

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

MARIA DAS GRAÇAS VILELA GOULART

***EFEITOS DO VERAPAMIL (Dilacorón®), BLOQUEADOR DOS
CANAIS DE CÁLCIO, NA REGENERAÇÃO DO FÍGADO DE RATOS
APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL.***

**Tese apresentada a Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de doutor em
Odontologia – Área de Farmacologia ,
Anestesiologia e Terapêutica**

PIRACICABA – SP

-2003-

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

MARIA DAS GRAÇAS VILELA GOULART

***EFEITOS DO VERAPAMIL (Dilacoron®), BLOQUEADOR DOS
CANAIS DE CÁLCIO, NA REGENERAÇÃO DO FÍGADO DE RATOS
APÓS HEPATECTOMIA PARCIAL.***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de doutor em Odontologia – Área de Farmacologia , Anestesiologia e Terapêutica

ORIENTADOR:

Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO

Banca examinadora:

**Prof. Dr. José Roberto de Oliveira e Silva
Profa. Dra. Maria Cecília Ferraz Arruda Veiga
Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado
Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho
Profa. Dra. Wilma Pereira Bastos ramos**

PIRACICABA – SP

-2003-

Ficha Catalográfica

G729e Goulart, Maria das Graças Vilela.
Efeitos do Verapamil (Dilacoron®), bloqueador dos canais de cálcio, na regeneração do fígado de ratos após hepatectomia parcial. / Maria das Graças Vilela Goulart. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004.
xviii, 160p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Farmacologia. 2. Enzimas – Análise. I. Mattos Filho, Thales Rocha de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

Dedico o mérito desta conquista:

A DEUS....

A meus pais **HERNANI** (in memoriam) e **CÉLIA**, que através de exemplos de integridade e luta, me ensinaram a cumprir, sempre, o dever com retidão.

Ao **MÁRIO** e a meus filhos, **ROGÉRIO** e **LARA**, co-autores de todos os meus sonhos, companheiros constantes na luta pelas realizações. Por tudo que representam para mim.

Aos **GRANDES MESTRES** e orientadores:

Prof. Dr. **Thales Rocha de Mattos Filho**, pelo exemplo de seriedade e competência profissional, pelos ensinamentos, orientação, amizade e confiança na realização deste trabalho.

Profa. **Dra. Wilma Pereira Bastos Ramos**, por ensinar-me a ir mais além, superando obstáculos e aprendendo a ser cada vez melhor. Pela orientação segura, apoio e incentivo constante à minha formação científica e pelo exemplo de seriedade e competência profissional.

Agradecimentos

À Faculdade de odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, na pessoa de seu Digníssimo Diretor Prof. DR. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO, pela oportuna realização do curso de pós-graduação e pelo apoio institucional oferecido. Meu respeito e reconhecimento.

Aos DOCENTES do curso de pós-graduação em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, pela grande contribuição à minha formação científica. Muito obrigado.

À Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, pela competência profissional, apoio e incentivo durante toda jornada de estudo. Meu reconhecimento e admiração.

À Profa. Dra. GLÁUCIA MARIA B. AMBROSANO, docente da disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, pela competente colaboração na análise estatística dos resultados.

Às bibliotecárias da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, pelo empenho e dedicação no levantamento bibliográfico.

À MARIA ELISA DOS SANTOS, secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, pela carinhosa atenção e constante ajuda em todos os momentos. Meu sincero agradecimento e amizade.

Aos Professores Dr. EDUARDO DIAS DE ANDRADE, Dr. OSWALDO DI HIPÓLITO JÚNIOR e Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO pelas valorosas sugestões durante o processo de qualificação. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Digníssimo Diretor Prof. Dr. MARCOS TADEU TAVARES PACHECO, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos – IP&D/UNIVAP, pela valiosa permissão no desenvolvimento deste trabalho neste renomado Instituto. Meu sincero respeito e reconhecimento.

Ao prof. Dr. JOSÉ CARLOS COGO, da Disciplina de Fisiologia, coordenador do Curso de Ciências Biológicas e do Biotério da Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos– UNIVAP, por gentilmente ceder espaço no biotério, o que contribuiu de maneira importante para o desenvolvimento da parte experimental deste trabalho. Exemplo de dedicação, honestidade e competência profissional. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Aos Profs. Dr. RODRIGO A. B. L. MARTINS e Dr. WELLINGTON RIBEIRO, pelo espaço cedido no Laboratório de Farmacologia e Experimentação Animal da Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos– IP&D /UNIVAP. Meus sinceros agradecimentos.

Ao amigo e Mestre ALEXANDRE YAKIMOFF, pela eficiente colaboração na parte experimental deste trabalho. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO de OLIVEIRA e SILVA, Titular da disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP, inestimável mestre e grande amigo com quem tive a felicidade de conviver por muitos anos. Minha infinita gratidão por seus ensinamentos de valiosa contribuição à minha formação científica.

Ao Prof. Dr. MIGUEL A. CASTILLO SALGADO da disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP, pela paciência, dedicação e brilhante colaboração na orientação dos processos histológicos, análises e interpretação dos resultados. Exemplo de dedicação, seriedade e profissionalismo que merecem ser seguidos. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Ao prof. MIGUEL CHRISTIAN CASTILLO MARIN, da disciplina de Histologia da Faculdade de Odontologia de Taubaté – UNITAU, pela grande colaboração na execução das fotografias apresentadas neste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. EDSON RODRIGUES, da disciplina de Bioquímica da Universidade de Taubaté – UNITAU, pela competente orientação nas análises bioquímicas. Exemplo de integridade, honestidade e competência profissional. Meu grande reconhecimento e admiração.

À profa. MARIA DO SOCORRO CARNEIRO BRITO e a minha filha LARA VILELA GOULART pela brilhante colaboração na revisão, correção do texto e sugestões na redação deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos e eterna gratidão.

Ao meu filho ROGÉRIO VILELA GOULART, que dispendeu pacientemente de muitas horas no computador, a fim de elaborar com eficiência e dedicação a formatação e os gráficos apresentados neste trabalho. A minha eterna gratidão.

Ao CNPq, pela concessão da Bolsa de Estudos de suma importância para a realização desta pesquisa.

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

SUMÁRIO

LISTAS

1. Lista de tabelas, gráficos e fotografias	01
2. Lista de abreviaturas	05
RESUMO	07
ABSTRACT	09
1 – INTRODUÇÃO	11
2 – REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. Canais de cálcio.	19
2.2. Cálcio e lesão hepatocelular	25
2.3. Bloqueadores dos canais de cálcio e verapamil.	30
2.4. Enzimas e hepatotoxicidade.	41
2.5. Regeneração hepática.	47
3 – PROPOSIÇÃO	59
4 – MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1. Animais utilizados	61
4.2. Drogas e doses	61
4.3. Administração do verapamil	62
4.4. Hepatectomia parcial e cirurgia simulada.	62
4.5. Coleta de amostras biológicas.	63
4.5.1. Coleta de sangue e obtenção do soro.	
4.5.2. Coleta e homogeneização do tecido hepático.	
4.6. Análises bioquímicas.	63
4.6.1. Determinação da concentração de Proteínas Totais e Albumina (PT e ALB).	
4.6.2. Determinação da atividade enzimática da Colinesterase (ChE).	
4.6.3. Determinação da atividade enzimática da γ -glutamil transferase (GGT) .	
4.6.4. Determinação da atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (ALP)	
4.6.5. Determinação da atividade enzimática da Aspartato e da Alanina Aminotransferase (AST e ALT)	

4.7. Análise Histológica complementar.....	64
4.8. Sistematização da pesquisa.	64
4.9. Análise Estatística.	68
5 – RESULTADOS	69
5.1. Análises bioquímicas no fígado e soro.	
5.1.1. Concentração de Proteínas Totais	69
5.1.2. Concentração de Albumina	75
5.1.3. Atividade enzimática da Colinesterase (AchE).	81
5.1.4. Atividade enzimática da γ -glutamil transferase (GGT)	86
5.1.5. Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (ALP)	91
5.1.6. Atividade enzimática da Aspartato aminotransferase AST	96
5.1.7. Atividade enzimática da Alanina aminotransferase ALT	101
5.2. Análise Histológica complementar.....	106
6 – DISCUSSÃO	117
7 – CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

LISTAS

1.1. Lista de tabelas, gráficos e fotografias.

Tabela 1 – Concentração de Proteínas Totais (g/dl) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD) 72

Tabela 2 - Concentração de Albumina (g/dl) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 77

Tabela 3 - Atividade enzimática da Colinesterase (U/mL) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 82

Tabela 4 - Atividade enzimática da γ - Glutamil Transferase (U/L) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD)..... 87

Tabela 5 - Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (U/L) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 92

Tabela 6 - Atividade enzimática da Aspartato Aminotransferase (U/L) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 97

Tabela 7 - Atividade enzimática da Alanina Aminotransferase (U/L) em fígado e soro de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 102

Figura 1.A - Concentração de Proteínas Totais (g/dl) em **FÍGADO** de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 73

Figura 1.B - Concentração de Proteínas Totais em **SORO** de ratos dos grupos controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD) 74

Figura 2.A - Concentração de Albumina (g/dl) em **FÍGADO** de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD). 78

Figura 2.B - Concentração de Albumina (g/dl) SORO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	79
Figura 3.A - Atividade enzimática da colinesterase (U/mL) em FÍGADO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	83
Figura 3.B -Atividade enzimática da colinesterase (U/mL) em SORO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	84
Figura 4.A - Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (U/L) em FÍGADO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	88
Figura 4.B - Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (U/L) em SORO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	89
Figura 5.A - Atividade enzimática da γ - Glutamil Transferase (U/L) em FÍGADO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	93
Figura 5.B - Atividade enzimática da γ - Glutamil Transferase (U/L) em SORO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	94
Figura 6.A - Atividade enzimática da Aspartato Aminotransferase (U/L) em FÍGADO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	98
Figura 6.B - Atividade enzimática da Aspartato Aminotransferase (U/L) em SORO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	99
Figura 7.A - Atividade enzimática da Alanina Aminotransferase (U/L) em FÍGADO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	103
Figura 7.B - Atividade enzimática da Alanina Aminotransferase (U/L) em SORO de ratos dos grupos; controle (C), verapamil (V), hepatectomia (H), hepatectomia + verapamil (HV) e laparatomia (L) – (Média±SD).	104

