

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

PATRÍCIA MEDEIROS DE SOUZA PENA BARBOSA

Farmacêutica

**EFEITOS DO METRONIDAZOL SOBRE A ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA ALT (alanina aminotransferase) e
AST (aspartato aminotransferase) , EM RATOS.**

Orientador : Prof. Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Farmacologia

**PIRACICABA-SP
1997**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

*Este exemplar foi
devidamente corrigido
com as alterações
realizadas em 14 de abril de 1997.
Muda*

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| UNIDADE | BC |
| N.º CHAMADA: | T/UNICAMP |
| | B 234e |
| V. | EL |
| TIPO DE EL | 30687 |
| PROC. | 281/97 |
| C | <input type="checkbox"/> |
| O | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 11,00 |
| DATA | 23/05/97 |
| N.º CPD | C.M.00099422-4 |

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

| | |
|-------|---|
| B234e | <p>Barbosa, Patrícia Medeiros de Souza Pena.</p> <p>Efeitos do metronidazol sobre a atividade enzimática da ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), em ratos / Patrícia Medeiros de Souza Pena Barbosa. - Piracicaba : [s.n.], 1997.</p> <p>42f. : il.</p> <p>Orientador : Eduardo Dias de Andrade.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Agentes antibacterianos. 2. Imidazóis. 3. Toxicidade.</p> <p>I. Andrade, Eduardo Dias de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">19.CDD - 574.192 46 - 547.593 - 615.9</p> |
|-------|---|

Índices para o Catálogo Sistemático

| | |
|----------------------------|------------|
| 1. Agentes antibacterianos | 574.192 46 |
| 2. Imidazóis | 547.593 |
| 3. Toxicidade | 615.9 |

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

PATRÍCIA MEDEIROS DE SOUZA PENA BARBOSA
Farmacêutica

**EFEITOS DO METRONIDAZOL SOBRE A ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA ALT (alanina aminotransferase) e
AST (aspartato aminotransferase) , EM RATOS.**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em Ciências - Área
de Farmacologia**

**PIRACICABA-SP
1997**

B234e

30687/BC



UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão pública realizada em 14/03/96, considerou o candidato aprovado.

1. Eduardo Dias de Andrade

2. Thales Rocha de Mattos Filho

3. Thomaz Wassal

4. Francisco José de Souza Filho

5. Iria Marisa Gevartosky do Amaral

Aos meus pais OVIDIO e JULIETA
pela sua doação inesgotável de amor,

Ao meu filho JOÃO PEDRO
que fez tudo valer a pena,

Ao meu marido RODRIGO pelo companheirismo,
dedicação, amizade e compreensão na elaboração
deste trabalho.

... ofereço este trabalho

Ao amigo **Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade**, orientador
desta tese, pela paciência e contribuição constante

... o meu reconhecimento

**Ao Dr. César Antônio Biazio Sanchez, pela amizade e ajuda
espontânea na realização deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

À Unicamp, na pessoa de seu reitor Prof. Dr. **José Martins Filho**, pelo que tem feito em prol do ensino e da pesquisa;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. **José Ranali**, pela competência com que norteia a direção desta Escola;

Ao Prof. Dr. **Mário Fernando de Góes**, D.D. Coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, pelo enriquecimento da pós-graduação;

Ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, Coordenador do CPG em Odontologia - Área de Farmacologia, pela constante luta em prol do departamento;

Aos **Docentes do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia**, pela presteza em ensinar;

Ao Prof. Dr. **Thales Rocha de Mattos Filho**, pela amizade, apoio espontâneo e sorriso acolhedor;

Ao Prof. Dr. **Celso Paulino da Costa**, pela disponibilidade, ajudando a esclarecer pontos estratégicos da tese;

Ao Prof. Dr. **Mário Roberto Vizioli**, pela amizade e análise dos cortes histológicos;

Ao Prof. Dr. **Paulo César Haddad**, pelos ensinamentos transmitidos e coração aberto;

Ao Prof. Dr. **Francisco Carlos Groppo**, pela ajuda na confecção dos gráficos e tabelas e pela análise estatística dos resultados;

À Sra. **Sueli Duarte de Oliveira Soliani**, diretora técnica da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela correção das referências bibliográficas;

Aos Srs. **Ademir Mariano** e **José Carlos Gregório**, técnicos do laboratório de Farmacologia, pelo auxílio no cuidado e manejo dos animais utilizados nesta pesquisa;

À Sra. **Ana Maria Cossa de Arruda Oliveira**, secretária do CPG, pela sua amizade e serviços prestados;

À amiga **Silvana Henriques de Aquino**, pelo coração acolhedor, pelo privilégio de tê-la como amiga e pelo zeloso trabalho de digitação;

À Srta. **Maria Elisa dos Santos**, secretária da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, cuja amizade verdadeira se faz presente em toda minha vida;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio a esta pesquisa;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| 1. Listas | 1 |
| 1.1. Lista de figuras e tabelas | 1 |
| 1.2. Lista de siglas e abreviaturas | 3 |
| 2. Resumo | 4 |
| 3. Introdução | 5 |
| 4. Revista da literatura | 8 |
| 5. Proposição | 12 |
| 6. Material e Método | 13 |
| 6.1. <i>Animais</i> | 13 |
| 6.2. <i>Grupos experimentais e drogas</i> | 13 |
| 6.3. <i>Tratamentos</i> | 13 |
| 6.4. <i>Técnica de colheita das amostras de sangue</i> | 13 |
| 6.5. <i>Método de determinação da atividade sérica da ALT e AST</i> | 14 |
| 6.6. <i>Método de análise histológica</i> | 14 |
| 6.7. <i>Método de análise estatística</i> | 15 |
| 7. Resultados | 16 |
| 7.1. <i>Atividade sérica da enzima ALT</i> | 16 |
| 7.2. <i>Atividade sérica da enzima AST</i> | 19 |
| 7.3. <i>Atividade sérica da ALT e AST após a retirada da droga</i> | 22 |
| 7.4. <i>Análise histológica do tecido hepático</i> | 25 |
| 8. Discussão | 27 |
| 9. Conclusões | 33 |
| 10. Apêndice | 34 |
| 11. Summary | 37 |
| 12. Referências Bibliográficas | 38 |

1. LISTAS

1.1. LISTA DE FIGURAS E TABELAS

página

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Estrutura química do metronidazol. | |
| 8 | |
| Figura 2. Etapas do mecanismo de ação do metronidazol sobre os microorganismos anaeróbios. | 9 |
| Figura 3. Representação gráfica dos valores médios da atividade sérica da ALT, de acordo com o tratamento e tempo de avaliação. | 18 |
| Figura 4. Representação gráfica dos valores médios da atividade sérica da AST, de acordo com o tratamento e tempo de estudo. | 21 |
| Figura 5. Representação gráfica dos valores médios da atividade sérica da ALT e AST, de acordo com o tratamento no tempo de 96 h de estudo e após a retirada da droga. | 24 |
| Figura 6. Fotomicrografia de parte de um fígado de animais tratados com metronidazol 30 mg/Kg. | 25 |
| Figura 7. Fotomicrografia ampliada de parte de um lóbulo hepático da mesma amostra da Figura 6. | 26 |
| Tabela 1. Valores médios da atividade sérica da ALT (U/L), erro padrão da média, em função do tratamento e do tempo de avaliação. | 16 |
| Tabela 1.1. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 5, do Apêndice, no tempo de 48 h após o início do tratamento. | 16 |
| Tabela 1.2. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 5, do Apêndice, no tempo de 72 h após o início do tratamento. | 17 |
| Tabela 1.3. Análise de variância relativa aos dados da Tabela 5, do Apêndice, no tempo de 96 h após o início de tratamento | 17 |
| Tabela 2. Valores médios da atividade sérica da AST(U/L), erro padrão da média, em função do tratamento e do tempo de avaliação | 19 |
| Tabela 2.1. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 6, do Apêndice, no tempo de 48 h. | 19 |

| | |
|--|------------|
| Tabela 2.2. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 6, do Apêndice, no tempo de 72 h. | 20 |
| Tabela 2.3. Análise da variância, relativa aos dados da Tabela 6, do Apêndice, no tempo de 96 h. | 20 |
| Tabela 3. Valores médios da atividade sérica das enzimas ALT e AST (U/L) e o erro padrão da média, do grupo de animais tratados com salina(controle) e com metronidazol 30mg/Kg, por 96 h e 4 dias após a retirada do antimicrobiano. | 22 |
| Tabela 3.1. Análise da variância dos dados relativos à atividade sérica da ALT, de acordo com a Tabela 3 | 23. |
| Tabela 3.2. Análise de variância dos dados relativos à atividade sérica da AST, de acordo com a Tabela 3 | 23. |
| Tabela 4. Atividades das enzimas ALT e AST em tecidos humanos, relativas ao soro como unidade. | 28 |
| Tabela 5. Valores da atividade sérica da ALT(alanina transaminase), por (Apêndice) animal, de acordo com o tratamento nos tempos de 48, 72 e 96 h. | 34 |
| Tabela 6. Valores da atividade sérica da AST(aspartato transaminase),por (Apêndice) animal, de acordo com o tratamento nos tempos de 48,72 e 96 h | 35. |
| Tabela 7. Valores da atividade sérica da ALT e AST, por animal, após 96 h (Apêndice) de tratamento, no grupo controle e no tratado com metronidazol 30 mg/kg, este também após 96 horas da retirada da droga. | 36 |

1.2. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ALT | alanina aminotransferase |
| AP | fosfatase alcalina |
| AST | aspartato aminotransferase |
| °C | graus centígrados |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| et alii | e outros |
| F | valor calculado para comparação de duas médias |
| g | grama |
| g/dia | gramas por dia |
| G.L. | graus de liberdade |
| h | hora |
| H.E | hematoxilina-eosina |
| i.p. | intraperitoneal |
| LDH | desidrogenase láctica |
| mg | miligrama |
| mg/Kg | miligramas por quilograma de peso corporal |
| ml/min | mililitros por minuto |
| NaOEt | hidróxido de sódio etoxilado |
| nm | nanômetro |
| p | símbolo estatístico indicando nível de significância |
| Prob | probabilidade |
| Q.M | quadrado médio |
| rpm | rotações por minuto |
| S.Q | soma dos quadrados |
| TGO | transaminase glutâmico oxalacética |
| TGP | transaminase glutâmico pirúvica |
| UV | ultra violeta |
| U/L | unidade por litro. |
| µg/mL | microgramas por mililitro |

2. RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do metronidazol sobre a função hepática, um medicamento comumente empregado no tratamento da tricomoníase vaginal e outras parasitoses, além de infecções anaeróbias bacterianas. Para tal, empregaram-se 72 ratos albinos Wistar, machos, tratados com metronidazol 7,5 mg/kg, 15 mg/kg e 30 mg/kg ou com solução de NaCl 0,9% (controle), em duas aplicações diárias, por 4 dias, *via ip*. Após 48, 72 e 96 horas do início dos tratamentos, colheram-se amostras de sangue para a dosagem da atividade sérica das enzimas ALT(alanina aminotransferase) e AST(aspartato aminotransferase). Os resultados apontaram que, comparado ao controle, o metronidazol (15 mg/kg e 30 mg/kg) provoca um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade enzimática da ALT, sendo este efeito já observado após 48 horas de tratamento. Já o aumento da atividade sérica da AST somente ocorreu nos animais tratados com o metronidazol 30 mg/kg, após 96 horas de tratamento, sendo este efeito reversível após a retirada da droga. Concluiu-se que o metronidazol, quando empregado em doses maiores e mesmo por tempo restrito, em ratos, aumenta a atividade sérica das enzimas ALT e AST, efeito este reversível após a retirada da droga.

