for portador de alguma patologia hepática ou mesmo tiver história relacionada a isso, mesmo em doses terapêuticas de diclofenaco poderemos ter alteração dos níveis enzimáticos pela própria deficiência hepática e também por aumento da toxicidade da droga que terá sua velocidade de metabolização diminuída, pois o trabalho de revisão de YOUNG (1975) mostra que tanto *in vitro* como *in vivo*, os medicamentos podem alterar as provas das transaminases.

Essas considerações são de fundamental importância para o uso de medicamentos antiinflamatórios em odontologia. Num período compreendido entre 1964 a 1973 foram relatados 10 vezes mais casos de lesão hepática relacionada com o uso de medicamentos, do que na década anterior (ROBBINS et alii 1986). Felizmente em odontologia os casos clínicos que se apresentam não requerem uso de medicamentos antiinflamatórios cronicamente, mas torna-se indispensável a realização de cuidadoso questionário de saúde geral dos pacientes, para que na eventualidade da necessidade do uso desses medicamentos haja a segurança de que não se está expondo o tecido hepático à injúria medicamentosa.

VIII - CONCLUSÕES

VIII - CONCLUSÕES

Nas condições experimentais em que foi realizado os resultados do presente trabalho nos permitiram concluir que:

1 - O grupo que recebeu diclofenaco apresentou aumento do nível plasmático da enzima TGO no tempo zero, quando comparado aos grupos piroxicam e controle.

2 - O grupo que recebeu diclofenaco apresentou aumento do nível plasmático das enzimas TGO e TGP no período de 48 horas após a hepatectomia parcial, quando comparado ao grupo controle.

3 - O grupo que recebeu diclofenaco apresentou aumento do nível plasmático da enzima TGP no período 48 horas após a hepatectomia parcial, quando comparado ao grupo piroxicam.

4 - O grupo que recebeu diclofenaco apresentou aumento do nível plasmático da enzima TGP no período de 14 dias após a hepatectomia parcial, quando comparado ao grupo controle.

5 - Os grupos que receberam diclofenaco e piroxicam não mostraram alteração de atividade das enzimas TGO e TGP nos períodos de 24 horas e 7 dias após a hepatectomia parcial;

6 - Os grupos que receberam diclofenaco e piroxicam não mostraram alterações de atividade plasmática da enzima TGP, no tempo zero, e da enzima TGO no período de 14 dias após a hepatectomia parcial.

IX - RESUMO

IX - RESUMO

O propósito do trabalho foi o de avaliar a influência da droga diclofenaco potássico (Cataflam®) e piroxicam (Feldene®), sobre o fígado de ratos em regeneração. A técnica de hepatectomia parcial realizada foi a descrita por HIGGINS & ANDERSSONS (1931). Para tanto, foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus* albinos, Wistar), machos, com 60 dias de idade, divididos em 3 grupos:

1º grupo (D) tratado com diclofenaco na dose de 1,5 mg/Kg/dia (I.P.); 2º grupo (P) tratado com piroxicam na dose de 0,5 mg/Kg/dia (I.P.); 3º grupo (C) controle que receberam NaCl 0,9% (I.P.). Foram medidas as quantidades de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) no soro sanguíneo, em intervalos de tempo 0, 24, 48 horas, 7 e 14 dias. Os resultados mostraram que o diclofenaco potássico aumentou o nível plasmático da TGO no tempo zero quando comparado aos grupos piroxicam e controle; TGO e TGP no tempo 48 horas quando comparado ao grupo controle; TGP no tempo 48 horas quando comparado ao grupo piroxicam; TGP no tempo 14 dias quando comparado ao grupo controle.

X - SUMMARY

X - SUMMARY

The purpose of this work was to evaluate the influence of potassium diclofenac (Cataflam[®]) and piroxicam (Feldene[®]) in rat liver regeneration. The methods for a 70% hepatectomy were the same as those described by HIGGINS and ANDERSON (1931). Thirty male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) sixty days old were distributed as follows: 1th Group (D) - treated with 1,5 mg/Kg/day diclofenac (I.P.); 2th Group (P) - treated with 0,5 mg/Kg/day piroxicam (I.P.); 3th Group (C) - control group with animals received NaCl 0,9% (I.P.).