Figura 8.– Corte histológico de parênquima hepático de rato do GRUPO CONTROLE (20dias) exibindo capilares sinusóides e cordões de hepatócitos dentro dos parâmetros de normalidade. HE 40X	107
Figura 9. - Corte histológico de parênquima hepático de rato do GRUPO LAPARATOMIA (20dias) exibindo capilares sinusóides e cordões de hepatócitos dentro dos parâmetros de normalidade. HE 40X	109
Figura 10. – Corte histológico de parênquima hepático de rato do GRUPO HEPATECTOMIZADO (20 dias), apresentando moderada tumefação dos hepatócitos e capilares sinusóides muito congestos. HE 40X	111
Figura 11. – Corte histológico de parênquima hepático de rato do GRUPO HEPATECTOMIZADO + VERAPAMIL (20dias), apresentando leve tumefação dos hepatócitos e capilares sinusoides com aspecto normal. HE 40X	113

1.2 – Lista de abreviaturas

PT	Proteínas Totais
ALB	Albumina
chE	Colinesterase
GGT	γ - glutamil tranferase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartatao aminotransferase
ALT	Alanina aminotrasferase
BCC	Bloqueador dos canais de cálcio
HP	Hepatectomia parcial
Ca ⁺⁺	Íons cálcio
Canais L	Canais lento de cálcio
C	Controle (não tratados com verapamil, não operados)
V	Verapamil (tratados com verapamil, não operados)
H	Hepatectomia (hepatectomizados, não tratados com verapamil).
HV	Hepatectomia + Verapamil (hepatectomizados, tratados com Verapamil)
L	Laparatomia (cirurgia simulada, não tratados com verapamil)
PVPI	Polivinil-pirrolidone iodine
S.P.F	Specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
Ph	Logaritmo negativo da concentração de íons
CT	Calcitonina
PTH	Hormônio paratireóideo
CAM	Calmodulina
VOCs	Canais de cálcio Voltagem-dependentes
ROCs	Canais de cálcio Receptor-dependentes
U/l	Unidades por litro

RESUMO

Têm sido referidos na literatura, efeitos hepatoprotetores de fármacos bloqueadores dos canais de cálcio em lesões hepáticas induzidas por drogas ou hipóxia. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos dessas drogas no fígado em regeneração, nos aspectos funcionais e histomorfológicos. Propôs-se estudar neste trabalho, os efeitos do verapamil, bloqueador dos canais de cálcio, na regeneração do fígado de ratos após hepatectomia parcial. Avaliou-se os efeitos da droga na evolução estrutural e funcional do fígado em regeneração, através da avaliação histomorfológica do órgão e de análises bioquímicas, no fígado e no soro, da atividade enzimática de aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT), colinesterase (chE), fosfatase alcalina (ALP), γ glutamil transferase (GGT) e das concentrações de proteínas e albumina. Utilizou-se 120 ratos Wistar, machos, com idade entre 90-100 dias ao início das experiências, divididos aleatoriamente em 5 grupos. O primeiro grupo foi submetido a hepatectomia parcial e recebeu verapamil, denominado GRUPO HV (n=24). O segundo foi submetido a hepatectomia parcial e não recebeu verapamil, denominado GRUPO H (n=24). O terceiro recebeu verapamil e não sofreu procedimento cirúrgico, denominado GRUPO V (n=24). O quarto foi submetido a cirurgia simulada e não recebeu verapamil, denominado GRUPO L (n=24). O quinto constituiu-se no grupo controle, destituído dos procedimentos cirúrgicos e recebeu água sem adição de verapamil, denominado GRUPO C (n=24). O verapamil foi adicionado na água de beber na dose de 24mg/rato/dia durante quatorze dias antes das cirurgias e após, até o sacrifício dos ratos. As cirurgias foram realizadas sob anestesia com ketamina (10mg/Kg) e xilazina (4mg/Kg). Na hepatectomia parcial retirou-se o lóbulo mediano e lateral esquerdo, permanecendo na cavidade abdominal do rato, o “fígado residual” para o processo de regeneração. Na cirurgia simulada, realizou-se a extrusão e manipulação dos respectivos lóbulos hepáticos, devolvendo-os intactos na cavidade abdominal. Decorridos 10, 20 e 30 dias da hepatectomia parcial, por laparotomia, realizou-se a retirada do fígado e coleta de sangue. Paralelamente, considerando os mesmos tempos, retirou-se fígado e sangue dos animais dos outros grupos experimentais. Utilizou-se 8 ratos de cada grupo para cada tempo. Os lóbulos mediano e lateral esquerdo do fígado de todos os ratos foram divididos em duas partes. Uma porção foi fixada em formol a 10% e

preparada para histologia, usando coloração por HE. A outra porção (1g) de tecido hepático, assim como as amostras de sangue foram preparadas para análises bioquímicas. Para estudo histopatológico, considerou-se presença de esteatose, necrose e tumefação dos hepatócitos. Para análise estatística dos resultados bioquímicos, utilizou-se análise de variância ANOVA e teste de TUCKEY. Os resultados mostraram que, embora o sistema enzimático tenha se mostrado comprometido pelo estresse cirúrgico, o verapamil não induziu sinais de intoxicação ou morte dos ratos em nenhum dos grupos tratados, durante todo o experimento. O verapamil, na dose de 24mg/rato/dia, aumentou a síntese de proteínas, a atividade enzimática da colinesterase e da ALP quando o tecido hepático foi agredido pela cirurgia, traduzindo recuperação da capacidade metabólica favorável à recuperação funcional e ao crescimento do tecido hepático. O verapamil diminuiu a atividade das enzimas marcadoras de dano hepatocelular (GGT, AST e ALT) paralelamente à diminuição do grau de intensidade do edema intracelular, comprovado por microscopia ótica, indicando recuperação funcional do parênquima hepático. Sugerindo efeitos hepatoprotetores quando o fígado é lesado pela remoção de 2/3 do tecido após hepatectomia parcial.

Palavras chaves: bloqueador dos canais de cálcio, verapamil, hepatectomia parcial, regeneração hepática.

SUMMARY

Literature describes a hepatic protection effect of calcium channel blocker drugs in liver damage induced by drugs or hypoxia. However a very few data refers to the influence of such drugs on functional and histomorphological responses during liver regeneration. The aim of the present research is to study the role of verapamil, a classical calcium channel blocker, on the liver regeneration in partially hepatectomized rats. It was studied the effects of the drug on the structural and functional development of regenerating liver by histomorphological and biochemical evaluation, being determined in serum and liver: aspartate and alanine aminotransferase (AST and ALT), cholinesterase (AChE), alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyltransferase (GGT) as well as protein and albumin. It was used 120 male Wistar rats, aged 90-100 days at the starting of the experiments, randomly divided in five groups. The first one was submitted to partial hepatectomy and treated with verapamil (24mg/rat/day), called HV GROUP. The second group undergo to partial hepatectomy but rats were not treated with verapamil- H GROUP. The third one rats were treated with verapamil but not hepatectomized – V GROUP. The fourth group was submitted to sham operation and not treated with verapamil – L GROUP. The fifth was a control, not operated and not treated with verapamil- C GROUP. The drug was given by oral route, being added to the drinking water along 14 days before the surgery and during the experimental period, up to the sacrifice. Surgery was performed under Ketamine (10 mg/Kg) and Xylazine (4mg/Kg) anesthesia. In partial hepatectomy, the median and left lateral lobules were excised, remaining in the abdominal cavity the called “residual liver”, to regeneration. Sham operation was performed using the same procedures of partial hepatectomy, without excision of lobules. After 10, 20 and 30 days of partial hepatectomy, laparotomy was performed, being excised the remaining liver and blood samples taken to biochemical analysis. It was run in parallel the excision of the liver and taken blood samples of the other groups. The liver was divided in two parts, one to histology (fixed in 10% formaldeide and stained in HE). Another part was prepared to biochemical analysis, in parallel with serum samples. Histopathology was performed, being observed steatosis, necrosis and hepatocytes swelling. To statistical evaluation of data,

variance ANOVA analysis and TURKEY tests were used. Results show that the enzymatic system is disturbed by the surgical procedures but no toxic response to verapamil was observed. In the regenerating liver verapamil stimulated the protein synthesis, as well as increased the cholinesterase and alkaline phosphatase enzymatic activities, indicating metabolic and functional recuperation of the organ. On the other hand, the enzymes GGT, AST and ALT significantly raised after hepatectomy, returning to normal values at the 30th day, indicating a final recuperation of hepatocellular disturbances. Verapamil diminished intracellular swelling in the regenerating liver, indicating a hepatoprotection induced by the drug.

Key words: calcium channel blocker, verapamil, liver regeneration, partial hepatectomy.

1 – INTRODUÇÃO

O íon cálcio é um importante elemento na constituição e função celular do organismo, envolvendo processos fisiológicos e bioquímicos essenciais para a manutenção do equilíbrio do meio interno. Aparece em grandes quantidades nos tecidos ósseo e dentário e em pequenas proporções na membrana e no citoplasma das células dos tecidos moles e no líquido extracelular, sendo seu equilíbrio regulado pela calcitonina, vitamina D e hormônio paratireóideo. Está constantemente presente nas membranas celulares das células hepáticas, sendo essencial para manter a homeostasia iônica dos hepatócitos. Qualquer alteração pronunciada nos níveis de cálcio na membrana dos hepatócitos pode afetar diretamente a integridade da membrana citoplasmática, causando danos às células. A maioria das lesões hepáticas produzidas por drogas e/ou traumatismos é cálcio-dependente e envolve interação com o citocromo P-450 promovendo formação de metabólitos e radicais livres que podem ser altamente reativos e tóxicos para as células. Esses radicais livres se ligam por covalência a pontos críticos da membrana celular dos hepatócitos promovendo peroxidação lipídica, desintegrando o citoesqueleto, alterando a morfofuncionalidade mitocondrial, modificando o cálcio intracelular com ativação de enzimas catabólicas com efeitos celulares potencialmente deletérios (De LEVE & KAPLOWITZ, 1975; RECHNAGEL & GLENDE, 1973, KAPLAN, 1993). Dentre as enzimas ativadas pelo cálcio, estão incluídas as fosfolipases, proteases e as ATPases envolvidas no transporte transmembrana, síntese de proteínas, lipogênese e reações de desacilação/reacilação necessários à renovação de fosfolipídios, e as endonucleases que estão associadas à fragmentação de cromatina (DELEVE & KAPLOWITZ, 1975; KAPLAN, 1993; COTRAN *et al*, 1996).