Palavras chaves : Antimicrobianos; metronidazol; toxicidade hepática.

3. INTRODUÇÃO

O metronidazol é um composto derivado do grupo dos nitroimidazólicos, sintetizado originalmente na França, pelos Laboratórios de Pesquisas Rhone Poulanc (SCULLY, 1988). Foi introduzido primeiramente na Europa, em 1959, indicado exclusivamente no tratamento das vaginites devidas ao *Trichomonas vaginalis* e, alguns anos depois, como terapia de outras infecções parasitárias, como as provocadas pela *Entamoeba histolytica* (POWELL et alii, 1966) e pela *Giardia lamblia* (KHAMBATTA, 1971).

A atividade do metronidazol contra bactérias anaeróbias era totalmente desconhecida até que SHINN (1962), relatou o caso de uma paciente — fazendo uso deste medicamento no tratamento de tricomoníase vaginal — que acusou o alívio dos sintomas de uma gengivite ulcerativa necrosante, da qual também era portadora.

Dois anos mais tarde, DAVIES et alii (1964) demonstraram que o metronidazol possuía uma ação efetiva sobre as espiroquetas envolvidas nesta doença periodontal.

Estas observações induziram outros estudos subseqüentes, *in vitro* ou de cunho clínico, onde a eficácia do metronidazol sobre os microrganismos anaeróbios foi plenamente confirmada (TALLY et alii, 1972; NASTRO & FINEGOLD, 1972). Trabalhos mais recentes indicam que este medicamento é usado com uma freqüência cada vez maior no tratamento das infecções anaeróbias, parasitárias e vaginais não específicas (ROSENBLATT & EDSON, 1987; FINEGOLD & MATHISEN, 1990; SMILACK et alii, 1991).

No âmbito da odontologia, parece ser consensual que a etiologia da maioria das infecções bacterianas é comumente associada aos microrganismos anaeróbios obrigatórios (MITCHELL, 1984 ; SLOTS & RAMS, 1990).

Neste sentido, no tratamento das doenças periodontais, em especial, o metronidazol tem sido testado isoladamente (WATTS et alii, 1986 ; VAN OOSTEN et alii, 1987) ou em conjunto com a terapia convencional de debridamento mecânico (LOESCHE et alii, 1984, JENKINS et alii, 1989), na tentativa de se estabelecer sua eficácia na melhoria das condições do periodonto.

A eficácia do metronidazol como terapêutica coadjuvante das infecções da cavidade bucal já foi demonstrada em inúmeros experimentos clínicos como, por exemplo, nos casos de pericoronarite aguda (McGOWAN et alii, 1977), periodontite do adulto (LOESCHE et alii, 1991) e até mesmo no tratamento da periodontite juvenil, quando associado à amoxicilina (van WINKELHOLF et alii, 1989).

Por outro lado, como qualquer outro medicamento, o uso clínico do metronidazol deve ser fundamentado na sua relação risco/benefício. Este composto tem sido bastante estudado há mais de 20 anos, estando comprovada sua segurança em humanos, por meio

de uma seqüência de testes em bactérias, animais de laboratório e finalmente na espécie humana (ROE, 1982). Em decorrência destes experimentos, alguns aspectos negativos relacionados à terapêutica com o metronidazol também têm sido divulgados.

Os efeitos colaterais indesejáveis do metronidazol, de acordo com os regimes preconizados em odontologia, são raros e não muito sérios, incluindo a sensação de gosto metálico, boca seca, língua enrugada, anorexia e distúrbios gastrintestinais, como náusea e eventualmente vômitos, que podem ser minimizados se a medicação for tomada com alimentos (GREENSTEIN, 1993). No sistema nervoso central os efeitos mais observados são a cefaléia, tonturas e sonolência (ALTMAN, 1980 ; MITCHELL, 1984).

Já a terapia prolongada com o metronidazol pode provocar outros efeitos colaterais, como a neutropenia transitória ou uma moderada leucopenia, em geral reversível após a retirada da droga. Entretanto, em altas doses (4g/dia, por mais que 10 dias), pode induzir a neuropatia periférica, com conseqüências de maior gravidade (STAHLBERG et alii, 1990).

Com relação aos efeitos do metronidazol sobre a função hepática, a literatura é praticamente desprovida de informações sobre o assunto.

Pode-se citar o contido na United States Pharmacopeia - Drug Information (USP DI® 1991), como também na Portaria nº 40 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (BRASIL, 1992), que trata da aprovação provisória da monografia concernente ao metronidazol. Nestes documentos há uma advertência de que a relação risco benefício deve ser avaliada em caso de pacientes com disfunção hepática grave, uma vez que o metronidazol é metabolizado no fígado, predispondo seu acúmulo e de seus metabólitos. Alerta também que, nestes casos, devem ser administradas doses menores que as usuais.

Tomando por base estas informações, talvez possa-se deduzir que o metronidazol é um medicamento que exhibe alguma segurança para ser empregado em pacientes com a função hepática normal, em doses terapêuticas e por curtos períodos de tempo.

Entretanto, na prática odontológica diária, é bastante comum o emprego do metronidazol associado a outros medicamentos com potencial hepatotóxico, como a eritromicina (SMILACK et al., 1991) e o paracetamol (GOLDEN et al., 1981), já que a primeira completa a ação do metronidazol contra praticamente todos os anaeróbios da cavidade oral (SCHUHMANN et al., 1985), e o segundo é rotineiramente empregado como droga analgésica.

Quando se quer avaliar as alterações da função hepática, incluindo aquelas induzidas por drogas, o exame bioquímico de rotina constitui-se na dosagem da atividade sérica das enzimas ALT e AST, descartada as outras condições em que haja alterações dos níveis séricos destas enzimas.

A alanina aminotransferase (ALT) — denominação atual da TGP (transaminase glutâmico pirúvica) — é uma enzima unilocular (citoplasmática), cuja maior atividade localiza-se no tecido hepático, encontrando-se em menor proporção nos rins, coração, músculos esqueléticos, pâncreas e eritrócitos, em ordem decrescente.

Assim, a destruição da permeabilidade das membranas celulares destes tecidos, provoca a liberação de ALT na circulação sanguínea. Levando-se em conta a sua distribuição pelo organismo, os maiores aumentos da atividade de ALT no soro são decorrentes de alterações hepáticas (hepatites colestáticas, tóxicas e virais).

A aspartato aminotransferase (AST), ou também TGO (transaminase glutâmico oxalacética), é uma enzima bilocular — citoplasmática e mitocondrial — estando amplamente difundida no organismo em tecidos tais como o músculo esquelético, rins, cérebro e fundamentalmente no fígado e no coração, onde se encontra em maior concentração.

Qualquer alteração nestes tecidos pode produzir um aumento nos níveis de AST circulante, de forma proporcional ao dano produzido. Em geral, altos níveis de AST são índices de lesão profunda, por atingir as organelas mitocondriais. Pacientes com infecções hepáticas apresentam maiores elevações de AST, sobretudo nos casos de hepatite com necrose.

Qualquer que seja o caso, a determinação da atividade enzimática da ALT e AST adquire importância diagnóstica quando os valores são comparados aos de outras enzimas com a mesma origem tissular, como a desidrogenase láctica (LDH), gama glutamil transferase (γ GT) e a fosfatase alcalina (AP), ajudando a completar o perfil enzimático de órgãos como o fígado (TIETZ, 1986).

Com base nestas considerações, procurou-se avaliar neste estudo a relação dose-efeito do metronidazol sobre a função hepática, em ratos, analisando-se a atividade sérica das enzimas ALT e AST.

Pretendia-se, com isto, acrescentar alguma contribuição quanto à segurança ainda maior no emprego do metronidazol no tratamento das infecções anaeróbias, em clínica médica e odontológica.

4. REVISTA DA LITERATURA

O metronidazol é sintetizado a partir do 2-metilimidazol, que por nitração fornece a mistura dos isômeros 4 e 5-nitro-2-metilimidazol. A alquilação deste último com cloridrato etilênico na presença de base forte (NaOEt), resulta em metronidazol (KOROLKOVAS, 1982). A sua estrutura química está ilustrada na Figura 1.

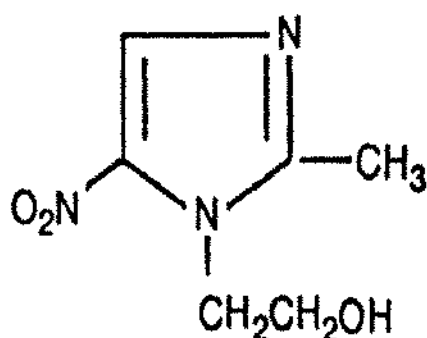


FIGURA 1. Estrutura química do metronidazol

Esta estrutura do metronidazol possibilita a sua rápida e quase completa absorção após administração via oral, com uma biodisponibilidade que se aproxima de 100% (BROGDEN, 1978); JENSEN & GUGLER (1983).

A absorção pode ser retardada, mas não reduzida por completo pela ingestão de alimentos (MARTINDALE The Extra Pharmacopoeia, 1993). Com relação a este aspecto, MITCHELL (1984) afirma que embora exista alguma controvérsia, o consumo de metronidazol concomitante à alimentação não impede que taxas terapêuticas da droga sejam alcançadas.

O pico de concentração plasmática — aproximadamente 5 e 10 µg/ml —, é atingido em média 1 hora após a tomada de doses de 250 e 500 mg, respectivamente (BROGDEN, 1978). Parece não haver uma ligação significativa do metronidazol às proteínas plasmáticas. Estima-se que esta ligação não ultrapasse 20% (USP 1991).

A metabolização do metronidazol ocorre no fígado, por meio de reações de oxidação. Os principais metabólitos são o 1-(2-hidróxi)etil-2-hidróximetil-5-nitroimidazol (metabólito hidróxi), o qual tem atividade antibacteriana, sendo detectado no plasma e urina e o 2-metil-5-nitroimidazol-1-ácido acético (metabólito ácido), o qual não tem atividade antibacteriana, não sendo detectado no plasma, mas sim na urina (MARTINDALE The Extra Pharmacopoeia, 1993).

JENSEN & GUGLER (1983) mostraram que após a administração do metabólito ácido em camundongos, 70 a 80% da dose ficou inalterada na urina e que nenhum outro metabólito foi detectado.