The serum concentration of aspartate aminotransferase (TGO) and alanine aminotransferase (TGP) were measured in time intervals of zero, 24, 48 hours, 7 and 14 days.

The results showed that potassium diclofenac increased the plasma level of TGO in time zero in relation to piroxicam and control ($p < 0.05$); TGO and TGP in time 48 hours in relation to control ($p < 0.05$); TGP in time 48 hours in relation to piroxicam ($p < 0,05$); TGP in time 14 days in relation to control ($p < 0,05$).

XI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

XI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BABANY, G.; BERNAU, J.; DANAN, G.; RUEFF, B.; BENHAMOU, J.P. Fulminating hepatites in a woman taking glafenine and diclofenac. Gastroent. clin. Biol., 9(2): 185, 1985.
- 2 - BABANY, G.; PESSAYRE, D.; BENHAMOU, J.P. Hepatites caused by diclofenac. Gastroent. clin. Biol., 7: 316, 1983. Apud: BREEN, E.G. et alii. Fatal hepatites associated with diclofenac. Gut, 27: 1390-3, 1986.
- 3 - BENGMARK, S.; OLSON, R.; REHNSTRÖM, B. Late changes after partial hepatectomy in the normal rat. Scand. J. Gastroent., 3: 525-8, 1968.
- 4 - BIANCHI, L. et alii. Guidelines for diagnosis of therapeutic drug induced liver injury in liver biopsies. Lancet, 4: 854-7, 1974.
- 5 - BIOLAB. Bioquímica clínica-enzimas: transaminases. s.L.p., 1991.
- 6 - BREEN, E.G.; McNICHOLL, J.; COSGROVE, E.; MACCABE, J.; STEVENS, F.M. Fatal hepatitis associated with diclofenac. Gut, 27: 1390-3, 1986.
- 7 - BUCHER, N.L.R. Regeneration of mammalian liver. Int. Rev. Cytol., 15: 245-300, 1963.
- 8 - _____ & WANDS, J.R. Hormone cocktails to stimulate hepatocytes. New Engl. J. Med., 296: 946, 1977.
- 9 - CATAFLAM injetável (diclofenaco potássico) dores agudas. s.L.p.: Biogalênica; Ciba-Geigy, s.d. 27 p.

- 10 - CICCOLUNGI, S.N.; CHAUDRI, H.A.; SCHUBIGER, B.I.; REDDROP, R. Report on a long-term tolerability study of up to two years with diclofenac sodium (Voltaren). Scand. J. Rheumatol., 22(Suppl.): 86-96, 1978.
- 11 - CURTIS, S.J.; MORITZM.; SNODGRASS, P.J. Serum enzymes derived from liver cell fractions. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroenterology, 62(1): 84-92, 1972.
- 12 - DESHAYES P.; LELOET, X.; BERCOFF, E.; FOUIN-FORTUNET, H. Diclofenac hepatitis. Presse méd., 13: 1847, 1984.
- 13 - DUGUAY, L.; COUTU, D.; HETU, C.; JOLY, J.G. Inhibition of liver regeneration by chronic alcohol administration. Gut, 23(1): 8-13, 1982.
- 14 - DUNK, A.A.; WALT, R.P.; JENKINS, W.J.; SHERLOCK, S.S. Diclofenac hepatitis. Br. med., 284(6329): 1605-6, 1982.
- 15 - FAUSTO, N. New perspectives on liver regeneration. Hepatology, 6(2): 326-7, 1986.
- 16 - _____ & MEAD, J.E. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. Lab. Invest., 60(1): 4-13, 1989.
- 17 - FELDENE (piroxicam): cápsulas, supositórios. s.L.p.: Pfizer, 1985. 65p.
- 18 - GOTZ, W. Diagnostico de las hepatopatias. Darmstadt, Git Verlag, 1980. 64p.
- 19 - GRISHAM, J.W. A morphologic study of desoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine H³. Cancer Res., 22: 842-9, 1962.