Um dos mecanismos regulatórios da entrada de cálcio nas células ocorre através de canais de cálcio específicos e depende de estimulação (BOLTON, 1979, STRYER, 1992). Os canais de cálcio são constituídos por proteínas que atravessam a membrana celular favorecendo a entrada seletiva destes íons. São ativados durante a despolarização e repolarização celular, sendo, por isso, chamados “voltagem-dependentes”.

TSIEN *et al.* (1987), através da técnica de “patch-clamp” propuseram a existência de três tipos de canais voltagem-dependentes distintos: L, T e N. Os canais lentos de cálcio do tipo L, são dominantes nos músculos cardíaco e vascular. Outros importantes tipos de canais de cálcio são chamados “receptor-dependentes”, sendo ativados por estimulação de receptores da membrana celular (BOLTON, 1979; SNYDER & REYNOLDS, 1985, RANG & DALE, 1993, GOODMAN & GILMAN, 2000).

Várias substâncias são bloqueadoras dos canais de cálcio, atuando por inibir a entrada do íon no interior das células, ou a sua mobilização a partir de estoques intracelulares, sendo denominadas genericamente “bloqueadores dos canais de cálcio”. A denominação “bloqueadores dos canais de cálcio” distingue esse grupo de drogas de outros antagonistas que agem por diferentes mecanismos, como sejam o magnésio, manganês, cobalto, antibióticos aminoglicosídeos e a toxina botulínica. (TRIGGLE & SWANY, 1980; KALANT & ROSCHLAU, 1991; RANG & DALE, 1993, KATZUNG, 1994).

Os bloqueadores de canais de cálcio inibem o binômio excitação-contracção das células musculares lisas e miocárdicas, impedindo a utilização do fosfato energético dependente de cálcio e o consumo de oxigênio levando como resultado final a uma depressão da atividade celular. Conseqüentemente, são úteis no tratamento da hipertensão arterial, anginas do peito, arritmias cardíacas e em outras patologias cardiovasculares. Podem atuar também em outros processos fisiológicos importantes, como: secreção glandular, liberação de neurotransmissores, coagulação sangüínea e função plaquetária (NAYLER *et al.*, 1987; RADDINO *et al.*, 1987; BODE *et al.*, 1994). Dos muitos bloqueadores dos canais de cálcio sintetizados, são amplamente usados na clínica médica, o verapamil (fenilalquilamina), o diltiazem (benzotiazepina), a nifedipina e a isradipina (diidropiridinas). As primeiras drogas bloqueadoras dos canais de cálcio foram introduzidas na prática clínica há mais de 25 anos, sendo o verapamil considerado protótipo deste grupo de drogas (SNYDER & REYNOLDS, 1985).

O verapamil foi o primeiro agente bloqueador dos canais de cálcio, usado clinicamente por tempo prolongado no tratamento de arritmias cardíacas, hipertensão arterial e *angina pectoris*. Seu uso terapêutico está principalmente relacionado com a ação

sobre canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, inibindo a entrada de cálcio nas células ou a sua mobilização a partir de estoques intracelulares (FLEKENSTEIN *et al.*, 1967; NOWYCKY *et al.*, 1985). Embora sua ação bloqueadora dos canais de cálcio seja específica para músculo liso vascular e fibras musculares do sistema cardíaco de condução, interfere também com os processos fisiológicos dependentes de cálcio, que são muito importantes para o desenvolvimento dos tecidos biológicos. É um derivado da papaverina, com estrutura química $C_{27}H_{38}O_4$, com um perfil farmacocinético bem definido. É bem absorvido pelo trato gastrointestinal, porém sua biodisponibilidade é baixa (24%) como consequência de uma primeira passagem pelo fígado, onde 90% se liga às proteínas plasmáticas. Os efeitos eletrofisiológicos são evidentes 1 a 2 horas após administração oral, com uma concentração plasmática máxima entre 3 a 5 horas. Quando administrado por via intravenosa, o efeito é precoce, iniciando-se após 1 - 2 minutos com um pico de concentração plasmática máxima observado em 10 - 15 minutos. Possui nestas circunstâncias, um efeito hipotensor fugaz com pico de ação em 5 minutos e duração de 10 a 20 minutos. É metabolizado pelo fígado, onde se transforma em nor-verapamil, um metabólito biologicamente ativo, menos potente como vasodilatador. Tem meia-vida plasmática em torno de 6 horas, sendo eliminado pela urina (ANDERSON *et al.*, 1986; WEINER, 1988; STORTEIN *et al.*, 1981; RIBEIRO & MUSCARÁ 2001).

Estudos dos efeitos dos bloqueadores dos canais de cálcio sobre o transporte duodenal, absorção e excreção de cálcio foram realizados por FOX & GREEN (1986), SJÖDEN *et al.* (1987) e PENTO & JOHNSON (1983), concluindo que o tratamento crônico do verapamil em doses orais elevadas influencia diretamente a translocação de cálcio no intestino, afetando a homeostasia deste íon.

A resposta farmacodinâmica do verapamil se encontra alterada em pacientes portadores de doença hepática. Esses pacientes apresentam um elevado risco de acúmulo do fármaco no organismo, levando ao aparecimento de efeitos tóxicos, devendo a dosagem ser diminuída. A cirrose hepática diminui a depuração (clearance) sistêmica total e aumenta a biodisponibilidade do verapamil. (ECHIZEN & EICHELBAUM, 1986; ENE & ROBERTS, 1987, McINNES, 1988). Dessa forma, tem-se reconhecido uma maior

preocupação em relação ao emprego terapêutico desses fármacos em portadores de disfunção hepática.

Efeitos de bloqueadores de canais de cálcio sobre o desenvolvimento de tecidos têm sido descritos. Com relação ao tecido ósseo, vários autores têm demonstrado que podem influenciar no desenvolvimento e na mineralização óssea (FLECKENSTEIN *et al.*, 1967; SIMEKOWA *et al.*, 1987; CHAGNAC *et al.*, 1989; GRYGORCZYK *et al.*, 1989; DATTA *et al.*, 1990; RICHTIE *et al.*, 1994; SAMNNEGARD & SJÖDÉN, 1992; AMORIM, 1995; VILELA-GOULART *et al.*, 1999). Administrado a ratas prenhes, o verapamil induz intensa estimulação de folículos ovarianos (VILELA-GOULART *et al.*, 1999). O verapamil e outros bloqueadores dos canais de cálcio induzem hiperplasia gengival reversível em pacientes tratados (PERNU *et al.*, 1989; GARZINO-DEMO *et al.*, 1998), sendo que FUJII *et al.* (1994) descreveram que essas drogas induziram aumento da proliferação celular, da síntese de DNA e do colágeno em fibroblastos de pacientes com hiperplasia gengival, *in vitro*. SANK *et al.* (1989), estudando o papel do cálcio na cicatrização de feridas crônicas, descreveram que o verapamil, ao contrário do cálcio, acelerou o fechamento das mesmas, sugerindo estimulação da síntese de colágeno. LEE & PING (1990) observaram em matrizes de colágeno com população de fibroblastos, que o verapamil e a nifedipina, *in vitro*, inibiram a incorporação de prolina na matriz de proteína extracelular, sugerindo a indicação dessas drogas no tratamento de hipertrofia e quelóide cicatriciais.

Estudos recentes têm demonstrado ação do verapamil e de outros bloqueadores dos canais de cálcio (BCC) em lesões hepáticas experimentais induzidas por agentes como calor e hipóxia ou por drogas hepatotóxicas, tendo sido relatado efeito hepatoprotetor em algumas condições (BOWERS *et al.*, 1987; DEAKIN *et al.*, 1991; MATSUDA, 1991; LIANG & THURMAN, 1992; DIMOVA *et al.*, 1995; SCHMITZ *et al.*, 1995).

Estando bem demonstrada a ação do verapamil sobre tecidos em desenvolvimento, inferindo efeitos protetores em lesões hepáticas induzidas por drogas,

como acima referido, é válido supor-se que essa droga possa também interferir no processo de regeneração hepática em animais submetidos à hepatectomia parcial.

A capacidade de regeneração do fígado é conhecida desde a antiguidade, sendo referida na mitologia grega com a lenda de Prometeu, cujo fígado, arrancado por uma águia, como castigo de Zeus, continuamente se regenerava. O fenômeno da regeneração hepática tem despertado continuado e sempre atual interesse, haja vista a abundância de literatura publicada sobre o assunto. Trabalhos experimentais têm sido realizados em diversos animais, como cão e porco, porém o rato e o camundongo são os mais utilizados, realizando-se estudos *in vivo*. Em ratos, quando cerca de 70% do fígado é removido cirurgicamente (segundo o método clássico descrito por HIGGINS & ANDERSON, em 1931), a porção residual cresce e rapidamente, com restauração de todas as estruturas: lóbulos, vasos, ductos biliares. Já nas primeiras horas de cirurgia ocorre aumento da síntese de proteínas (SCHULTZE & OEHLERT, 1961), de atividade mitótica e de enzimas diversas (WEINBREIN & FITCHEN, 1959; BREBNOR & BALINSKI, 1983). Enquanto que a regeneração é aparentemente completa após o 15º dia (BUCHER, 1963), a recuperação funcional parece ocorrer mais tardiamente (MATTOS FILHO & BASTOS-RAMOS, 1977). A regeneração ocorre mesmo após cirurgias sucessivas (BELIAEVA, 1977). A relação entre o volume de ressecção e a regeneração foi estudada por KAHN *et al.* (1988). Vários tipos de fatores de crescimento e inibidores hepáticos têm sido descritos (RICHMEN *et al.*, 1976; NAKAMURA *et al.*, 1988). Apesar dos consideráveis avanços, os fatores regulatórios da replicação do DNA nos hepatócitos são desconhecidos (HIGATSHITSUJI *et al.*, 1995). Um fator de crescimento dos hepatócitos (HGF) foi identificado por NAKAMURA *et al.* (1989), MIYAZAWA *et al.* (1989), ZARNEGAR e MICHELOPOULOS (1990), ZANEGAR *et al.* (1991). O processo de regeneração, em ratos, se inicia imediatamente após a cirurgia, dobrando o peso do órgão após 48 horas. Conforme relatado por TSUKAMOTO *et al.* (1993), a primeira resposta regenerativa, isto é, transição das células remanescentes das fases G0 para G1, ocorre dentro da primeira meia hora após a operação; a síntese de DNA começa após cerca de 18 horas. Ainda de acordo com esses autores, a síntese do DNA pode ser traduzida pela indução das enzimas timidilatosintetase e timidinoquinase no tecido em regeneração. Estudo relativo à

recuperação funcional do fígado em regeneração, traduzido pela capacidade de metabolizar o metohexital foi realizado por MATTOS FILHO & BASTOS-RAMOS (1977) e MATTOS FILHO (1984).