A meia-vida plasmática em pessoas com função hepática normal é, em média, de 8 horas — aumentando para 18 horas em alcólatras. Sua eliminação é feita pelos rins (60

a 80%), sendo 20% excretado de forma inalterada na urina e 6 a 15% nas fezes (USP 1991).

O metronidazol exerce sua atividade terapêutica em etapas. Primeiro entra na célula por difusão passiva, isto em bactérias aeróbias e anaeróbias. Nas bactérias anaeróbias entretanto, o aumento do gradiente de concentração transmembrana leva à recaptação do metronidazo e ao acúmulo intracelular do derivado ativo (SCULLY 1988).

A ativação do metronidazol ocorre por um processo de redução do grupo nitro dentro da bactéria, a qual possui nitroredutase . A redução do grupo nitro é feita pelos microorganismos, pela doação de elétrons pela proteína transportadora de elétrons do tipo ferredoxina. Durante a redução, são formados compostos intermediários com potencial citotóxico, rompendo o DNA bacteriano (ROSENBLATT & EDSON, 1987 ; SCULLY 1988). Para um melhor entendimento do mecanismo de ação do metronidazol, observar a Figura 2.

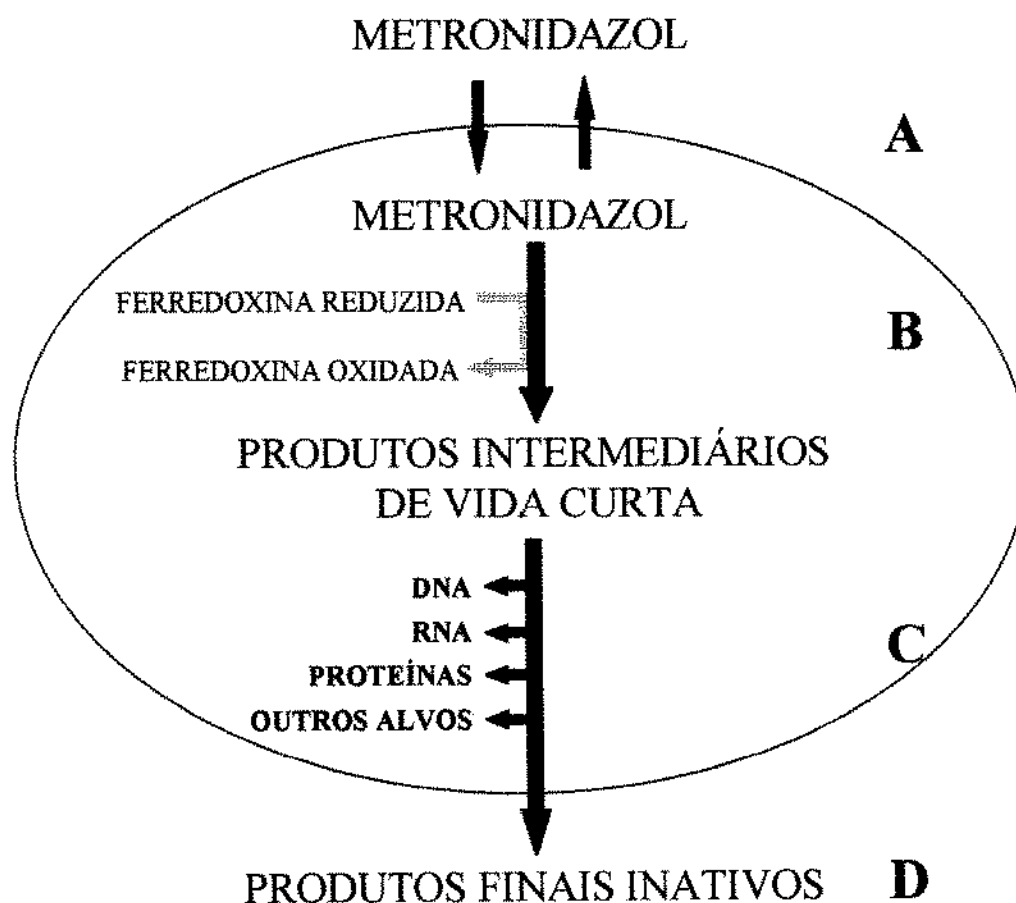


FIGURA 2. Etapas do mecanismo de ação do metronidazol sobre os microorganismos anaeróbios: A) passagem através da membrana celular ; B) redução; C) interação com certos alvos das células; D) liberação de produtos finais inativos (SCULLY, 1988).

O metronidazol é ativo contra os protozoários anaeróbios Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Giardia lamblia e Balantidium coli, algumas bactérias

microaerófilas e a grande maioria das bactérias anaeróbias — onde exerce atividade bactericida (SCULLY 1988).

O metronidazol possui a vantagem de não desenvolver resistência entre os microrganismos anaeróbios (MITCHELL, 1984), pois esta propriedade parece estar restrita às bactéria microaerófilas (SCULLY, 1988). Entretanto, de acordo com ROSENBLATT & EDSON (1987), os anaeróbios podem desenvolver resistência ao metronidazol por dois mecanismos — diminuindo a recaptação da droga ou a nitroredução.

O metronidazol é também bastante empregado no tratamento das infecções bacterianas, em odontologia, já que os anaeróbios fazem parte da microbiota envolvida na etiologia destes processos. Neste sentido, pode-se destacar alguns dos experimentos realizados em humanos:

Mc GOWAN et alii (1977), num ensaio clínico controlado, duplo-cego, puderam demonstrar que o metronidazol 200 mg, administrado a cada 6 horas, por 5 dias, foi tão eficaz quanto a penicilina V na redução da dor e do edema decorrentes das pericoronarites agudas.

HEAD et alii (1984) avaliaram a eficácia do metronidazol e da penicilina V, na eliminação de bactérias anaeróbias das bacteremias pós-extração dental. Notaram que embora a penicilina V reduzisse a ocorrência de anaeróbios numa proporção maior que o metronidazol, ainda foram detectados anaeróbios Gram negativos em 4 pacientes tratados com a penicilina V. No grupo tratado com o metronidazol, nenhum anaeróbio Gram negativo foi cultivado. Concluíram que a associação de penicilina V com o metronidazol, poderia ser bastante efetiva na prevenção de seqüelas das bacteremias pós-exodontia.

LOESCHE et alii (1984), demonstraram que a administração sistêmica de 250 mg de metronidazol, a cada 8 horas, por uma semana, pode auxiliar na redução clínica das bolsas periodontais, quando associado aos procedimentos de raspagem e polimento radicular, afirmando que o efeito benéfico do metronidazol estava associado com uma redução significativa e sustentada de certos organismos anaeróbios, como o *Bacteroides gingivalis* e as grandes espiroquetas.

Van WINKELHOFF et alii (1989), estudaram 22 pacientes portadores de periodontite juvenil localizada ou de progressão rápida, todos infectados com o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Demonstraram que após a terapia mecânica subgingival — em combinação com o uso do metronidazol associado à amoxicilina —, a supressão deste microrganismo anaeróbio foi conseguida em todos os pacientes, com exceção de um, sendo mantida ao menos pelo período de 11 meses.

VIDIGAL JR. et alii (1992), num trabalho de revisão sobre o emprego do metronidazol em periodontia, concluíram que este medicamento estaria indicado no tratamento de lesões periodontais recorrentes em pacientes com periodontite refratária ou

nos casos de doença periodontal avançada, quando a profundidade das bolsas for maior do que 4 mm.

Os efeitos adversos do metronidazol são geralmente dose dependente. Os mais comuns são distúrbios gastrointestinais, especialmente, náusea e gosto metálico. Pode ocorrer diarreia, boca seca, glossite e estomatite. Alguns pacientes apresentaram discreta leucopenia quando tomaram metronidazol. Outro efeito colateral inclui desconforto uretral e escurecimento da urina. Também já foi encontrado um aumento dos valores das enzimas hepáticas (MARTINDALE The Extra Pharmacopoeia, 1993).

JENSEN & GUGLER (1983) mostraram que o metabolismo do metronidazol pode mudar após o seu uso durante 7 dias, levando o seu metabólito a provocar parestesias, observadas em pacientes portadores de doença de Crohn.

O metronidazol pode também ser cancerígeno em animais, quando empregado por tempo prolongado, devido à redução de produtos do metabolismo bacteriano pelo metronidazol serem mutagênicos em bactérias (SCULLY, 1988).

O uso do metronidazol na gestante é controvertido. O "Center for Disease Control" considera o metronidazol contra-indicado durante o 1º trimestre, em pacientes com tricomoníase (BRIGGS et alii, 1987).

O "Collaborative Perinatal Project" acompanhou 50.282 pares mãe-criança, 31 dos quais foram expostos ao metronidazol no 1º trimestre. Foi encontrada uma possível associação com malformações (risco relativo 2,02) com base em defeitos em quatro crianças. A significância estatística deste achado é desconhecida (HEINONEN et alii, 1977).

Já com relação ao aleitamento materno, sabe-se que o metronidazol é excretado no leite. Após uma dose única de 2g, por via oral, em três pacientes, as concentrações no leite após 2 a 4 horas da administração da droga atingiram 50 a 60 µg/mL. Interrompendo-se as mamadas por 12 ou 24h, a exposição à droga era reduzida a 9,8 e 3,5 µg/mL, respectivamente. Com base nestas informações, a Academia Americana de Pediatria recomendou a interrupção do aleitamento materno durante 12-24 horas após a administração do metronidazol, para propiciar a excreção da droga (BRIGGS et alii, 1987).

5. PROPOSIÇÃO

Com base no conceito de que o metronidazol é um antimicrobiano largamente empregado no tratamento das infecções provocadas por bactérias anaeróbias, aliado à possível toxicidade hepática deste medicamento, propôs-se neste trabalho:

— **Avaliar os efeitos do metronidazol sobre as funções do fígado, quando administrado em diferentes dosagens, por 4 dias, através da análise da atividade sérica das enzimas ALT (alanina amino transferase) e AST (aspartato amino transferase).**

6. MATERIAL E MÉTODO

6.1. Animais

Foram utilizados nesta pesquisa 72 ratos albinos Wistar spf *, machos, adultos, pesando 220 ± 20 g, procedentes do Centro de Bioterismo da Unicamp, alimentados com ração comercial (Labina - Purina® Nutrimentos Ltda.) e água "ad libitum".

spf *= "Specific pathogen free"

6.2. Grupos experimentais e drogas

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, com 18 elementos por grupo, que receberam os seguintes tratamentos :

- metronidazol @ - 7,5 mg/Kg , 15mg/kg e 30mg/kg
- solução de cloreto de sódio a 0,9% (Controle)

@ Metronidazol injetável 0,5% - JP Indústria Farmacêutica S.A.

6.3. Tratamentos

De acordo com os grupos experimentais pré-estabelecidos, os animais foram submetidos a duas aplicações injetáveis diárias de metronidazol ou solução salina, via intraperitoneal, sendo a primeira dose administrada no horário das 8:00 horas e a subsequente às 18:00 horas, por 4 dias.