- 20 - GUYTON, A.C. Tratado de fisiologia médica., 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1986., 926p.
- 21 - HADDAD, P.C. Estudo da regeneração ponderal e funcional de fígado de ratos, parcialmente hepatectomizados, submetidos a tratamento com papaína. Piracicaba, 1990. 74p. [Tese (mestrado) - FOP-UNICAMP].
- 22 - HIGGINS, G.M. & ANDERSON, R.M. Experimental pathology of the liver. 1. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Archs Path., 12: 186-202, 1931.
- 23 - HIYAMA, Y.; MAHMUD, I.; KARIMI-TARI, F.; FUJITA, S.; FUKUI, N.; MIURA, Y. Platelet-derived growth factor and thromboxane are necessary for liver regeneration. Cell. molec Biol., 27(6): 593-9, 1981.
- 24 - HOBBS, D.C. & TWOMEY, T.M. Piroxicam pharmacokinetics in man: aspirin and antacid interaction studies. J. clin. Pharmac., 19: 270-81, 1979.
- 25 - KANASHIMA, R.; NAGASUE, N.; FURUSAWA, M.; INOKUCHI, K. Inhibitory effect of cimetidine on liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats. Am. J. Surg., 146: 293-8, 1983.
- 26 - KANZAKI, Y.; MAHMUD, I.; ASANAGI, M.; FUKUI, N.; MIURA, Y. Thromboxane as possible trigger of liver regeneration. Cell. molec. Biol., 25(2): 147-52, 1979.
- 27 - KATO, H. & SHIMAZU, T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. Eur. J. Biochem., 134: 473-8, 1983.

- 28 - KOZLOWSKI, V.A.J. Efeito de antagonistas de receptores H₁ e H₂, sobre a γ -glutamilttransferase, no soro de ratos parcialmente hepatectomizados. Piracicaba, 1991. 90p. [Tese (Mestrado) - FOP - UNICAMP.
- 29 - KU, E.C., LEE, W.; KOTHARI, H.V.; SCHOLER, D.W. Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. Am. J. Med., 80(Suppl. 4B): 18-23, 1986.
- 30 - LABRECQUE, D.R. & PESCH, L.A. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver. J. Physiol. Lond., 248: 273-84, 1975.
- 31 - _____; STEELE, G.; FOGERTY, S.; WILSON, M.; BARTON, J. Purification and physical-chemical characterization of hepatic stimulator substance. Hepatology, 7: 100, 1987.
- 32 - LASGAR, G.; GRIPPON, P.; LEVY, V.G. Acute fatal hepatitis during treatment with diclofenac. Gastroent. clin. Biol., 8: 881-2, 1984. Apud: BREEN et alii. Fatal hepatitis asociated with diclofenac. Gut, 27: 1390-3, 1986.
- 33 - LATNER, A.L. Cantarow and trumper clinical biochemistry. W.B. Saunders Co., Filadelfia, 7.ed., 1975. Apud: OLIVEIRA LIMA, A. et alii. Métodos de laboratório aplicados à clinica. 6.ed. Rio de janeiro, Guanabara Koogan, 1985. 669p.
- 34 - LEE, S.M.; O'BRIEN, C.J.; WILLIAMS, R.; WHITAKER, S.; GOULD, S.R. Subacute hepatic necrosis induced by piroxicam. Br. med. J., 293: 540-1, 1986.
- 35 - LEFFERT, H.L. & KOCH, K.S. Ionic events at the membrane initiate rat liver regeneration. Ann N.Y. Acad. Sci., 201-15, 1980.

- 36 - LUDWIG, J. & AXELSEN, R. Drug effects on the liver. An updated tabular compilation of drugs and drug-related hepatic diseases. Dig. Dis. Sci., 28(7): 651-60, 1983.
- 37 - MACMAHON, J.B.; SHIBLEY, L.M.; IYPE, P.T. Distribution and subcellular localization of a hepatic proliferation inhibition in rat liver. J. Biol. Chem., 259: 1803-6, 1984.
- 38 - MATTOS FILHO, T.R. Influência da hepatectomia parcial no tempo de sono pelo metohexital, em ratos. Piracicaba, 1976. 56p. [Tese (Mestrado)-FOP-UNICAMP].
- 39 - MILLER, O. Laboratório para o clínico. 5. ed. Rio de Janeiro, Atheneu, 1984. 549p.
- 40 - MIURA, Y. & FUKUI, N. Prostaglandins as possible triggers for liver regeneration after partial hepatectomy. A review. Cell. molec. Biol., 25(3): 179-84, 1979.
- 41 - MOOLTEN F.L. & BUCHER, N.L.R. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. Science, 158: 272-4, 1967., 1967.
- 42 - MORLEY, C.G.D. & KINGDON, H.S. The regulation of cell growth. 1- identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulated factor from the serum of partially hepatectomized rats. Biochem. biophys. Acta, 308: 260-75, 1973.
- 43 - _____, & ROYSE, V.L. Adrenergic agents as possible regulators of liver regeneration. Int. J. Biochem., 13(9): 969-73, 1981.