Para avaliação do índice de regeneração hepática, vários parâmetros têm sido adotados, como sejam o aumento do volume e peso do órgão em crescimento, índice mitótico, determinação de enzimas envolvidas na síntese de ácido nucléico, determinação de DNA e RNA, capacidade funcional do tecido hepático em sintetizar proteínas, entre outros. Optou-se, no presente trabalho, por estudar a atividade enzimática de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), γ glutamil transferase (GGT) e bem como da colinesterase, apoiados em evidências de que são enzimas encontradas em vários tecidos, porém com concentrações relativamente elevadas no fígado, conseqüentemente, comportam-se como sensíveis indicadores de lesões patológicas deste órgão.

As aminotransferases séricas – aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) – são marcadores sensíveis de danos às células hepáticas, sendo úteis no reconhecimento de doenças hepatocelulares agudas e crônicas, em vários tipos de hepatite assim como de lesões experimentais promovidas pela remoção de tecido hepático nos estudos de regeneração hepática (MATTOS-FILHO, 1976.; ARAUJO, 1992).

A elevação nos níveis de atividade destas enzimas reflete o aumento de permeabilidade das membranas celulares, o que favorece seu extravasamento, desencadeando necrose do parênquima hepático, constituindo-se em identificadores de lesão hepática (KAPLAN, 1993.; HENRY, 1995.; ANDERSON & COCKAYNE, 1995). A ALT é uma enzima citossólica com alta atividade em nível hepático e com baixa atividade no coração, músculo esquelético, rins, pâncreas e baço. A AST é encontrada no citosol e mitocôndrias das células hepáticas, cardíacas, musculares esqueléticas e renais, onde apresentam elevada atividade, e bem como no pâncreas, baço e pulmões, onde a concentração é desprezível. Os níveis de AST são mais elevados do que os da ALT, em função da primeira ser encontrada simultaneamente em dois compartimentos biológicos

(ANDERSON & COCKAYNE, 1995; KAPLAN, 1993; HENRY, 1995.; ZIMMERMAN, 1974).

A fosfatase alcalina (ALP) compreende um grupo de enzimas fosfohidrolases que apresentam atividade máxima em pH alcalino, próximo de 10. É encontrada em vários tecidos, com maior concentração no fígado, epitélio do trato biliar e no osso. No fígado, tem afinidade pela membrana plasmática dos hepatócitos. O fracionamento das isoenzimas da ALP é útil para diferenciar doenças ósseas de doenças hepáticas. Assim a isoenzima de origem hepática (ALP₁) é termo-estável enquanto que a fração óssea (ALP₂) é inativada pelo calor. Níveis elevados de ALP ocorrem em doenças hepatocelulares como a hepatite aguda viral, cirrose hepática, metástase hepática e outras (COLEMAM, 1966; ROY, 1970).

A γ glutamil transferase (GGT) é uma enzima encontrada em concentração relativamente alta nos rins, pâncreas, fígado e próstata. No fígado se localiza na membrana plasmática dos hepatócitos estando significativamente elevada nas doenças obstrutivas hepatocelulares. A GGT é mais específica que a ALP e AST para avaliar doenças hepáticas, pois ela não se eleva nas doenças ósseas como a ALP nem nas doenças do músculo esquelético como a AST (WESTGARD, 1981).

A colinesterase sérica ou pseudo colinesterase é sintetizada no fígado. Pelo fato de encontrar-se diminuída em todas afecções hepáticas parenquimatosas difusas como: hepatite virótica, cirrose, neoplasma maligno metastático, necrose amebiana do fígado, tornou-se grande indicador de danos celulares aos hepatócitos (GRAY, 1971.; DIETZ, 1973).

Desta forma a determinação laboratorial destas enzimas tem grande significado clínico para diagnóstico de doenças hepatocelulares, em humanos, tais como: hepatite viral e tóxica, cirrose hepática, hepatopatia alcóolica aguda, metástase hepática, necrose amebiana do fígado entre outras.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1-Cálcio e canais de cálcio

O íon cálcio está envolvido em muitas funções celulares precisamente reguladas e interligadas, de superior importância para a vida das células. Participa de forma importante de muitos processos celulares e extracelulares, incluindo proteólise dos componentes do plasma – coagulação sanguínea e geração de cininas vasoativas – sinalização celular, manutenção do potencial de membrana, contração muscular, endocitose e exocitose, além de, juntamente com o fosfato ser um elemento fundamental na composição dos cristais de hidroxiapatita, que dão resistência ao tecido ósseo e dentário. Aparece em grandes proporções nos tecidos ósseo e dentário e em pequenas quantidades na membrana e no citoplasma das células dos tecidos moles e no líquido extracelular, sendo seu equilíbrio regulado pela calcitonina, hormônio paratireóideo e vitamina D. É necessário para a função cardíaca normal, integridade dos sistemas nervoso e muscular, além de regular processos bioquímicos de importância vital tais como: reações enzimáticas, processos secretórios e liberação de neurotransmissores (CHEUNG *et al.*, 1986; FARBER, 1987; ORRENIUS *et al.*, 1989; AIRES *et al.*, 1990; DAWSON *et al.*, 1990; NICOTERA, 1990-1992; STRIGOW & BOHNENSAK, 1993).

O cálcio sérico se mantém, no homem, numa concentração razoavelmente constante de 5,0 mEq/L, onde existe em três formas diferentes: complexado com ânions citrato e fosfato, ligado a proteínas principalmente a albumina e ionizado que é a fração biologicamente ativa.

Nas células vivas, o cálcio plasmático é mantido dentro de limites muito estreitos, sendo os níveis de cálcio citosólico (10^{-6} M) quando comparados com aqueles dos compartimentos extracelular e intrareticular (10^{-3} M). Isso é alcançado pela compartimentalização do cálcio livre ATP-dependente dentro da mitocôndria e retículo

endoplasmático, extrusão de cálcio livre pela membrana plasmática e quelação de cálcio livre citosólico pelas proteínas celulares. Esses processos estão largamente interligados e firmemente controlados por mecanismos de retroalimentação que envolvem múltiplas glândulas e tecidos (CAROFOLI, 1987; DAWSON,1990; DEAKIN *et al.*,1991; AIRES *et al.*, 1991; GAFFIN,1999). Alterações dos níveis de cálcio biologicamente ativo podem provocar desordens nos processos bioquímicos e fisiológicos, ameaçando a vida humana (HARPER, 1994), o que o torna de grande importância nos vários campos de pesquisas.

Além de ser responsável por processos essenciais ao equilíbrio do meio interno, o cálcio está constantemente presente na membrana celular das células hepáticas, sendo essencial para manter a homeostasia iônica dos hepatócitos. Quaisquer alterações mais pronunciadas nos níveis de cálcio na membrana dos hepatócitos podem afetar diretamente a integridade da membrana citoplasmática, causando danos às células hepáticas (DELEVE & KAPLOWITZ, 1975; BOWERS *et al.*, 1987; RECHNAGEL *et al.*, 1989 DEAKIN *et al.*, 1991; AMORIM *et al.*, 1995). O cálcio exerce também função determinante nos mecanismos celulares envolvidos em múltiplos processos patológicos e toxicológicos, incluindo arritmias cardíacas, cirrose hepática, intoxicações induzidas por drogas como paracetamol, acetaminofem, tetracloreto de carbono (CCl₄) entre outras (ERWIN *et al.*,1986; ORRENIUS *et al.*, 1989, NICOTERA, 1990; DEAKIN *et al.*, 1991; DIMOVA *et al.*, 1995).

De acordo com BOLTON (1979); STRYER (1992) a entrada de cálcio no citosol se faz através de canais de cálcio específicos e depende de estimulação.

Os canais de cálcio são constituídos por proteínas que atravessam a membrana celular favorecendo a entrada seletiva destes íons. Internamente, nestes canais, existem regiões com cargas elétricas que servem de “portões”, os quais determinam a abertura ou o fechamento dos canais, permitindo assim a passagem dos íons através da membrana celular, frente a estímulos como mudanças morfológicas, elétricas, hormonais e de receptores vizinhos. Tal mecanismo é ativado durante as despolarizações e repolarizações (alterações de voltagem) das células contráteis, por isso são chamadas “voltagens dependentes”. Outro mecanismo de ação dos canais de cálcio decorre da estimulação de receptores de membrana

(receptores beta adrenérgicos) provavelmente, mediado por alterações intracelulares de AMPc (adenosina 3' 5', mono-fosfato) promovendo abertura destes canais. Devido ao fenômeno de abertura ter sido desencadeado pelo estímulo de receptor, tais canais são chamados “receptor-dependentes”. (BOLTON, 1979; SNYDER & REYNOLDS, 1985, SCHRAM & TOWART, 1985; GAFFIN, 1987; RINK, 1990; RANG & DALE, 1993)

TSIEN *et al.*, 1987, através da técnica de “patch-clamp” (clampeamento de voltagem aplicado à célula isolada) observaram que evidências eletrofisiológicas sugerem a existência de três tipos de canais de cálcio, voltagem-dependentes: L, T e N distintos, com base em várias propriedades como grande condutância, transitórios quanto à abertura, ou neuronais quanto à distribuição nos tecidos.

Dentre os três tipos de canais de cálcio, os mais conhecidos são os canais lentos de cálcio do tipo L, dominantes nos músculos cardíaco e vascular, onde estímulos repetidos provocam sucessivas aberturas com corrente de longa duração e são ativados em voltagens positivas para -10mV. Estão presentes em células glandulares e neuronais, constituindo o tipo de canal que participa no acoplamento excitação-contração. Acredita-se que os canais N, responsáveis pelo influxo de cálcio que desencadeia a liberação de neurotransmissores, existem somente nas membranas neuronais, sobretudo nas terminações axônicas, enquanto que os canais T estão presentes em células musculares esqueléticas e glandulares, e são ativados em voltagens positivas para -70mV, (TRIGGLE *et al*, 1980; ; SANK *et al* 1989; ZSOSTER *et al*, 1983; NOWYCKY, 1985, SCHRAM & TOWART, 1985; COGNARD, 1986; TSIEN *et al.*, 1987; CAROFOLI, 1987).