Após 48, 72 e 96 horas do início dos tratamentos, foram colhidas amostras de sangue venoso de 24 animais (6 elementos por grupo), em cada um destes tempos de estudo, para a análise da atividade sérica das enzimas AST e ALT.

No dia anterior ao da colheita das amostras, logo após a administração da dose das 18:00 horas, os animais foram mantidos em jejum, retirando-se a ração sólida e mantendo-se apenas o oferecimento de água. A colheita das amostras de sangue sempre foi feita às 8:00 horas.

6.4. Técnica de colheita das amostras de sangue

Inicialmente, procedeu-se a limpeza da porção terminal da cauda dos animais, por meio de escovação com água destilada, seguida de secagem com gaze. Após anestesia geral através da inalação de éter etílico, os animais eram mantidos suspensos num suporte com garra, de maneira a facilitar o fluxo sanguíneo para a extremidade da cauda, pela ação da gravidade.

Em seguida, a extremidade da cauda era colocada sobre um papel de filtro e seccionada com uma lâmina de bisturi nº 23. Para a colheita do sangue e separação do soro, foram utilizados tubos siliconizados descartáveis (Vaccum II - Labnew), sem anticoagulante, onde o sangue era introduzido de forma que escorresse pela parede do tubo para evitar hemólise. Feita a colheita das amostras, amarrou-se o local do corte com fio de algodão estéril, para auxiliar na contenção da hemorragia. Tais procedimentos foram realizados sob rigorosas condições de assepsia.

Os tubos de ensaio com as amostras, devidamente identificados de acordo com os grupos experimentais, foram colocados numa estufa a 37°C, pelo período de 1 hora, para a retração do coágulo. Decorrido este tempo, centrifugou-se o sangue durante dez minutos a 3.500 rpm, separando-se o soro, que com o auxílio de pipetas automáticas, era transportado para tubos de vidros com tampa.

Uma vez realizada a dosagem da atividade sérica enzimática da AST e ALT, o soro foi mantido sob refrigeração constante, para uma eventual análise de contraprova.

6.5. Método de determinação da atividade sérica das enzimas Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).

A atividade sérica das enzimas AST e ALT foi determinada através do método UV otimizado (Wiener Lab. 2000 - Rosário, Argentina) para a leitura colorimétrica, num comprimento de onda de 340nm, em equipamento automático (Technicon RA/ 1000), numa temperatura de 37° C.

Feitas as determinações de ALT e AST, os animais dos grupos que apresentaram um aumento estatisticamente significativo da atividade sérica de **ambas as enzimas** (ALT e AST), quando comparado ao Controle, os tratamentos foram interrompidos e os animais submetidos à uma nova colheita de sangue e determinação da atividade enzimática, **96 horas após a retirada da droga**.

6.6. Análise histológica

Quando foi detectado um aumento simultâneo da atividade sérica das enzimas estudadas, procedeu-se à biópsia do fígado destes animais. O objetivo desta conduta era o de procurar correlacionar o eventual aumento da atividade das enzimas ALT e AST, com possíveis alterações estruturais do tecido hepático.

As amostras do tecido hepático foram lavadas com solução fisiológica e fixadas em formol 10%, à temperatura ambiente, recebendo tratamento técnico histológico de rotina, com cortes de 7 µm de espessura e coloração com HE, para análise ao microscópio óptico (Zeiss - West Germany).

6.7. Análise Estatística

Os dados relativos à dosagem sérica das enzimas AST e ALT, nos diferentes grupos experimentais e tempos de avaliação, foram tratados estatisticamente através da análise de variância e submetidos ao teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

7. RESULTADOS

7.1. Atividade sérica da enzima ALT (alanina aminotransferase)

Os valores médios da atividade sérica da ALT (expressos em Unidades/L, de acordo com o tratamento e tempo de avaliação, encontram-se na Tabela 1. Os valores individuais acham-se no Apêndice deste trabalho.

TABELA 1. Valores médios da atividade sérica da ALT (U/L) e erro padrão da média, em função do tratamento e do tempo de avaliação.

| TRATAMENTO | TEMPO DE AVALIAÇÃO | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------|--------------|
| | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| Sol. Salina 0,9% (controle) | 35,00 ± 1,41 | 35,16 ± 1,35 | 25,83 ± 1,66 |
| Metronidazol (7,5mg/kg) | 41,83 ± 1,92 | 38,16 ± 1,54 | 28,00 ± 0,68 |
| Metronidazol (15mg/kg) | 49,00 ± 3,61 | 51,33 ± 2,16 | 59,16 ± 2,81 |
| Metronidazol (30mg/kg) | 48,33 ± 3,24 | 53,33 ± 2,63 | 59,83 ± 4,26 |

Os valores individuais, contidos na Tabela 5 do Apêndice, foram submetidos a análise de variância, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 1.1.; 1.2. e 1.3..

TABELA 1.1. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 5 do Apêndice, no tempo de **48 horas** após o início do tratamento.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 3 | 771,79 | 257,26 | 5,87 |
| RESÍDUO | 20 | 876,16 | 43,8 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 23 | 1647,95 | | 0,0048 |

O valor de F, apresentado na Tabela 1.1, é significativo ao nível de 5%. Para a comparação das médias, foi aplicado o teste de Tukey. Com base no resultado deste teste, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade sérica da ALT dos animais

tratados com o metronidazol 15mg/kg e 30mg/kg são maiores que aqueles observados nos animais controle.

TABELA 1.2. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 5 do Apêndice, no tempo de **72 horas** após o início do tratamento.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 3 | 1511,66 | 503,88 | 21,33 |
| RESÍDUO | 20 | 472,33 | 23,61 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 23 | 1984,00 | | 0,0000 |

O valor de F, apresentado na Tabela 1.2, é significativo ao nível de 5%. Com base nos resultados do teste de Tukey, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade do ALT no soro dos animais tratados com o metronidazol, nas doses de 15 e 30mg/kg são maiores que aqueles encontrados para o controle e para o metronidazol 7,5mg/kg.

TABELA 1.3. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 5 do Apêndice, no tempo de **96 horas** após o início do tratamento.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 3 | 6385,45 | 2128,49 | 48,45 |
| RESÍDUO | 20 | 878,50 | 43,92 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 23 | 7263,95 | | 0,0000 |

O valor de F, apresentado na Tabela 1.3 é significativo ao nível de 5%. Após aplicado o teste de Tukey, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade do ALT no soro dos animais tratados com o metronidazol, nas doses de 15 e 30mg/kg, são maiores quando comparados aos do controle e metronidazol 7,5mg/kg.

Para ilustrar a grandeza das médias da atividade enzimática sérica da ALT, em função do tratamento e tempo de estudo, observar a Figura 3, na página seguinte.

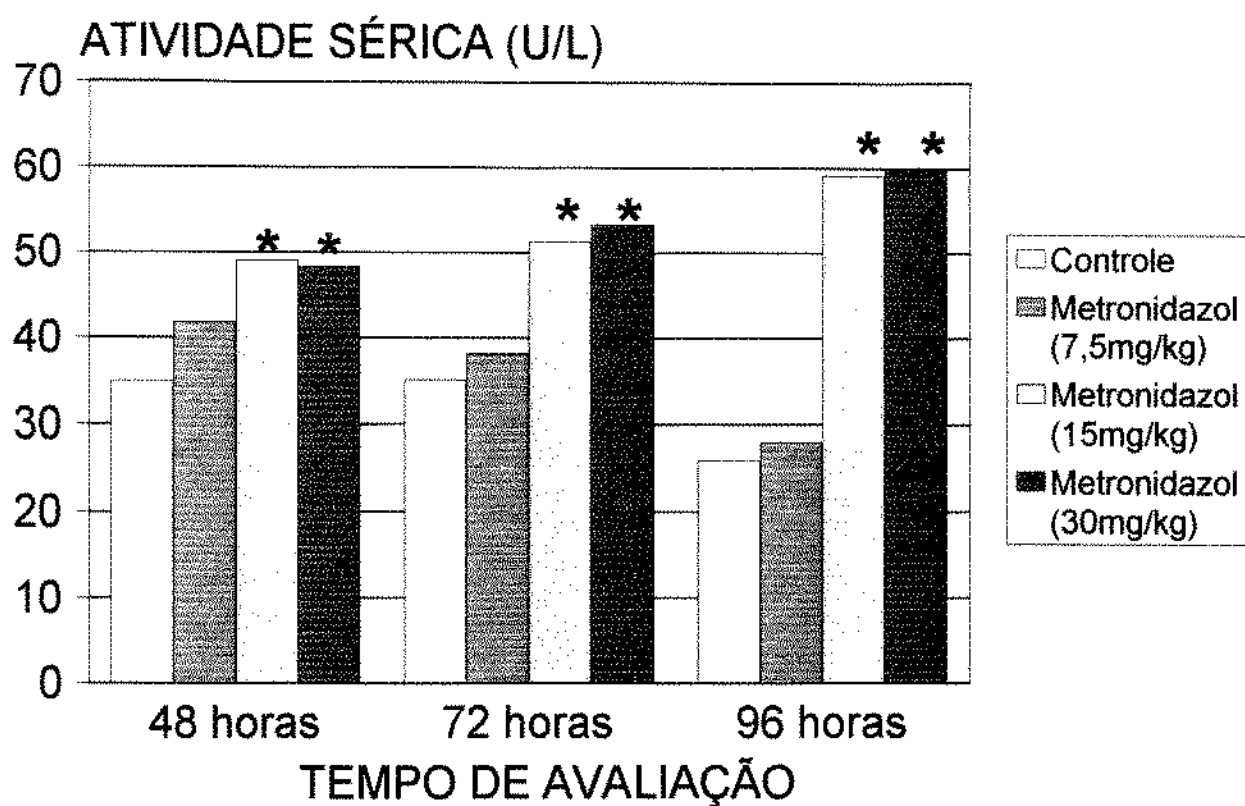


FIGURA 3. Representação dos valores médios da atividade sérica da ALT, de acordo com o tratamento e tempo de avaliação.

* **significante em relação ao controle ($p < 0,05$).**

n = 8 animais por grupo experimental.

7.2. Atividade sérica da enzima AST (aspartato amino transferase).

Os valores médios da atividade sérica da AST (expressos em Unidades/L), por grupo experimental, nos diferentes tempos de avaliação, podem ser observados na Tabela 2. Os valores individuais encontram-se no Apêndice deste trabalho.