- 44 - MURRAY, A.B.; STRECKER, W.; SILZ, S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. J. Cell Sci., 50: 433-48, 1981.
- 45 - NAKAMURA, N.; TERAMOTO, H.; ICHIHARA, A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 83: 6489, 1986.
- 46 - NORRIS, J.L.; BLANCHARD, J.; POVOLNY, C. Regeneration of rat liver at different ages. Archs Path., 34(1): 208-17, 1942.
- 47 - OLIVEIRA LIMA, A.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZI, J.; CANÇADO, J.R. Métodos de laboratório aplicados à clinica. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985. 669p.
- 48 - PÖSÖ, H. & PÖSÖ, A.R. Inhibition of RNA and protein synthesis by sthanol in regeneration rat liver: evidence for transcriptional inhibition of protein synthesis. Acta Pharmac. Toxicol., 49(2): 125-9, 1981.
- 49 - RAHMAN, M.; AGUDELO, C.; TURNER, R.; PISKO, E. Long-term efficacy and safety of piroxicam in the treatment of rheumatoid arthritis. Clin. Pharmac. Ther., 25(2): 243, 1979.
- 50 - RICHMAN, R.A.; CLAUS, T.H.; PILKIS, S.J.; FRIEDMAN, D.L. Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 73: 3589-93, 1976.
- 51 - RIXON, R.H. & WHITFIELD J.F. An early mitosis-determining event in regenerating rat liver and its possible mediation by prostaglandins or tromboxane. J. Cell. Physiol., 113(2): 281-8, 1982.

- 52 - ROBBINS, S.L.; COTRAM, R.S.; KUMAR, V. Patologia estrutural e funcional. 3.ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 1986. 1404 p.
- 53 - SCHOLER, D.W.; KU, E.C.; BOETTCHER, I.; SCHWEIZER, A. Pharmacology of diclofenac sodium. Am. J. Med., 80 (Suppl. 4B): 34-8, 1986.
- 54 - SEKAS, G. & COOK, R.T. The evolution of liver function after partial hepatectomy in the rat: serum changes. Br. J. exp. Path., 60(5): 447-52, 1979.
- 55 - SHORT, J. BROWN, R.F.; HUSAKOVA, A.; GILBERTSON, J.R.; ZEMEL, R.; LIEBERMAN, I. Induction of DNA synthesis in the liver of the intact animal. J. biol. Chem., 147: 1757, 1972.
- 56 - _____; ZEMEL, R.; KANTA, J.; LIEBERMAN, I. Stimulation of desoxyribonucleic acid synthesis in the liver parenchymal cell of the intact rat. Nature, Lond., 223: 956-7, 1969.
- 57 - SOBCZAK, J. & DUDGUET, M. Molecular biology of liver regeneration. Biochimie, 68(7-8): 957-67, 1986.
- 58 - TARSIO, J.F. & HALDAR, D. Regulation of protein synthesis in isolated mitochondria from regenerating rat liver. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 174(3): 415-20, 1983.
- 59 - THALER, F.J. & MICHALOPOULOS, G.K. Hepatopoetin A: a partial characterization and trypsin activation of a hepatocyte growth factor. Cancer Res., 45: 2545, 1985.
- 60 - VIEIRA, S. Introdução à bioestatística. 3.ed. Rio de Janeiro, campus, 1985. 294p.
- 61 - WOLFE, S.M. Safety of piroxicam: letter. Lancet, 2(8510): 808-9, 1986.

- 62 - YOUNG, D.S. u.M.: Clin. Chem. 21(1975), 1D-432D. Apud:
Gotz, W. Diagnóstico de las hepatopatias. Darmstadt,
Git Verlag, 1980. 64p.
- 63 - ZIEVE, L.; ANDERSON, R.W.; LINDBLAD, S. Course of hepatic
regeneration after 80% to 90% resection of normal rat
liver. Comparison whith two-lobe and one-lobe
hepatectomy. J. Lab. clin. Med., 105(3): 331-6, 1985.