A aplicação de um estímulo efetivo à célula muscular, abre os canais de cálcio, provoca seu influxo para dentro da célula que, por sua vez, desencadeia eventos intracelulares os quais resultam em contração muscular. Vários tipos de drogas antagonistas podem alterar essa seqüência de eventos que dependem da presença de cálcio (BOLTON, 1979; KALANT & ROSCHLAU, 1991).

A multiplicidade de ação do cálcio envolvida nas bases bioquímicas que regem os princípios básicos da função hepática, tornou-se objeto de estudos de vários pesquisadores ao longo dos anos.

Assim, SIES *et al.* (1981) estudaram o efluxo de cálcio hepático no retículo endoplasmático de fígado intacto de ratos, durante o processo de oxidação de drogas, dependente do citocromo P-450 monoxigenase, e concluíram que a razão NADPH / NADP⁺, diminui significativamente para aproximadamente a metade dos valores do controle. O efluxo de cálcio das células hepáticas dentro do espaço extracelular é disparado pelo aumento do fluxo de elétrons através do sistema dependente do citocromo P-450 monoxigenase, por adição de drogas como o metirapona, etilmorfina e aminopirina no substrato.

TAYLOR *et al* (1984), estudaram os efeitos de concentração de K⁺ no movimento e no metabolismo de cálcio hepático de ratos e verificaram que fígado perfundido na presença de 60mM de K⁺, induz rápidas respostas aos eventos metabólicos sensíveis ao cálcio, tais como glicogenólise, razão NADH / NAD citoplasmática e mitocondrial. Tais respostas não foram observadas na ausência de cálcio, visto que as respostas ao K⁺ foram abolidas pelo verapamil, diltiazem e N⁺⁺, indicando ativação de canais de cálcio pelo K⁺, sugerindo presença destes canais na membrana plasmática dos hepatócitos.

As alterações na compartimentalização do cálcio intracelular associadas à inibição de efluxo de cálcio em hepatócitos isolados de ratos, foram pesquisados por BELLOMO *et al*, (1984). Usando o quelante de cálcio quin-2, relataram evidências do envolvimento crítico do sistema de extrusão de cálcio da membrana plasmática, na regulação fisiológica do cálcio livre. Sugeriram que, a função da mitocôndria é mais importante que a função do retículo endoplasmático na regulação dos níveis de cálcio livre citosólico, quando a bomba de cálcio é inibida na membrana plasmática. Ainda em 1984, POGGIOLI e colaboradores trabalhando também com hepatócitos isolados, propuseram que existe uma relação inversa entre o influxo de cálcio e a concentração de cálcio intracelular e isso pode ser alterado por ação de mediadores químicos mobilizadores de cálcio tais como a epinefrina, vasopressina e angiotensina II. A ligação desses agentes em seus receptores abole a ação regulatória do cálcio interno nos respectivos canais, possivelmente pela supressão dos sítios inibitórios, por eles mesmos ou por mudança de sua

afinidade ao cálcio. Ainda dentro da linha de pesquisa com hepatócitos isolados do fígado de ratos, o trabalho realizado por HUGHES *et al.* (1986) mostrou que as alterações na concentração plasmática de cálcio, atuam como segundo mensageiro intracelular na ação de muitos hormônios nas células do fígado. Usando drogas bloqueadoras dos canais de cálcio no meio de incubação, concluíram que o verapamil e a nifedipina inibem o transporte de cálcio na membrana plasmática dos hepatócitos através de um transportador de cálcio ativado pela vasopressina que é diferente, em natureza, dos canais de cálcio das células excitáveis e do transportador de cálcio presente nos hepatócitos na ausência de hormônios.

Uma revisão bibliográfica feita por MAUGER & CLARET (1988), trouxe grande colaboração no sentido de esclarecer os mecanismos envolvidos na entrada de cálcio nas células hepáticas. A explanação de MAUGER & CLARET revela que foram encontrados nas células hepáticas, diferentes tipos de canais de cálcio. Em hepatócitos isolados de ratos, os eventos bioquímicos que envolvem a ligação de trifosfato de adenosina (IP₃) no seu respectivo receptor estimulando a liberação de cálcio dos estoques intracelulares através da membrana plasmática, levou a identificação de canais de cálcio operados por receptor, genericamente conhecidos por canais de cálcio receptor-dependente (ROCs). A entrada de cálcio nos hepatócitos, pode acontecer, ainda, pela estimulação de hormônios que usam IP₃ como segundo mensageiro intracelular, aumentando o influxo de cálcio através da membrana plasmática, evidenciando presença de canais de cálcio hormônio-dependente. O influxo de cálcio nas células hepáticas pode ser inibido por drogas bloqueadoras dos canais de cálcio, como o verapamil, diltiazem e nifedipina, o que sugere a existência de canais de cálcio voltagem-dependente do tipo-L (VOCs) na membrana plasmática dos hepatócitos, cuja abertura depende de um potencial de membrana.

COMBETTES *et al.* (1990) relatam que a transferência de cálcio extracelular pela membrana das células de mamíferos é definida como influxo unidirecional. No fígado, o movimento de cálcio dentro das células acompanha a diminuição da amplitude de um gradiente eletroquímico aproximadamente para 2×10^{-4} . A concentração de cálcio no plasma e a concentração de cálcio intracelular giram em torno de 2mM e 100mM, respectivamente. O influxo de cálcio é também facilitado por potencial

de membrana (-35mV), difusão passiva por canais específicos que se abrem pela ação de hormônios ou neurotransmissores, assim como por difusão facilitada mediada por carreador. A entrada de cálcio nas células é feita por duas maiores organelas transportadoras de cálcio: a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Existem evidências, com estudo de detalhe enzimático e sistema de transporte, que o efluxo ativo de cálcio unidirecional é dirigido pela alta afinidade $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$, que é ativa em concentrações micromolares de cálcio livre no citosol. Este transportador é responsável pela regulação da concentração de cálcio intracelular de maneira permanente e é o único processo que permite a transferência de cálcio nas células. O carreador tem, também, importante função no retorno do cálcio intracelular para níveis basais, sempre que o influxo de cálcio e/ou a liberação dos estoques internos aumentam.

STRIGGOW & BOHNENSACK (1993) relatam que em células não excitáveis como os hepatócitos, o aumento da concentração de cálcio intracelular resulta da ativação de cálcio dos estoques intracelulares e do retículo endoplasmático, via fosfolipase C ligando a cascata do IP3 e da entrada de cálcio mediada por receptor através dos canais de cálcio receptor operados (ROCCs). Demonstraram que os bloqueadores dos canais de cálcio do tipo L, verapamil e diltiazem, inibem a oscilação de cálcio intracelular e também os canais de cálcio receptor operados existentes nos hepatócitos de ratos.

Recente trabalho realizado por CAO & CHATTON (1998) relata que a ativação da calmodulina – proteína ligante de cálcio – resultante do aumento da concentração de cálcio citosólico associada ao esvaziamento dos estoques intracelulares de cálcio, está envolvida no disparo da abertura e da entrada de cálcio nos canais de cálcio operados nos hepatócitos.

CRENESSE *et al*, (1999), trabalhando com cultura primária de tecidos, estudaram o influxo de cálcio em hepatócito submetidos a sucessivas sessões de hipoxia pelo calor e reoxigenação, na presença de BCC diltiazem, gallopamil e inibidor Na^+/K^+ (HOE-694⁺). Verificaram que o diltiazem, devido ao complexo mecanismo de ação com diferentes funções fisiológicas envolvendo a invasão de cálcio nos hepatócitos, inibe significativamente o influxo de cálcio nos hepatócitos de ratos, com maior potência após

reoxigenação, sugerindo que o diltiazem pode bloquear o influxo de cálcio via canais de cálcio receptor dependentes (ROCCs) existentes nos hepatócitos.

2.2 -Cálcio e lesão hepatocelular

Todas as células do organismo estão banhadas por um fluido biológico muito rico em cálcio (10^{-3} M) enquanto que as concentrações de cálcio intracelular são muito baixas (10^{-6} M). Um largo gradiente eletroquímico é mantido pela relativa impermeabilidade da membrana plasmática por extrusão ativa de cálcio. Qualquer dano à membrana plasmática por diferentes mecanismos pode romper essa permeabilidade, causando ruptura da membrana plasmática com conseqüente influxo de cálcio, que poderia representar uma via final comum que leva à morte celular (SCHANNE *et al.*, 1979; CASINI & FABER, 1981; FARBER,1981)

A função dos íons cálcio na morte tóxica das células hepáticas tem sido estudada por inúmeros pesquisadores, mas os diferentes mecanismos envolvidos ainda não são bem explicados.

Assim, trabalho realizado por SCHANNE *et al.* (1979), com intuito de explorar a função direta do cálcio na morte celular tóxica, avaliaram a morte celular dependente de cálcio extracelular em cultura de hepatócitos de ratos adultos. Usando dez diferentes toxinas ativas de membrana, na presença e na ausência de cálcio, os autores verificaram que o fenômeno da morte das células do fígado envolve dois caminhos: o primeiro representa a ruptura da membrana plasmática e independe da concentração de cálcio extracelular; o segundo é dependente de cálcio extracelular e representa o influxo de cálcio através da membrana plasmática injuriada ao longo de um gradiente de concentração. As células do fígado letalmente danificadas por toxinas químicas exibem marcadas alterações na homeostase do cálcio intracelular, com grande acúmulo do íon.