TABELA 2. Valores médios da atividade sérica da AST (U/L) e erro padrão da média, de acordo com o tratamento e tempo de avaliação.

| <i>TRATAMENTO</i> | TEMPO DE ESTUDO | | |
|-----------------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| | <i>48 Horas</i> | <i>72 Horas</i> | <i>96 Horas</i> |
| Solução Salina 0,9% (controle) | 169,66 ± 3,12 | 160,00 ± 7,75 | 162,16 ± 2,18 |
| Metronidazol (7,5mg/kg) | 171,83 ± 3,44 | 173,66 ± 4,29 | 172,66 ± 5,92 |
| Metronidazol (15mg/kg) | 183,00 ± 9,06 | 172,16 ± 7,20 | 176,16 ± 8,47 |
| Metronidazol (30 mg/kg) | 183,33 ± 6,61 | 182,33 ± 5,48 | 206,83 ± 10,29 |

Da mesma forma, os dados contidos na Tabela 6 do Apêndice, foram submetidos a análise de variância, cujos resultados encontram-se nas Tabelas 2.1.; 2.2. e 2.3..

TABELA 2.1. Análise da variância, relativa aos dados da Tabela 6 do Apêndice no tempo de **48 horas**.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 3 | 939,45 | 313,15 | 1,41 |
| RESÍDUO | 20 | 4427,50 | 221,37 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 23 | 5366,95 | | 0,2679 |

O valor de F, apresentado na Tabela 2.1, não é significante ao nível de 5%. Com base neste resultado, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade sérica da AST não apresentaram diferenças significantes dentro dos grupos experimentais.

TABELA 2.2. Análise de variância, relativa aos dados da Tabela 6 do Apêndice, no tempo de **72 horas**.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 3 | 6632,12 | 2210,71 | 6,77 |
| RESÍDUO | 20 | 6529,83 | 326,49 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 23 | 13161,95 | | 0,1317 |

O valor de F, apresentado na Tabela 2.2, não é significativo ao nível de 5%. Com base neste resultado, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade sérica da AST não apresentaram diferenças significantes dentro dos grupos experimentais.

TABELA 2.3. Análise de variância, realtiva aos dados da Tabela 6 do Apêndice, no tempo de **96 horas**.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 3 | 6632,12 | 2210,71 | 6,77 |
| RESÍDUO | 20 | 6529,83 | 326,49 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 23 | 13161,95 | | 0,0025 |

O valor de F, apresentado na Tabela 2.3, é significativo ao nível de 5%. Com base nos resultados do teste de Tukey, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade do AST no soro dos animais tratados com metronidazol 30mg/kg são maiores do que os encontrados nos demais grupos experimentais.

Para ilustrar a grandeza das médias da atividade enzimática sérica da AST, em função do tratamento e tempo de estudo, observar a Figura 4, na página seguinte.

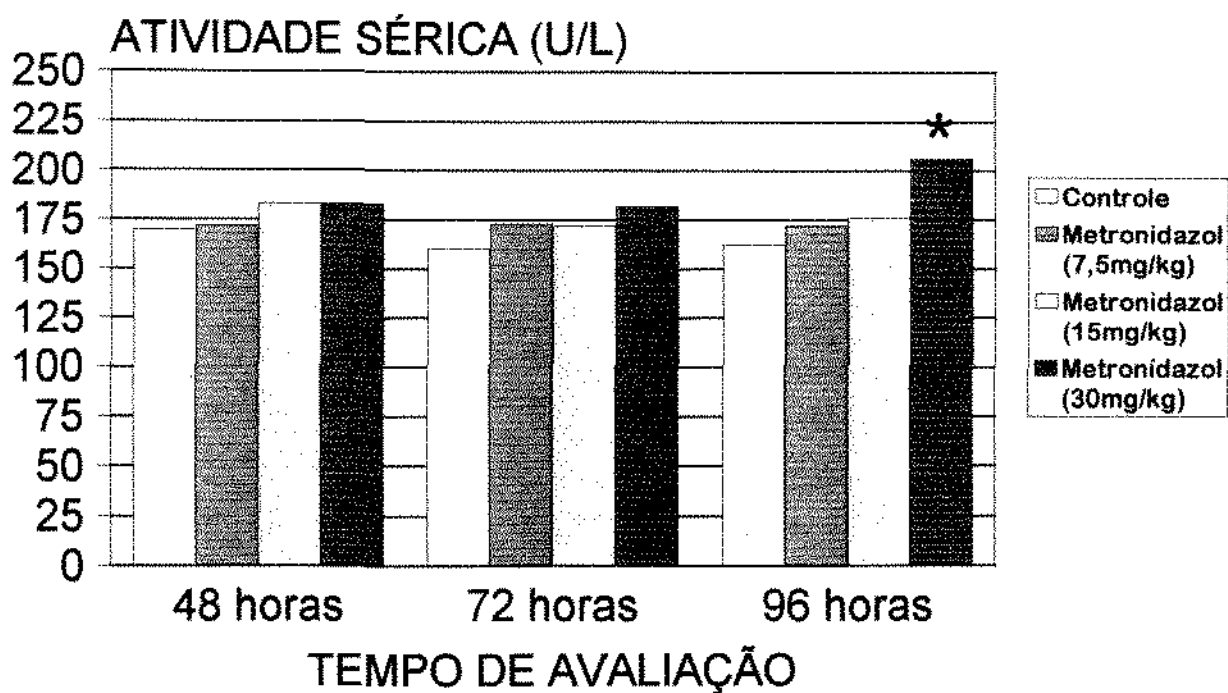


FIGURA 4. Representação dos valores médios da atividade sérica da AST, de acordo com o tratamento e tempo de estudo.

* **significante em relação ao controle ($p < 0,05$).**

n = 8 animais por grupo experimental.

7.3. Atividade sérica das enzimas ALT e AST, após a retirada da droga.

Nos animais tratados com o metronidazol, na dose de 30mg/kg, foi feita uma nova análise da atividade sérica das enzimas ALT e AST, 96 horas após a retirada da droga, em virtude de ter sido o único grupo experimental que apresentou uma atividade aumentada de ambas as enzimas, comparada ao controle.

A Tabela 3 mostra os valores médios destas medidas e daquelas observadas nos mesmos animais da amostra, no tempo de 96 horas, antes da retirada da droga, comparados ao controle.

TABELA 3. Valores médios da atividade sérica das enzimas ALT e AST (Unidades/L) e erro padrão da média, do grupo de animais tratados com salina (controle) e com o metronidazol 30 mg/kg, por 96 horas e 4 dias após a retirada do antimicrobiano.

| <i>TRATAMENTO</i> | <i>ATIVIDADE SÉRICA ENZIMÁTICA</i> | |
|--|------------------------------------|----------------|
| | <i>ALT</i> | <i>AST</i> |
| CONTROLE (sol.salina) <i>96 horas de tratamento</i> | 25,83 ± 1,66 | 162,16 ± 2,18 |
| Metronidazol (30mg/kg) <i>96 horas de tratamento</i> | 59,83 ± 2,81 | 206,83 ± 10,29 |
| Metronidazol (30mg/kg) <i>após a retirada a droga</i> | 49,60 ± 2,46 | 147,80 ± 8,82 |

A análise de variância dos dados individuais, contidos na Tabela 7 do Apêndice, para a atividade sérica da ALT e AST, encontram-se na Tabela 3.1. e 3.2., respectivamente.

TABELA 3.1. Análise da variância dos dados relativos à atividade sérica da ALT, de acordo com a Tabela 3.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 2 | 3511,25 | 1755,63 | 55,75 |
| RESÍDUO | 14 | 440,86 | 31,39 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 16 | 3952,11 | | 0,0000 |

TABELA 3.2. Análise da variância dos dados relativos à atividade sérica da AST, de acordo com a Tabela 3.

| <i>Causas Variação</i> | <i>G.L.</i> | <i>S.Q.</i> | <i>Q.M.</i> | <i>F</i> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| GRUPOS | 2 | 10739,06 | 5369,53 | 15,40 |
| RESÍDUO | 14 | 4880,46 | 348,6 | <i>Prob. > F</i> |
| TOTAL | 16 | 15619,52 | | 0,0003 |

O valor de F, apresentado nas Tabelas 3.1. e 3.2., é significativo ao nível de 5%. Com base nos resultados do teste de Tukey, pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade da ALT no soro dos animais tratados com metronidazol 30mg/kg, após a retirada da droga, são menores do que os encontrados para o grupo metronidazol 30mg/Kg, porém ainda maiores que os do grupo controle.

Da mesma forma, também pode-se afirmar que, em média, os valores da atividade da AST no soro dos animais tratados com metronidazol 30mg/kg, após a retirada da droga, são menores do que os encontrados para o grupo metronidazol 30mg/Kg.

Para ilustrar a grandeza das médias da atividade enzimática sérica da ALT e AST, na vigência do tratamento com o metronidazol 30mg/Kg e após retirada da droga, observar a Figura 5, que encontra-se na página seguinte..

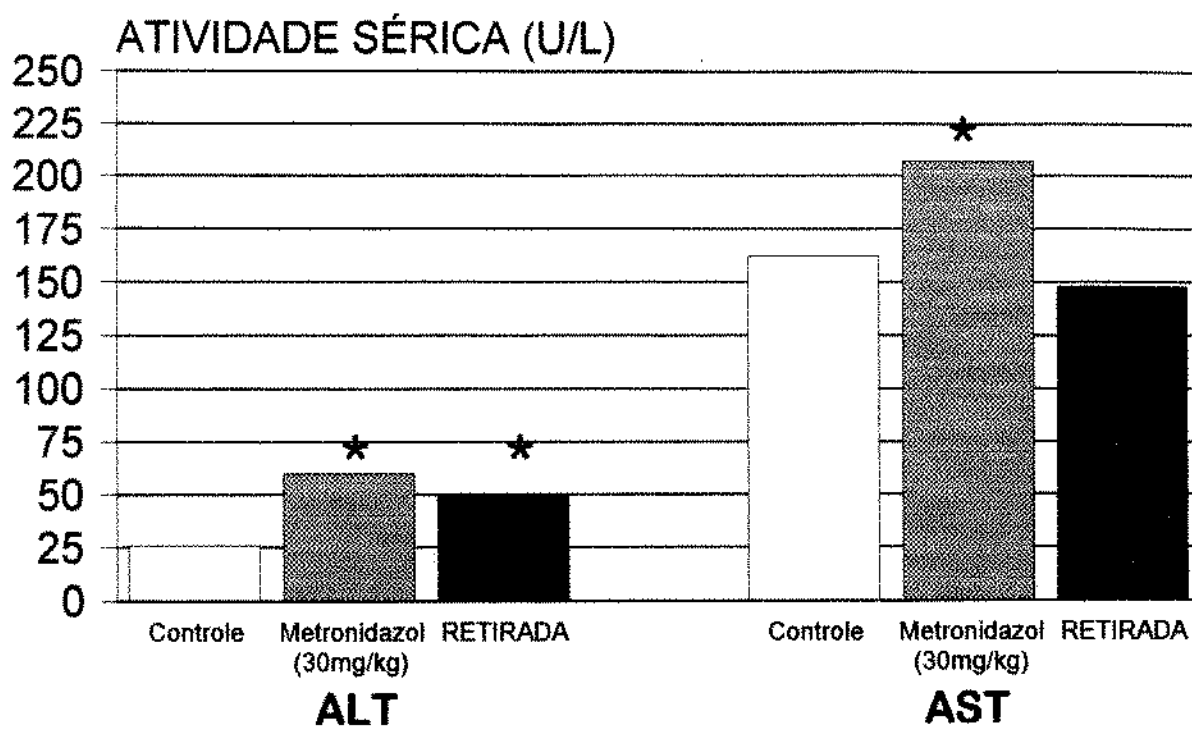


FIGURA 5. Representação dos valores médios da atividade sérica da ALT e da AST, de acordo com o tratamento, no tempo de 96 horas de estudo e após a retirada da droga.