APÉNDICE

APÊNDICE

Apêndice 01: Composição básica da ração utilizada.

Milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicalcico, sal, pre-mix.

Eventuais substitutivos:

Farelo de mandioca, farelo de arroz solvente, feno de alfafa, gordura vegetal, farinha de peixe, farinha de sangue, farinha de ossos, quirera de arroz, farelo de gluten de milho.

Enriquecimento por quilograma de produto:

Vitamina A - 20.000 UI, vitaminha D₃ - 6.600 UI, vitamina E - 30 UI, vitamina K - 6 mg, vitaminha B₁₂ - 10 µg, vitamina B₂ - 8 mg, pantotenato de cálcio - 24 mg, niacina - 95 mg, tiamina - 4 mg, colina - 2.000 mg, pirodoxina - 6 mg, biotina - 0,1 mg, ácido fólico - 0,5 mg, manganês - 50 mg, iodo - 2 mg, ferro - 65 mg, zinco - 35 mg, cobre - 26 mg, antioxidante - 100 mg.

Níveis de garantia:

Umidade	(máximo)	13,0%
Proteína	(mínimo)	23,0%
Extrato etéreo	(mínimo)	2,5%
Matéria fibrosa	(máximo)	9,0%
Matéria mineral	(máximo)	8,0%
Cálcio (Ca)	(máximo)	1,8%
Fósforo (P)	(mínimo)	0,8%

Apêndice 02: Valores do doseamento de TGO (U/l) no soro de ratos no tempo zero, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	91,2	79,20	67,68
	91,2	80,16	63,36
	79,2	96,48	62,4
	99,84	52,8	91,2
	82,08	61,92	62,4
	84,48	60,0	78,72
	81,6	66,24	72,96
	75,36	60,0	60,0
\bar{x}	85,620	69,600	69,840
s	7,9369	14,4570	10,6839

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	1348,550	674,275	5,238*
RESÍDUO	21	2703,024	128,715	
TOTAL	23	4051,574		

* - Significante ao nível de 5%.

Apêndice 03: Valores do doseamento de TGO (U/l) no soro de ratos no tempo 24 horas, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	268,8	220,8	211,2
	163,2	211,2	115,2
	264,0	172,8	211,2
	249,6	297,6	158,4
	158,4	350,4	192,0
	580,8	134,4	172,8
	283,2	321,6	264,0
	144,0	235,2	144,0
	288,0	153,6	182,4
	604,8	350,4	115,2
\bar{x}	300,480	244,800	176,640
s	163,3286	80,6057	46,2508

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	76941,312	38470,656	3,268 n.s.
RESÍDUO	27	317813,760	11770,880	
TOTAL	29	394755,072		

n.s. - Não significante ao nível de 5%.

Apêndice 04: Valores do doseamento de TGO (U/l) no soro de ratos no tempo 48 horas, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	158,4	139,2	100,8
	102,72	96,48	72,48
	115,2	92,16	100,32
	120	129,6	96,0
	172,8	103,2	96,0
		103,2	98,4
		86,88	79,2
		105,6	98,4
			68,16
\bar{x}	133,664	107,040	89,973
s	29,8608	18,1822	12,9269

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	6146,562	3073,281	8,090 *
RESÍDUO	19	7217,644	379,876	
TOTAL	21	13364,205		

* - Significante ao nível de 5%.

Apêndice 05: Valores do doseamento de TGO (U/l) no soro de ratos no tempo 7 dias, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	139,2	85,92	103,2
	78,72	139,2	91,2
	51,84	96,0	80,16
	85,44	70,08	91,2
	62,4	46,56	65,28
	68,16	85,44	68,16
	31,2	52,32	67,68
		88,80	83,52
			76,80
\bar{x}	73,851	83,040	80,800
s	33,9009	28,8137	12,8192

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	338,798	169,399	0,254 n.s.
RESÍDUO	21	14021,880	667,709	
TOTAL	23	14360,678		

n.s. - Não significativa ao nível de 5%.