Estudando a função do cálcio extracelular na morte de células do fígado induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl_4) em cultura de hepatócitos de ratos, CASINI & FABER (1981) demonstraram que a extensão da morte dos hepatócitos pelo CCl_4 foi

dependente da concentração de cálcio no meio de cultura. Os resultados desse estudo indicam que na presença de alta concentração de cálcio extracelular e CCl_4 , as células apresentam injúria celular irreversível. A ação do cálcio, ocorremuito provavelmente pelo influxo de íon através da permeabilidade da barreira plasmática lesada produzindo acúmulo de grandes quantidades de cálcio nas células. SHIESSEL e colaboradores (1984) estudaram, em ratos, o movimento de cálcio durante a transição da fase reversível para a fase irreversível na lesão hepática induzida pela D-galactosamina, *in vivo*. Demonstraram que há um aumento das concentrações de cálcio seguido pela ativação de fosfolipase na membrana plasmática dos hepatócitos o que, provavelmente, intensifica a debilidade da função da membrana pelo vazamento de alanina aminotransferase (ALT) plasmática e quebra de glicogênio hepático, conduzindo a necrose hepatocelular irreversível.

Estudos de revisão bibliográfica, sobre a função dos íons cálcio nos processos desencadeantes de morte celular, foram feitos por FARBER (1981) e CHEUNG *et al.* (1986). FARBER (1981) relata que o fenômeno de morte celular mais freqüentemente encontrado é consequência direta de várias causas, dentre elas estão agressões teciduais por traumatismos, agentes químicos, vírus, radiações, toxinas ou isquemia. Estudos com cultura de células sugerem que o influxo de cálcio através da membrana plasmática danificada, ao longo de um gradiente de concentração, converte potencialmente alterações reversíveis em lesão irreversível, com consequente morte celular. As alterações estruturais nos constituintes celulares que caracterizam necroses coagulativas, provavelmente, são resultados diretos da ação de elevada concentração de cálcio em macromoléculas celulares. No fígado, o aparecimento de morte celular vem sempre acompanhado por aumento progressivo no conteúdo de cálcio. CHEUNG *et al.* (1986) relataram que o cálcio tem importante função na lesão induzida por isquemia. No início da isquemia, o aumento dos níveis de cálcio precipita o vasoespasm, diminuindo o suprimento de sangue para os tecidos e órgãos afetados. Quando o cálcio é removido do fluido que banha as células, a permeabilidade da membrana celular aumenta, há retorno de cálcio ao meio extracelular desencadeando entrada explosiva do íon no meio e, consequentemente, o movimento de cálcio resulta em contração e morte celulares. O aumento das concentrações de cálcio livre citosólico ativa fosfolipases Ca^{2+} -dependente, resultando em colapso da membrana celular e

produção de ácidos graxos livres e fosfolipídios, que são tóxicos para as células. Em adição, há ativação de proteases, nucleases, adenilatociclases, Na^+K^+ -ATPase, fosforilases e glicogênio. A elevação de cálcio livre citosólico pode aumentar a demanda de ATP, desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria e depletar valioso suprimento de energia nas células. Estes processos bioquímicos iniciam a cascata de eventos deletérios, conduzindo à morte celular, que pode ser prevenida pelo bloqueador dos canais de cálcio, verapamil.

LEMASTERS *et al.* (1987), trabalhando com cultura de hepatócitos isolados de fígado de ratos, relataram que o aumento de cálcio livre citosólico detectado sugere estímulo para a formação de bolhas na superfície celular, como consequência de hipóxia e injúria induzida nas células, tornando-se uma via final comum para a fase irreversível da injúria celular. A progressão da fase de injúria reversível para irreversível está associada com ruptura dessas bolhas na superfície celular injuriada e pode ser constituída com base em: a) hipóxia; b) inibição da síntese de ATP; c) distúrbio da conexão da membrana do citoesqueleto; d) foco debilitado da superfície celular formando bolhas; e) expansão e/ou coalescência das bolhas; f) ruptura das bolhas conduzindo à hiperpermeabilidade da membrana; g) colapso do gradiente iônico; g) perda metabólica irreversível e das enzimas citosólicas, e finalmente prejuízo da mitocôndria, ou seja, morte celular.

Para facilitar a compreensão sobre a função do cálcio na lesão hepatocelular, THOMAS & REED (1989) fizeram uma revisão do assunto o que trouxe contribuição positiva para as pesquisas da área. Os autores relataram que a perturbação da homeostase do cálcio é considerada ponto importante nos eventos desencadeantes de injúria celular induzida quimicamente. Muitos fatores liberadores de cálcio têm sido descritos e seus efeitos correlatos com uma variedade de características celulares, incluindo alterações do citoesqueleto, glutatión hepático (GSH) e proteína tiol, ativação de enzimas Ca^{++} dependente, função mitocondrial e genérica viabilidade das células. Existem evidências da ativação de processos calmodulina-dependentes mediando a toxicidade, assim como a ativação de proteases neutral e hidrólise de fosfolipídios. A multiplicidade de caminhos pelos quais o cálcio exerce seus efeitos indica que ele pode acumular na

mitocôndria, ativar proteases e endonucleases, alterar a formação de espécies oxigênio ativo.

Para provar a relevância de que vários agentes hepatotóxicos com diferentes mecanismos químicos de toxicidade, como o acetaminofem, CCl_4 e diquat, deprimem a bomba de cálcio ou aumentam a permeabilidade da membrana plasmática ao cálcio, TSOKOS-KUHN (1989) estudaram a manutenção da homeostase do cálcio, *in vivo*, em ratos. Mediram atividade do glicogênio fosforilase A, bem como o índice de cálcio intracelular livre em amostras de fígado mantidas em banho de gelo, em diferentes tempos após doses tóxicas das hepatotoxinas. Concluíram que um sustentado aumento nos níveis de cálcio causa perturbações na regulação da membrana celular., correlacionado diretamente com a atividade da fosforilase A, o que pode exercer função fundamental na patogênese da injúria tóxica do fígado.

Mecanismos bioquímicos envolvendo lesão celular têm atraído atenção de muitos pesquisadores, tornando-se objeto de estudos de revisões bibliográficas.

Para confirmar as informações feitas por THOMAS & REED (1989), os pesquisadores ORRENIUS (1989) e NICOTERA (1990-1992) descreveram os mecanismos bioquímicos envolvidos na função do cálcio na morte celular tóxica. O desequilíbrio da homeostase do cálcio intracelular está associado à progressão da injúria celular causada por isquemia e por muitos agentes tóxicos, durante respostas imunológicas. Normalmente, a homeostase do cálcio é mantida por operação conjunta de transporte celular e sistema de compartimentalização, porém o enfraquecimento desses processos pode resultar em aumento do influxo de cálcio, liberação de estoques intracelulares e extrusão de cálcio para a membrana plasmática. Isso pode conduzir a um não controlado e sustentado aumento da concentração de cálcio citosólico com rápidas e diferentes alterações fisiológicas transitórias em respostas a hormônios, que estão associadas invariavelmente com morte celular. O processo de morte celular ocorre por alterações do citoesqueleto mediada por cálcio, alterações de fosfolipases, proteases e endonucleases ativadas por cálcio. O influxo de cálcio em hepatócitos se processa via canais de cálcio receptor dependentes e extrusão de cálcio pela $\text{Ca}^{+2}\text{ATPase}$.

Os autores relatam ainda, que vários mecanismos bioquímicos ativados por cálcio podem diretamente mediar a morte celular como consequência da disrupção do citoesqueleto, fragmentação de DNA e extensivo dano por outros componentes celulares, tais como as proteínas e enzimas Ca^{+2} -dependentes, depleção de ATP, que podem levar à formação de bolhas na superfície da membrana. A estimulação da fosfolipase, pelo aumento da concentração de cálcio, gera formação de lisofosfolídeos e ácido araquidônico, dando como produto final do metabolismo, fosfolídeos, prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos – substâncias mediadoras da inflamação e reações alérgicas – que são por si só, agentes citotóxicos. As células hepáticas são muito sensíveis aos efeitos deletérios resultantes do aumento das concentrações de cálcio.

KURITA *et al.* (1993), através de auto-radiografia e microdensitometria, demonstraram durante isquemia e reperfusão de fígado de ratos, que o acúmulo de cálcio nas zonas do lóbulo hepático pode ser responsável pela injúria celular e que a intensidade do acúmulo de cálcio indica o grau da injúria isquêmica, traduzida por necrose celular e subsequente morte das células.

Dando continuidade aos estudos da função do cálcio na morte hepatocelular, NISHIKAWA *et al.* (1994) expuseram cultura de hepatócitos a soro humano e anticorpo monoclonal dirigido contra a membrana plasmática de fígado de ratos, para produzir injúria celular mediada pelo sistema do complemento. Os autores confirmaram que o aumento da concentração de cálcio intracelular tem função importante na injúria hepatocelular seguida de morte das células. A morte das células resulta da interação de vários mecanismos, incluindo formação de bolhas na membrana plasmática e ativação de fosfolipase, proteinase e glicogênio fosforilase. A quelatação de cálcio intracelular ou a remoção do cálcio extracelular previne a morte dos hepatócitos.

Dentre os trabalhos de revisão bibliográfica na área de hepatotoxicidade, destacou-se a revisão feita por KEDDERIS (1996), sobre as bases bioquímicas envolvidas na injúria hepatocelular, o que veio contribuir para o entendimento da função do cálcio na morte das células. O autor confirma a realização dos trabalhos já citados acima e enfatiza que as consequências toxicológicas resultantes do desequilíbrio da homeostase do cálcio

causam alterações celulares do citoesqueleto, permeabilidade da membrana plasmática, assim como alterações dos canais de cálcio da membrana plasmática levando à ativação de proteases, endonucleases degradantes de DNA e conseqüentemente, causando efeitos deletérios às células. O autor relata ainda que as respostas hepatotóxicas elucidadas por agentes químicos dependem da concentração do agente tóxico liberado para o hepatócito através dos ácinos, via fluxo sanguíneo. As hepatotoxinas produzem padrão característico de citoletalidade em zonas específicas dos ácinos devido à expressão diferencial de enzimas, gradiente de concentração de co-fatores. Todos os eventos bioquímicos envolvidos nas alterações da homeostase do cálcio podem ser atenuados ou bloqueados pelo verapamil.