* **significante em relação ao controle ($p < 0,05$).**

n = 6 animais por grupo experimental.

7.4. Análise histológica do tecido hepático

No plano histológico, diferentemente do porco e de outras espécies animais, os lóbulos do fígado de ratos não aparecem bem delimitados, ou seja, o parênquima hepático parece contínuo. Apesar disso, a disposição radial dos hepatócitos e dos capilares sinusóides permite a identificação das unidades estruturais e determina limites imaginários para o lóbulo hepático, tornando-se como ponto de referência as veias centrolobulares e os espaços porta, de distribuição regular.

A Figuras 6 e 7 mostram alguns aspectos estruturais do tecido hepático dos animais que receberam o metronidazol 30 mg/kg, após 96 horas de tratamento, nos quais havia sido constatado um aumento da atividade sérica de ambas as enzimas estudadas (ALT e AST).

Na Figura 6, pode-se observar a arquitetura de parte do fígado destes animais. O aspecto é de um tecido sem alterações da normalidade, com o parênquima hepático formando uma massa contínua, com escassas delimitações dos lóbulos hepáticos, identificados em função da distribuição das veias centrolobulares e dos espaços porta.

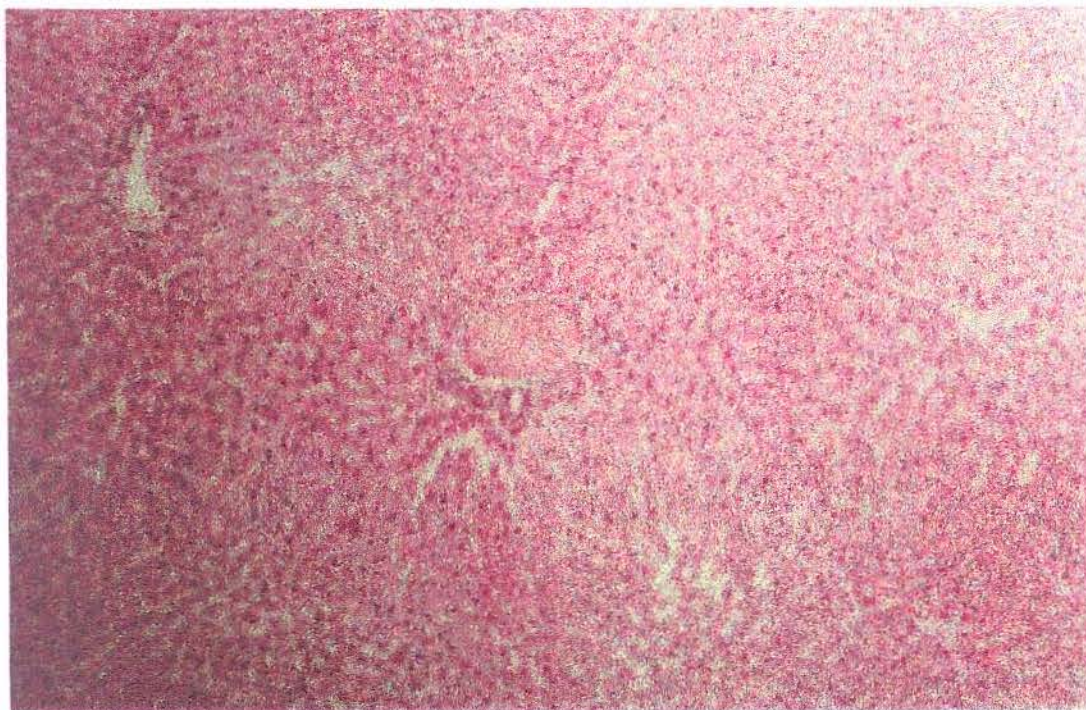


FIGURA 6 - Fotomicrografia de parte de um fígado de animais tratados com o metronidazol 30 mg/kg, 96 horas após a retirada da droga. Observar o aspecto geral do tecido, sem sinais de anormalidade — *H.E., aumento original de 125 X.*

A Figura 7 mostra em detalhe parte de um lóbulo hepático, evidenciando ainda melhor os aspectos normais do tecido. Os hepatócitos, distribuídos em cordões junto aos capilares sinusóides, apresentam citoplasma e núcleo sem sinais de alteração, o mesmo acontecendo com relação ao espaço porta, ilustrado no centro da foto.

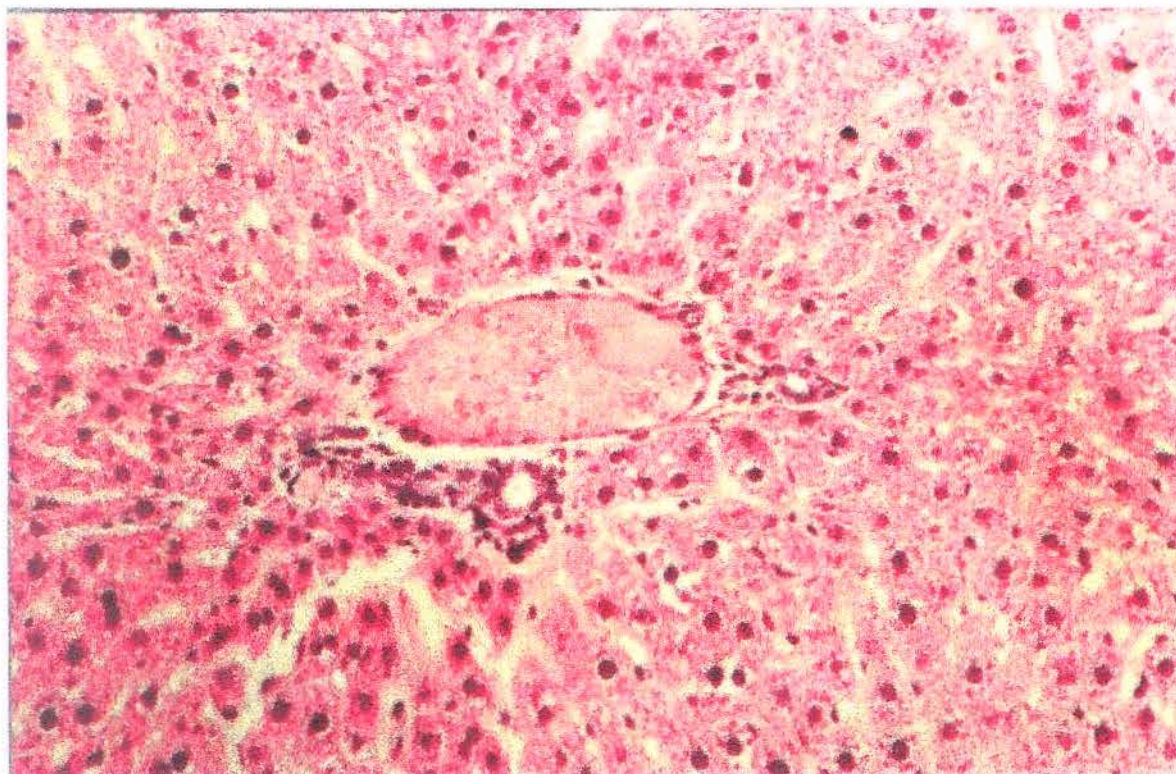


FIGURA 7 - Fotomicrografia ampliada de parte de um lóbulo hepático da mesma amostra da Figura 6. Notar a morfologia normal do tecido, com destaque para os constituintes do espaço porta (ducto biliar e os ramos da artéria hepática e da veia porta) — *H.E., aumento original de 200 X.*

8. DISCUSSÃO

Segundo (SHERLOCK, 1987), existe um ditado de que as múltiplas funções do fígado são excedidas em número apenas pelos métodos bioquímicos designados para testá-las.

As funções vitais específicas de órgãos como o coração e os rins, são avaliadas e expressas numericamente em L/min de débito cardíaco ou em mL/min de "clearance" de creatinina, respectivamente. De forma diferente, o fígado, como órgão central do metabolismo, tem inúmeras funções vitais independentes, complexas de serem avaliadas e quantificadas de forma simultânea.

Apesar de atualmente haver a disponibilidade de inúmeros testes para a avaliação da função hepática, autores como SALLIE et alii (1991) argumentam que existem apenas três possíveis indicações para este tipo de investigação clínica:

1. No diagnóstico de uma doença ou complicação desta;
2. Para definir o prognóstico e avaliar a progressão de determinada doença;
3. Para servir de orientação como resposta à terapia por drogas.

Os testes da função hepática podem ser classificados em vários tipos :

1. *Testes de injúria hepática*, como as transaminases (ALT e AST), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transpeptidase e a 5' nucleotidase, nos quais uma ou mais enzimas são liberadas no sangue ou sintetizadas em resposta à injúria biliar ou hepatocelular.

2. *Bilirrubina*, que pode ser fracionada nas formas conjugada e não-conjugada, permitindo uma avaliação combinada da função metabólica e secretora.

3. *Testes da função de síntese*, como a concentração de albumina sérica, tempo de protrombina ou outro indicador da integridade da cascata da coagulação.

4. *Outros*, como os testes de "clearance", de "stress" da função hepática e os testes de fibrogênese hepática.

Destes, os primeiros três grupos constituem-se nos testes "standart" da função hepática, sendo os únicos indicados na prática clínica de rotina (SALLIE et alii, 1991).

No que diz respeito a análise da atividade sérica das transaminases ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase), é importante destacar que ambas estão distribuídas em diferentes tecidos animais. As atividades destas enzimas nos tecidos de humanos, relativas ao soro como unidade, estão expressas na Tabela 4, na página seguinte.

TABELA 4 - Atividades das enzimas AST e ALT em tecidos humanos, comparadas ao soro como unidade (TIETZ, 1986).

| Tecido | AST | ALT |
|---------------------|------------|------------|
| Coração | 7800 | 450 |
| Fígado | 7100 | 2850 |
| Músculo esquelético | 5000 | 300 |
| Rim | 4500 | 1200 |
| Pâncreas | 1400 | 130 |
| Baço | 700 | 80 |
| Pulmão | 500 | 45 |
| Eritrócito | 15 | 7 |
| SORO | 1 | 1 |

Existem muitas razões pelas quais os testes individuais de função hepática são de valor limitado no diagnóstico e prognóstico de pacientes com doença hepática. Primeiramente porque, assim como outros órgãos, o fígado possui uma enorme capacidade de reserva e, como consequência, as funções de síntese e outras mais podem estar preservadas mesmo na presença de doença hepática generalizada. Em segundo lugar, tanto na doença hepática focal como na difusa, os testes de enzimas hepáticas podem apresentar níveis anormais transitórios durante o período inicial pós-injúria, normalizando-se durante a fase de reparação tecidual (SALLIE et alii, 1991).