Apêndice 06: Valores do doseamento de TGO (U/l) no soro de ratos no tempo 14 dias, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	206,4	76,8	124,8
	168,0	81,2	115,2
	153,6	148,8	115,2
	172,8	129,6	110,4
	110,4	134,4	110,4
	62,4	61,44	52,32
	69,12	68,16	66,24
	84,0	62,88	56,16
		57,6	84,0
		58,08	45,6
\bar{x}	128,340	87,936	88,032
s	54,0159	35,4275	30,5715

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	9306,378	4653,185	2,899 ns
RESÍDUO	25	40131,496	1605,259	
TOTAL	27	49437,874		

n.s. - Não significante ao nível de 5%.

Apêndice 07: Valores do doseamento de TGP (U/l) no soro de ratos no tempo zero, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	22,56	19,2	17,28
	21,6	17,28	16,8
	18,72	20,16	12,96
	23,52	17,28	12,48
	24,0	24,48	15,36
	28,8	26,4	24,96
	26,4	23,04	22,08
	28,8	26,88	29,76
	32,64	27,36	26,4
		28,8	24,96
\bar{x}	25,227	23,088	20,304
s	4,3141	4,3374	6,0928

Análise de variância inteiramente ao acaso.

	CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO		2	116,126	58,063	2,314ns
RESÍDUO		26	652,314	25,089	
TOTAL		28	768,440		

n.s. - Não significante ao nível de 5%.

Apêndice 08: Valores do doseamento de TGP (U/l) no soro de ratos no tempo 24 horas, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	172,8	129,6	124,8
	105,6	124,8	96,0
	168,0	110,8	76,8
	153,6	86,4	72,0
	110,4	187,2	124,8
	235,2	81,6	211,2
	220,8	312,0	196,8
	153,6	115,2	115,2
	240,0	96	81,6
		508,8	100,8
\bar{x}	173,333	175,240	120,000
s	49,8510	135,5782	48,1597

Análise de variância interiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	19361,136	9680,568	1,221 ns
RESÍDUO	26	206188,304	7930,319	
TOTAL	28	225549,440		

n.s. - Não significante ao nível de 5%.

Apêndice 09: Valores do doseamento de TGP (U/l) no soro de ratos no tempo 48 horas, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	93,6	45,12	52,8
	62,4	59,52	24,96
	86,4	45,6	100,8
	76,8	41,28	26,88
	64,8	76,8	32,64
	163,2	36,96	54,24
		45,6	47,52
		45,12	33,6
		67,2	39,84
			39,36
\bar{x}	91,200	51,467	45,264
s	37,2735	13,3125	21,9510

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	8612,855	4306,428	7,459 *
RESÍDUO	22	12700,951	577,316	
TOTAL	24	21313,806		

* - Significante ao nível de 5%.

Apêndice 10: Valores do doseamento de TGP (U/l) no soro de ratos no tempo 7 dias, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	20,16	17,76	18,24
	33,6	33,12	22,56
	17,76	25,44	14,88
	18,24	24,0	19,68
	22,56	26,40	23,04
	24,96	31,20	18,72
		26,88	26,40
			32,64
			25,92
\bar{x}	22,880	26,400	22,453
s	5,9074	4,9960	5,3439

Análise de variância interiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	68,706	34,353	1,181 ns
RESÍDUO	19	552,704	29,089	
TOTAL	21	621,410		

n.s. - Não significante ao nível de 5%.

Apêndice 11: Valores do doseamento de TGP (U/l) no soro de ratos no tempo 14 dias, após a hepatectomia parcial, nos grupos D, P e C.

GRUPOS			
	D	P	C
	34,08	25,92	26,88
	39,84	20,16	24,0
	31,2	41,76	23,04
	40,8	32,16	26,4
	29,28	28,8	24,48
	28,32	30,24	24,96
	30,24	15,36	26,88
	30,24	24,96	18,24
		25,92	25,44
		33,60	25,92
\bar{x}	33,000	27,888	24,624
s	4,8256	7,3232	2,5705

Análise de variância inteiramente ao acaso.

CV	GL	SQ	QM	F
GRUPO	2	313,163	156,581	5,551 *
RESÍDUO	25	705,139	28,206	
TOTAL	27	1018,302		

* - Significante ao nível de 5%.