2.3 - Bloqueadores dos canais de cálcio e verapamil

O uso clínico dos bloqueadores dos canais de cálcio no tratamento de patologias cardiovasculares tem sido feito desde a década de 1960. Desde então, foram sintetizadas muitas substâncias medicamentosas, denominadas genericamente de “bloqueadores dos canais de cálcio”. Quando administradas ao organismo, induzem efeitos fisiológicos importantes com grande utilidade terapêutica, em várias patologias. Tais substâncias constituem um grupo heterogêneo de fármacos, com a característica de bloquear a entrada ou acelerar a saída de cálcio das células contráteis. O bloqueio ocorre nos canais lentos de cálcio voltagem - dependentes do tipo L, através dos quais o cálcio extracelular ativa a contratilidade da musculatura vascular. A denominação pelos autores como “bloqueadores dos canais de cálcio” visa distinguir o grupo, de outros antagonistas de cálcio que agem por diferentes mecanismos, como sejam o magnésio, manganês, cobalto, antibióticos aminoglicosídeos e toxina botulínica. (FLECKENSTEIN *et al.*, 1967; TRIGGLE & SWANY, 1980; WEINER, 1988; KALANT & ROSCHLAU, 1991; RANG & DALE, 1993, KATZUNG, 1994; GOODMAN & GILMAN, 2003).

Segundo os trabalhos realizados por NAYLER *et al.* (1982); SNYDER & REYNOLDS (1985), MOSER (1987), RADDINO *et al.*(1987), ABERNETHY *et al.* (1988), WEISS (1988), os bloqueadores de canais de cálcio são substâncias que têm a

propriedade de inibir o binômio excitação-contração das células musculares lisas e miocárdicas, diminuindo-lhes a força de contração, a utilização do fosfato energético dependente de cálcio e o consumo de oxigênio, levando como resultado final a uma depressão da atividade contrátil celular. Nas doses usadas clinicamente, a ação restringe-se principalmente à musculatura lisa vascular e sistema de condução cardíaco, possuindo ação desprezível sobre a musculatura esquelética. O músculo esquelético utiliza reservas intracelulares de cálcio, para dar apoio ao acoplamento excitação-contração; desta maneira, não requer tanto influxo transmembrana de cálcio. Conseqüentemente, esses agentes são úteis nos tratamentos preventivos da hipertensão arterial, angina do peito, arritmias cardíacas e em outras patologias cardiovasculares, destacando-se três ações fundamentais: eletrofisiológica, miocárdio depressora e relaxante da musculatura lisa dos vasos. Podem atuar também em processos fisiológicos extremamente importantes, como secreção glandular, liberação de neurotransmissores e função plaquetária.

Todos os bloqueadores dos canais de cálcio podem causar, bloqueio AV (atrio ventricular) e redução da frequência cardíaca. Também possuem efeito inotrópico negativo, resultante da inibição da corrente iônica lenta durante o platô do potencial de ação. Causam dilatação arteriolar generalizada, sem grande alteração venosa. Afetam todos os leitos vasculares e os efeitos regionais variam em grau considerável entre as diferentes drogas. A vasodilatação causa redução da pressão arterial. (LARAGH, 1984; ZANCHETTI, 1987; KALANT, & ROSCHLAU, 1991; RANG & DALE, 1993; KATSUNG, 1994).

A partir da década de 1980 houve maior interesse dos pesquisadores em estudar o comportamento destas drogas nas doenças cardiovasculares, comparando-as com outras drogas, comprovando sua eficácia e tolerabilidade pelo organismo, além de motivar o estudo em campos variados das pesquisas biológicas (MOSER, 1987; COLLUCI, 1987; HANDLER *et al.*, 1988, DAHLOF & SWEDEN, 1989).

Revisões feitas por ZSOSTÈR & CHURCH (1983), ECHIZEN & EICHELBAUM (1986), ANDERSON *et al.* (1986), ABERNETHY *et al.* (1988), WEINER (1988), MICHEL & WHITIN (1989), SESIN & TAMARGO (1997), RIBEIRO

& MUSCARÀ (2001) descrevem os mecanismos de ação dos agentes bloqueadores de canais de cálcio confirmando os trabalhos anteriormente citados.

Na tentativa de sintetizar análogos mais ativos da papaverina, um alcalóide vasodilatador encontrado na papoula, chegou-se ao verapamil, primeira fenilalquilamina a ser usada clinicamente nas coronariopatias. A partir desse momento, muitos agentes de estruturas variadas foram descobertos, mas com a mesma atividade farmacológica fundamental (KATSUNG, 1993; YEDINAK, 1993).

Dos muitos bloqueadores dos canais de cálcio sintetizados, quatro classes estão bem estudadas: fenilalquilaminas, diidropiridinas, benzotiazepinas e difenilpiperazinas. Atualmente, são muito usados na clínica médica, o verapamil (fenilalquilamina), o diltiazem (benzotiazepina), a nifedipina e isradipina (diidropiridina). (SNYDER & REYNOLDS, 1985).

TRIGGLE (1992) e YEDINAK (1993), relataram que a seletividade de ação destas drogas pode diferir por vários fatores, entre eles, o tipo de canal envolvido, a possibilidade de mobilização dos íons de cálcio e o estado patológico do tecido. Tais diferenças são largamente responsáveis pelas variações hemodinâmicas e eletrofisiológicas destes agentes.

O verapamil foi introduzido na prática médica há mais de 35 anos, sendo considerado protótipo deste grupo de drogas. Foi a primeira droga do grupo a ser usada nas coronariopatias. É um derivado da papaverina com estrutura química $C_{27}H_{38}N_2O_4$, com um perfil farmacocinético bem definido. É bem absorvido pelo trato gastrointestinal, porém sua biodisponibilidade é baixa como consequência de uma primeira passagem pelo fígado, onde 90% liga-se às proteínas plasmáticas. Os efeitos eletrofisiológicos são evidentes uma a duas horas após administração oral, com pico de ação em três a cinco horas. Quando administrado por via intravenosa, o efeito dromotrópico negativo é precoce, iniciando-se após um a dois minutos, com pico em dez a quinze minutos. Possui, nestas circunstâncias, um efeito hipotensor fugaz com pico de ação em cinco minutos e duração de dez a vinte minutos. É metabolizado pelo fígado, onde se transforma em Nor-verapamil, um metabólito biologicamente ativo, mas menos potente como vasodilatador. Tem meia-vida plasmática

em torno de seis horas, mas aumenta com a administração prolongada em crianças e pessoas idosas, sendo eliminado pela urina. Seus efeitos colaterais são consequência direta de suas ações sobre os músculos cardíaco e liso, e incluem constipação, hipotensão postural e cefaléia. O verapamil pode precipitar a insuficiência cardíaca com um risco maior quando associado com antagonistas de receptores β . (WEINER, 1988; OPIE, 1988; HOFFER *et al.*, 1993). A principal toxicidade envolve vasodilatação excessiva e depressão da frequência cardíaca (STORSTEIN *et al.*, 1981, ANDERSON, 1986; WEINER, 1988; MICHEL & WHITING, 1989; KATSUNG, 1992, KROEMER *et al.*, 1993; HOFER *et al.*, 1993; SESIN & TAMARGO, 1997 RATRA *et al.*, 1998; GOODMAN & GILMAN, 2000; RIBEIRO & MUSCARÀ, 2001).

A complexidade do mecanismo de ação bem como sua farmacocinética, são responsáveis pelos efeitos colaterais e/ou tóxicos. Assim, na administração de drogas antineoplásicas, como a daunomicina e vincristina associados ao verapamil, predomina citotoxicidade dos antineoplásicos (MORROW *et al.*, 1986, NOOTER *et al.*, 1987). O índice de mortalidade causado por superdosagem de verapamil é altamente significativo. A cada trinta casos de envenenamento, existem oito fatalidades, sendo os efeitos tóxicos caracterizados por hipotensão, diminuição do nível de consciência, distúrbios do ritmo cardíaco, bradicardia, hiperglicemia, hipocalemia e outros. Tais morbidades merecem atenção pela inexistência de antídotos específicos: os intoxicados deverão receber cálcio endovenosamente. O uso de drogas simpatomiméticas para o tratamento é controverso. A conduta mais adequada seria a utilização de agentes com ações antagônicas aos bloqueadores dos canais de cálcio, como por exemplo o BayK 8644, que pode melhorar as condições cardíacas diminuindo a hipotensão arterial. (HOFER *et al.*, 1993).

Houve relato de caso de disfunção hepática induzida pelo verapamil na dose de 120 mg, três vezes ao dia por quatro semanas, em humanos, possivelmente pelas reações idiossincrásicas, descritas por NASH & FEER, 1983.

O uso terapêutico do verapamil está principalmente relacionado à inibição da entrada de cálcio nas células ou sua mobilização dos estoques intracelulares através do bloqueio dos canais lentos de cálcio voltagem dependentes de alto limiar, classificados

como “canais L” (NOWYCKY, 1985; SNYDER & REYNOLDS, 1985; ANDERSON *et al.*, 1986; ECHIZEN & EICHELBAUM, 1986; KROEMER *et al.*, 1993). Clinicamente, a ação bloqueadora dos canais L, exercida pelo verapamil, é específica para dois tipos de músculos: liso vascular e as fibras musculares do sistema cardíaco de condução (GOODMAM & GILMAM, 2003).

Nas doses clínicas, seu principal uso terapêutico é como antiarrítmico, no controle de arritmias supraventriculares, e também na angina pectoris, revertendo 80% das taquicardias paroxísticas atriais quando administrado por via venosa. (STORSTEIN *et al.*, 1981; SNYDER, 1985; ANDERSON, 1986).

De acordo com os trabalhos de WEINER (1980), SNYDER (1985), ANDERSON (1986) e OPIE (1988), no tratamento da angina estável, o mecanismo de ação do verapamil consiste provavelmente em redução da necessidade de oxigênio pelo miocárdio, produzida pela diminuição da frequência cardíaca, inotropismo negativo, vasodilatação coronariana e conseqüente aumento de fluxo coronário. É bastante eficaz na angina instável, angina variante e cardiomiopatia. OPIE (1988) estudou o comportamento dos bloqueadores de canais de cálcio frente a distúrbios cardiovasculares, comparando aos efeitos do verapamil comprovando sua eficácia, tolerabilidade e segurança, motivando outros pesquisadores para avaliação científica em outros campos de pesquisas biológicas

Experimental e clinicamente foi observado que o verapamil, na verdade, só é eficaz se administrado profilaticamente; não parece reduzir a lesão tecidual ou a mortalidade, se administrado após o desenvolvimento de isquemia. Relatos de provas clínicas sugerem que, se administrado após episódio isquêmico pode ser prejudicial, possivelmente pela deficiência adicional da função ventricular já em risco (NAYLER, 1987; WEINER, 1988; RANG & DALE, 1993).