Qual seria então o significado clínico do aumento da atividade sérica das enzimas ALT e AST ?

Na hepatite viral e outras formas de doença associada com necrose hepática, a atividade sérica da ALT e AST está elevada mesmo antes do aparecimento dos sinais e sintomas clínicos da doença — icterícia, por exemplo. Níveis séricos de ambas as enzimas podem alcançar valores tão altos como 100 vezes o limite referencial superior, embora elevações de 20 a 50 vezes sejam as mais freqüentemente encontradas (TIETZ, 1986).

As elevações da atividade sérica da ALT são raramente observadas em outras condições que não seja a doença do parênquima hepático. Além do mais, estes aumentos

são mais persistentes que os encontrados para a atividade da AST. A medição de ambas as enzimas é muito útil para distinguir-se a hepatite de outras lesões parenquimatosas (ELLIS et alii, 1978).

Os resultados do presente trabalho, relativos à ALT (alanina aminotransferase), mostraram que, comparada ao controle, a atividade sérica desta enzima, em média, não se alterou quando os animais foram tratados com duas doses diárias de 7,5 mg/kg de metronidazol — equivalente a aproximadamente 1g/dia em humanos —, mesmo após 96 horas de tratamento. Ao contrário, um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) da sua atividade no soro sanguíneo, foi observado quando a dose de metronidazol era aumentada para 15 ou 30 mg/kg, a partir de 48 horas de tratamento.

Com relação à AST (aspartato aminotransferase), os dados obtidos indicaram um aumento significativo da atividade sérica enzimática em relação ao controle, apenas quando os animais eram tratados com duas doses diárias de 30 mg/kg de metronidazol — o que equivale a aproximadamente 4g/dia em humanos — e mesmo assim somente no tempo de 96 horas de tratamento.

Estes achados parecem indicar, numa primeira análise, que o metronidazol poderia induzir dano hepático quando empregado em doses maciças, aumentando sua toxicidade quanto maior for o tempo de administração.

Em humanos, os valores de referência da atividade da ALT no soro, encontram-se na faixa de 8 a 20 U/L em adultos e de 5 a 28 U/L em crianças e recém-nascidos. Para a AST, os valores de referência situam-se na faixa de 8 a 20 U/L em adultos, 15 a 60 U/L para crianças e de 25 a 75 U/L em recém-nascidos (TIETZ, 1986).

Em ratos, entretanto, não foram encontrados na literatura dados relativos à faixa de normalidade biológica da atividade sérica da ALT e da AST, dificultando sobremaneira uma análise comparativa mais adequada com os resultados do presente trabalho.

Diante disso, considerou-se como "normais" os valores da ALT obtidos em 18 animais do grupo controle, empregados nesta pesquisa. Em outras palavras, com base na atividade sérica mínima de 21 U/L e máxima de 40 U/L (vide valores por animal, na Tabela 5 do Apêndice), estabeleceu-se uma faixa de referência de 15 a 45 U/L como

parâmetro de comparação, em ratos, dentro das condições em que foi realizada esta pesquisa.

Da mesma forma, para a enzima AST, os 18 animais controle apresentaram uma atividade sérica mínima de 137 U/L e máxima de 184 U/L (valores individuais na Tabela 6 do Apêndice), sugerindo uma faixa de 120 a 200 U/L como "normal" de referência, em ratos.

Os resultados aqui encontrados mostraram então valores médios da atividade sérica da ALT de 49,0; 51,33 e 59,16 U/L, no grupo de animais tratados com o metronidazol na dose de 15 mg/kg e de 48,33; 53,33 e 59,83 U/L, quando este antimicrobiano era empregado na dose de 30 mg/kg, nos tempos respectivos de 48, 72 e 96 horas de tratamento. Isto significa dizer que houve um aumento de 30 % da atividade enzimática da ALT, aproximadamente, quando comparado ao limite máximo da faixa de referência do grupo controle.

No que diz respeito à atividade sérica da AST, no único grupo e tempo de avaliação onde houve um aumento com significância estatística (tratamento com o metronidazol 30 mg/kg, após 96 horas de tratamento), os valores médios encontrados foram de 206,83 U/L, o que representa um aumento próximo de 6%, quando comparado ao limite superior da faixa estabelecida como normal para o controle.

Aceito isto, poderia-se dizer que houve um discreto aumento da atividade enzimática da ALT e da AST, no soro dos animais tratados com o metronidazol, dependente da dose e do tempo de administração da droga.

Pode-se inferir também que o grau de elevação dos níveis séricos destas enzimas, parece não ser compatível com lesões hepáticas mais sérias — associadas com necrose focal ou centrolobular —, como ocorre na intoxicação por drogas do tipo do clorofórmio ou tetracloreto de carbono (ROBBINS & COTRAN, 1983), quando normalmente o aumento da atividade sérica da ALT e AST é de 20 a 50 vezes.

A favor desta assertiva, pode-se usar dois argumentos que fazem parte dos resultados deste trabalho. O primeiro é que no grupo de animais que receberam o metronidazol 30 mg/kg por 96 horas, observou-se uma diminuição da atividade sérica das enzimas ALT e AST, de forma significativa ($p < 0,05$), **após a retirada da droga**.

Em segundo lugar, a análise histológica do fígado dos animais deste mesmo grupo mostrou uma preservação da estrutura do parênquima hepático, como ilustrado nas Figuras 5 e 6 deste trabalho.

Estes achados parecem encontrar suporte no trabalho de TIETZ (1986), onde argumentou que aumentos pequenos ou moderados da atividade sérica da ALT e AST podem ser observados após a ingestão de álcool e a administração de uma variedade de drogas como os opiáceos, salicilatos ou ampicilina, e que estas elevações geralmente são reversíveis após a retirada da droga.

Como já foi dito, a alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima unilocular (citoplasmática), e a aspartato aminotransferase (AST) uma enzima bilocular — citoplasmática e mitocondrial — ambas apresentando uma grande atividade no fígado.

Assim, agressões moderadas à este órgão induzem alterações da permeabilidade das membranas celulares dos hepatócitos e, conseqüentemente, a liberação de ALT na circulação sanguínea. Em geral, altos níveis séricos de AST são indícios de lesão profunda, por atingir as mitocôndrias das células hepáticas, sobretudo nos casos de hepatite com necrose.

BESKID et allí (1980), estudando os efeitos do metronidazol na ultraestrutura do fígado de ratos, demonstraram que este antimicrobiano causa uma proliferação das membranas de superfície lisa do retículo endoplasmático, e que este fenômeno é acompanhado de sinais de lesão celular. Os autores empregaram 1 g/kg em dose única, em 5 ou 28 tomadas diárias ; 2 g/kg, em 28 doses diárias, provando que os efeitos proliferativos e tóxicos do metronidazol eram dose e tempo dependentes.

De um modo geral, a doença hepática induzida por drogas pode ser previsível ou imprevisível (ROBBINS & COTRAN, 1983). A lesão hepática previsível devido a drogas utilizadas na prática médica é encontrada geralmente no contexto da automedicação ou superdosagem acidentais, sendo estas drogas definidas como hepatotoxinas diretas. *As hepatotoxinas diretas produzem lesão hepática em todos os indivíduos e animais experimentais expostos; o grau de lesão está relacionado com a dose e independe da idade ou sexo.*

Entretanto, em sua grande maioria, as reações adversas a drogas são imprevisíveis e representam a hipersensibilidade, a resposta alérgica ou metabólica ao agente particular. Estas reações ocorrem em pouco dos pacientes que recebem a droga (1/50 a 1/10.000), são excepcionais em crianças e, em contraste com as hepatotoxinas diretas, a lesão causada aparece depois de um intervalo de pelo menos três semanas (ROBBINS & COTRAN, 1983).

Em resumo, com base na avaliação global dos resultados aqui apresentados, espera-se que este experimento tenha contribuído para um melhor conhecimento dos efeitos do metronidazol sobre a função hepática. Talvez possa se deduzir que o metronidazol é um medicamento suficientemente seguro para ser empregado em pacientes com a função hepática normal, em doses terapêuticas e por curtos períodos de tempo. Tanto isso pode ser verdade, pois a amebíase hepática há muito tempo é tratada com o metronidazol, em 3 doses diárias de 750 mg, por 5 a 8 dias, sem que haja relato de danos ao fígado (BEESON & Mc DERMOTT, 1977).

Por outro lado, a relação risco benefício do emprego deste antimicrobiano deve ser cuidadosamente levada em consideração, quando o tempo de administração for muito longo ou em casos de pacientes com histórico de hepatite recente ou portadores de disfunção hepática grave.

Sugere-se também que deva ser evitado o uso do metronidazol, por tempo prolongado, em associação com outros medicamentos potencialmente hepatotóxicos como, por exemplo, a eritromicina e o paracetamol.

9. CONCLUSÃO

Com base nos resultados aqui apresentados e dentro das condições em que foi realizada esta pesquisa, em ratos, pode-se concluir que o **metronidazol**:

1. Não modifica o grau de atividade sérica das enzimas ALT e AST, se empregado na dose de 7,5 mg/kg de peso corporal, duas vezes ao dia, por 96 horas ;
2. Aumenta a atividade sérica enzimática da ALT, quando empregado nas doses de 15 e de 30 mg/kg, duas vezes ao dia, à partir de 48 horas de tratamento ;
3. Aumenta a atividade sérica enzimática da AST, se utilizado na dose de 30 mg/kg, duas vezes ao dia, e somente após 96 horas de tratamento ;
4. Provoca tais efeitos de forma reversível, reversibilidade esta que já pode ser observada após 96 horas de sua retirada.

10. APÊNDICE

TABELA 5. Valores da atividade sérica da ALT (alanina aminotransferase), por animal, de acordo com o tratamento, nos tempos de 48, 72 e 96 horas.

| TRATAMENTO | <u>TEMPO</u> | | |
|----------------------------|--------------|----------|----------|
| | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| CONTROLE | 33 | 38 | 28 |
| | 34 | 35 | 29 |
| | 40 | 35 | 22 |
| | 30 | 38 | 21 |
| | 37 | 29 | 24 |
| | 36 | 36 | 31 |
| METRONIDAZOL (7,5mg/kg) | 38 | 33 | 28 |
| | 45 | 38 | 29 |
| | 36 | 36 | 29 |
| | 47 | 37 | 26 |
| | 46 | 42 | 30 |
| | 39 | 43 | 26 |
| METRONIDAZOL (15mg/kg) | 42 | 44 | 52 |
| | 36 | 47 | 59 |
| | 54 | 59 | 66 |
| | 48 | 52 | 50 |
| | 60 | 52 | 62 |
| | 54 | 54 | 66 |
| METRONIDAZOL (30mg/kg) | 41 | 47 | 69 |
| | 41 | 64 | 49 |
| | 45 | 49 | 51 |
| | 47 | 52 | 69 |
| | 60 | 50 | 70 |
| | 56 | 58 | 51 |

TABELA 6. Valores da atividade sérica da AST (aspartato aminotransferase), por animal, de acordo com o tratamento, nos tempos de 48, 72 e 96 horas.

| TRATAMENTO | <u>TEMPO</u> | | |
|----------------------------|--------------|----------|----------|
| | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| CONTROLE | 171 | 178 | 170 |
| | 164 | 152 | 158 |
| | 165 | 182 | 159 |
| | 170 | 169 | 165 |
| | 164 | 142 | 165 |
| | 184 | 137 | 156 |
| METRONIDAZOL (7,5mg/kg) | 163 | 169 | 162 |
| | 181 | 186 | 150 |
| | 165 | 158 | 176 |
| | 167 | 176 | 190 |
| | 172 | 184 | 183 |
| | 183 | 169 | 175 |
| METRONIDAZOL (15mg/kg) | 174 | 154 | 149 |
| | 153 | 150 | 183 |
| | 183 | 197 | 197 |
| | 171 | 182 | 152 |
| | 204 | 173 | 182 |
| | 213 | 177 | 194 |
| METRONIDAZOL (30mg/kg) | 172 | 180 | 235 |
| | 170 | 208 | 193 |
| | 166 | 168 | 168 |
| | 199 | 178 | 225 |
| | 189 | 181 | 223 |
| | 204 | 179 | 197 |

TABELA 7. Valores da atividade sérica da ALT e da AST, por animal, de acordo com o tratamento (por 96 horas) e após a retirada da droga..

| ATIVIDADE SÉRICA ENZIMÁTICA | | |
|--------------------------------|------------|------------|
| <i>TRATAMENTO</i> | <i>ALT</i> | <i>AST</i> |
| | 28 | 170 |
| | 29 | 158 |
| Solução salina (Controle) | 22 | 159 |
| <i>96 horas de tratamento</i> | 21 | 165 |
| | 24 | 165 |
| | 31 | 156 |
| | 69 | 149 |
| | 49 | 183 |
| Metronidazol (30mg/kg) | 51 | 197 |
| <i>96 horas de tratamento</i> | 69 | 152 |
| | 70 | 182 |
| | 51 | 194 |
| | 50 | 140 |
| | 54 | 154 |
| Metronidazol (30mg/kg) | 47 | 148 |
| <i>após a retirada a droga</i> | 50 | 149 |
| | 49 | 146 |
| | 48 | 150 |

11. SUMMARY

The aim of this work was to study the effects of metronidazole, a compound employed in trichomoniasis and anaerobic infections treatment, upon hepatic function. For this purpose, 72 male rats Wistar (220 ± 20 g) were treated with metronidazole 7.5 mg/kg, 15 mg/kg and 30 mg/kg or saline (control), BID, for 4 days, intraperitoneal route. 48, 72 e 96 hours after the beginning of the treatment, blood samples were collected to measure the ALT and AST serum activities. The results showed that metronidazole 15 mg/kg and 30 mg/kg promote a significant increase ($p < 0,05$) of ALT values, observed 48 h after treatment. The increase of AST activity only happened 96 h after treatment with metronidazole 30 mg/kg. The reference values of the both enzyme activities became returned to the basal levels after the drug withdrawal. We conclude that the metronidazole does not promote permanent alterations in hepatic function, when employed in short time periods, even in high dosage, in rats.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

1. ALTMAN, E.G. Rational use of metronidazole **Austr. dent. J.**, Saint Leonards, **25(3)**: 135-8, 1980.
2. BEESON, P.B. & McDERMOTT, W. **Tratado de Medicina Interna**. 14. ed., México, Interamericana, 1977. p.585.
3. BESKID, M. *et al.* The influence of metronidazole on ultrastructure of rat's liver. **Mat. Med. Pol.**, Warsaw, **12(4)**:263-265, 1980.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 40 de 20 de fevereiro de 1992. Diário Oficial**, Brasília, 21 fev. 1992. Seção I, p.2246.
5. BRIGGS, G.; FREEMAN, R.; AFFE, S. **Drogas na gravidez e na lactação**. São Paulo, Roca, 1987. p.413.
6. BROGDEN, R. *et al.* Metronidazole in anaerobic infections: A review of its activity, pharmacokinetic and therapeutic use. **Drugs**, Auckland, **16(5)**: 387-417, 1978.
7. DAVIES, A.H.; McFADZEN, J.A.; SQUIRES, S. Treatment of Vincent's stomatitis with metronidazole. **Br. med. J.**, London, **1**: 1149-50, 1964.
8. ELLIS, G. *et al.* Serum enzyme tests in diseases of liver and biliary tree. **Am. J. clin. Pathol.**, Philadelphia, **70(2)**: 248-58, Aug. 1978.

¹De acordo com a NB-66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

9. FINEGOLD, S.M. & MATHISEN, G.E. Metronidazole. *In*: MANDELL, G. et al. **Principles and practice of infectious diseases**, 3.ed. New York, Churchill Livingstone, 1990. p.303-8.
10. GOLDEN, D.P. *et al.* Acetaminophen toxicity. Report of two cases. **Oral Surg.**, Saint Louis, **51(4)**: 385-9, 1981.
11. GREENSTEIN, G. The role of metronidazole in the treatment of periodontal diseases. **J.Periodont.**, Chicago, **64(1)**: 1-15, Jan. 1993.
12. HEAD, T.W. *et al.* A comparative study of effectiveness of metronidazole and penicillin V in eliminating anaerobes from postextraction bacteremias. **Oral Surg.**, Saint Louis, **58(2)**: 152-5, Aug.1984.
13. HEINONEN, O.P.; SLONE, D.; SHAPIRO, S. **Birth Defects and Drugs in Pregnancy**. Littleton, Publishing Sciences Group, 1977. p.298, 299, 302.
14. JENKINS, W.M.M. *et al.* Systemic metronidazole in the treatment of periodontitis. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, **16(7)** : 443-50, Aug.1989.
15. JENSEN, J. & GUGLER, R. Single and multiple dose metronidazole kinetics. **Clin. Pharmacol. Ther.**, Saint Louis, **34(4)**: 481-487, Oct. 1983.
16. KHAMBATTA, R.B. Metronidazole in giardiasis. **Ann. trop. med. Parasitol.**, London, **65(4)**: 487-489, Dec. 1971.
17. KORALKOVAS, A. **Química farmacêutica**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1982.

18. LOESCHE, W.J. *et al.* Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. **J. Periodont.**, Chicago, **55**(6): 323-35, June 1984.
19. _____ *et al.* Effects of metronidazole on periodontal treatment needs. **J. Periodont.**, Chicago, **62**(4): 247-57, Apr. 1991.
20. MARTINDALE **The Extra Pharmacopeia**. 30.ed. London, Pharmaceutical Press, 1991.
21. MCGOWAN, D.A.; MURPHY, K.J.; SHEIMAN, A. Metronidazole in treatment of severe pericoronaritis - a clinical trial. **Br. dent. J.**, London, **142**(7) : 221-3, Apr. 1977.
22. MITCHELL, D.A. Metronidazole:its use in clinical dentistry. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, **11**(3):145-58, Mar.1984.
23. NASTRO, L.J. & FINEGOLD, S.M. Bactericidal activity of five antimicrobial agents against *Bacteroides fragilis*. **J. infect. Dis.**, Chicago, **126**(1): 104-7, July 1972.
24. POWELL, S.J. *et al.* Metronidazole in amoebic dysentery and amoebic liver abscess. **Lancet**, London, **2**(477): 1329-31, Dec. 1966.
25. ROBBINS, S.L. & COTRAN, R.S. **Patologia Estrutural e Funcional**. 2.ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1983. p.852-853.
26. ROE, F.J.C. The safety of metronidazole: a few clouds, but no rain. *In*: FINEGOLD, S.M. **First United States Metronidazole Conference**. 1982. Sec. II, p. 113-123.

27. ROSENBLATT, J.E. & EDSON, R.S. Symposium on antimicrobial agents. Metronidazole. **Mayo clin. Proc.**, Rochester, **62**(11): 1013-17, Nov. 1987.
28. SALLIE, R.; TREDGER, J. M.; WILLIAMS, R. Drugs and the liver. Part 1. Testing liver function. **Biopharm. Drug Dispos.**, England, **12**(4): 251-259, May 1991.
29. SCHUHMANN, C. *et al.* L'antibiothérapie en odonto-stomatologie, évolution depuis 1945 et aspect actuel. **Actual. odontostomat.**, Paris, **39**(150): 229-54, juin. 1985.
30. SCULLY, B.E. Metronidazole. **Med. clin. N. Am.**, Philadelphia, **72**(3):613-21, May 1988.
31. SHERLOCK, S. **Diseases of the liver and biliary system**. Oxford, Blackwell Scientific, 1987.
32. SHINN, D.L.S. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis. **Lancet**, London, **1**: 1191, 1962. [letter]
33. SLOTS, J. & RAMS, T.E. Antibiotics in periodontal therapy : advantages and disadvantages. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, **17**(7): 479-93, Aug. 1990.
34. SMILACK, J.D.; WILSON, W.R.; COCKERILL, F.R. Tetracyclines, cloramphenicol, erythromycin, clindamycin and metronidazole. **Mayo clin. Proc.**, Rochester, **66** (12): 1270-80, Dec. 1991.

35. STAHLBERG, D. *et al.* Neurophysiologic studies of patients with Crohn's disease on long term treatment with metronidazole. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, **26(2)**: 219-24, Feb.1990.
36. TALLY, F.P.; SUTTER, V.L.; FINEGOLD, S.M. Metronidazole versus anaerobes: in vitro data and initial clinical observations. **Calif. Med.**, San Francisco, **117(6)**: 22-6, Dec.1972.
37. TIETZ, N.W. **Textbook of clinical chemistry**. Philadelphia, Saunders,1986. p.671-2.
38. **UNITED States Pharmacopeia** - Drug information for the health care professional. 11.ed. São Paulo, USP- DI@ , 1991. p.1808.
39. van OOSTEN, M.A.; MIKX, F.H.; RENGGLI, H.H. Microbial and clinical measurements of periodontal pockets during sequential periods of non-treatment mechanical debridement and metronidazole therapy. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, **14(4)**: 197-204, Apr. 1987.
40. van WINKELHOFF, A. J. *et al.* Metronidazole plus amoxycillin in treatment of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* associated periodontitis. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, **16(2)**: 128-31, Feb. 1989.
41. VIDIGAL Jr., G.M.; COELHO, W.A.; ANGULO, N.G.C. Efeitos do metronidazol no tratamento periodontal. **Rev. bras. Odont.**, Rio de Janeiro, **49(5)**: 8-15, set./out. 1992.
42. WATTS, T., PALMER, R.; FLOYD, P. Metronidazole: a double-blind trial in untreated human periodontal disease. **J. clin. Periodont.**, Copenhagen, **13(10)**: 939-43, Nov. 1986.