Vários autores estudaram a influência do verapamil sobre o transporte intestinal de cálcio (WROBEL & MICHALSKA, 1979; PENTO & JOHNSON, 1983; FOX & GREEN, 1986; SJÖDÉN *et al.*, 1987), sendo que, WROBEL & MICHALSKA (1979) relataram que na concentração de 1,5 mM, este fármaco reduziu a corrente de oxigênio pelo

segmento intestinal, sugerindo que o verapamil reduz o transporte ativo de cálcio por redução da respiração mitocondrial.

Subseqüentemente, em 1983, PENTO & JOHNSON, trabalhando com verapamil, nifedipina e diltiazem vieram nos confirmar o efeito inibitório do verapamil sobre o transporte de cálcio, no segmento intestinal, demonstrando a ineficácia dos outros bloqueadores dos canais de cálcio em estudo. Usaram verapamil na concentração de 1-2 mM em ratos como modelo experimental, realizando o experimento “in vitro”. Através de estudos *in vivo*, FOX & GREEN (1986), concluíram que o verapamil influenciou diretamente a translocação de cálcio no intestino, afetando a homeostasia de cálcio, durante o tratamento crônico oral em doses altas (90,3-10mM). SJÖDÉN *et al.* (1987) mostraram que o verapamil, em doses terapêuticas (80 a 120 mg/dia), não afetou a absorção intestinal de cálcio, a concentração de cálcio sérico ou a excreção urinária, durante dois meses de tratamento, mas reduziu significativamente a pressão arterial, mantendo-a em nível constante durante o tempo da pesquisa, bem como aumentou o hormônio paratireóideo.

Estudos sobre a atividade do citocromo P-450 em fígado de ratos foram feitos por RENTON (1985), UBEAUD *et al.* (1992), ZANGAR (1999) e JONES (1999). Através de estudo da inibição do metabolismo de drogas microssomais hepáticas, RENTON demonstrou que o diltiazem e verapamil são inibidores competitivos de drogas de biotransformação hepática, em células isoladas de camundongos. Ambos os fármacos possuem grupo químico potencialmente oxidável pelo citocromo - P450. Mostraram também que tanto o diltiazem como o verapamil prolonga o efeito hipnótico do pentobarbital, quando associados em doses comparáveis àquelas usadas no homem, sugerindo fortemente que, interações de drogas envolvendo inibição de biotransformação podem desencadear complicações cardiovasculares durante o uso dos bloqueadores de canais de cálcio. UBEAUD *et al.* (1992) demonstraram que os bloqueadores de canais de cálcio nicardipina, nitrenzepina, nifedipina e verapamil restauram o controle respiratório da mitocôndria de fígado de ratos, pela ação anti-ionofórica quebrando o fluxo de cálcio, sugerindo que essas drogas não apresentam efeitos tóxicos para a mitocôndria. Por outro lado, ZANGAR *et al.* (1999) mostraram que os efeitos da nifedipina e nicardipina nas

formas 3 A do citocromo P-450 podem aumentar a expressão do citocromo por diferentes mecanismos não relacionados ao bloqueio dos canais de cálcio. JONES *et al.* (1999) verificaram que em espécimes de fígado de humanos tratados com diltiazem, a inibição da atividade da forma 3 A do citocromo P-450 ocorre devido ao complexo metabólito intermediário formado na biotransformação do diltiazem, o que torna menos prejudicial à interação de drogas.

Outro importante efeito deste fármaco relaciona-se ao tecido ósseo, uma vez que a estrutura histológica, metabolismo e densidade óssea estão estritamente ligados à concentração sérica de cálcio e o controle fisiológico deste, rigorosamente controlado pelo hormônio paratireoideo (PTH), calcitonina (CT) e vitamina D. Tais substâncias hormonais atuam sobre o osso, regulando a troca de cálcio intra e extracelular, assim como a reabsorção, formação e mineralização óssea. No trato gastrintestinal, influenciam a reabsorção de cálcio e fosfato. Em ratos, o verapamil diminui a absorção de cálcio no intestino *in vitro* (WROBEL & MICHALSKA, 1977; PENTO & JOHNSON, 1983; DATTA *et al.* 1990). O verapamil pode ainda influenciar o desenvolvimento e a mineralização do tecido ósseo (SIMEKOVA *et al.*, 1987; CHAGNAC *et al.*, 19989; GRYGORCZYK *et al.*, 1989; DATTA *et al.*, 1990; RICHTIE *et al.*, 1994; SAMNNEGARD & SJODEN, 1992; AMORIM, 1995; VILELA-GOULART ., 1999).

Em 1987, SIMECKOVA *et al.* estudaram os efeitos do verapamil e do cálcio ionóforo A 23187, sobre o cálcio e fósforo contido nos ossos, de ratos, verificando que o verapamil aumentou a concentração de cálcio e fósforo nos ossos, enquanto que o ionóforo A 23187 reduziu a concentração de cálcio. Assumindo, então, que o aumento significativo na concentração de cálcio e fósforo nos ossos do rato pelo verapamil causa inibição da função dos osteoclastos, preponderante nos processos catabólicos do tecido ósseo. O ionóforo A 23187 aumenta o cálcio ionizado no citossol, imita a função do hormônio paratireoideo, causando dismineralização do osso em cultura de células ósseas. Na opinião do autor, o uso prolongado de substâncias calciotróficas equivalentes, como o verapamil e o ionóforo A. 23187, pode interferir com o metabolismo ósseo possibilitando uma culminante

síndrome distinta clinicamente, atribuindo estes efeitos à interferência na função do hormônio paratireóideo nas células alvo.

Em 1990, SJÖDÉN *et al.* mostraram que o verapamil, nas mesmas condições experimentais anteriores, afeta o metabolismo celular ósseo, induzindo alterações significantes na concentração sérica de fosfatase alcalina (ALP) em pacientes hipertensos. A ALP tem ação refletora sobre a atividade dos osteoblastos na formação óssea celular, no homem. O efeito do fármaco pode ser secundário ao aumento da secreção do hormônio paratireóideo, já que este é o maior regulador da reabsorção óssea.

Os efeitos do verapamil e de outros bloqueadores dos canais de cálcio no desenvolvimento de outros tecidos biológicos tem sido descritos. Assim os trabalhos realizados por PERNU *et al.* (1989), FUJII *et al.* (1994), NYSKA *et al.* (1994), GARZINO-DEMO *et al.* (1998) mostraram que o verapamil e outros bloqueadores dos canais de cálcio, induzem à hiperplasia gengival reversível em pacientes tratados. Essas drogas também induziram aumento da proliferação celular, síntese de DNA e do colágeno em fibroblastos de pacientes com hiperplasia gengival, *in vitro*. SANK *et al.* (1989) estudaram o papel dos íons cálcio na cicatrização de feridas crônicas, demonstraram que o verapamil, ao contrário do cálcio, facilitou o fechamento dessas feridas, possivelmente pela estimulação da síntese de colágeno. LING & PING (1990) estudando matrizes de colágeno com população de fibroblastos, *in vitro*, observaram que o verapamil e a nifedipina bloquearam a incorporação de prolina na matriz extracelular de proteína, sugerindo uso dessas drogas no tratamento de hipertrofia e quelóide cicatriciais.

VILELA-GOULART *et al.* (1999), estudaram a ação do verapamil na gestação de ratas, administrando a droga, nas doses de 2,4 e 24mg/rato/dia na água de beber antes e durante a gestação. Os autores verificaram que o verapamil administrado a ratas prenhes, induziu intensa estimulação dos folículos ovarianos com significativa liberação de óvulos na fecundação, traduzidos pelo aumento do número de implantações uterinas. Contudo acarretou elevada taxa de reabsorção fetal e correspondente diminuição de filhotes nascidos vivos. O efeito embriotóxico manifestado foi maior com a dose mais elevada.

A influência na mobilização de cálcio intracelular nas células endoteliais da córnea e o uso terapêutico do verapamil no tratamento da enxaqueca foram relatados por WEINER (1988), GREEN *et al.*, (1994), BEUBLER (1994).

Além do verapamil, nifedipina e diltiazem, outros bloqueadores dos canais de cálcio vêm sendo bem estudados, dentre eles várias substâncias do tipo da diidropiridina, como nicardipina, nimodipina, amlodipina, felodipina, pramidipina e a isradipina.(ABERNETHY, 1988; OPIE, 1988; DAHLOF & SWEDEN, 1989; YEDINAK, 1993; UEHARA, 1994)

NETLAND *et al.* (1995) estudaram os efeitos dos BCC, na pressão intra-ocular, concluindo que o verapamil reduz essa pressão e altera a hemodinâmica ocular, diminuindo a resistência vascular na artéria central da retina de voluntários humanos, duas horas após a aplicação tópica, na concentração de 0,125%.

Estudo feito por AMORIM (1995) sobre a influência da isradipina, bloqueadora dos canais de cálcio, no processo de reparo em feridas de extração dental de ratos, mostrou histologicamente que este fármaco quando administrado em dose única de 2,5 mg/kg, após exodontia, não afetou a cronologia nem a qualidade do processo de reparo alveolar.

Os efeitos da nifedipina, diltiazem, verapamil e trifluoperazina, na atividade antinociceptiva induzida pelo acetaminofem, em ratos, foram estudados por KOLEVA & DIMOVA (2000). Os autores concluíram que os bloqueadores dos canais de cálcio administrados uma hora antes do acetaminofem, potencializa a atividade antinociceptiva desse fármaco. Os efeitos na analgesia pelo acetaminofem não estão associados com o metabolismo oxidativo do fígado.

Embora o verapamil seja o primeiro bloqueador de cálcio a ser estudado, é atualmente muito utilizado na clínica médica. Dessa forma, tem-se reconhecido uma grande preocupação em relação ao emprego terapêutico dessa droga em portadores de disfunção hepática. De acordo com ENE & ROBERTS (1987); ECHIZEN & EICHELBAUM (1988); FINUCCI *et al.* (1980); McINNES (1988), a resposta

farmacodinâmica do verapamil encontra-se alterada em pacientes portadores de disfunção hepática, o que implica em elevado risco de acúmulo dessa droga no organismo, desencadeando o aparecimento de efeitos tóxicos nesses casos. Assim a dose deve ser diminuída. Na cirrose hepática, a depuração (clearance) sistêmica total diminui e a biodisponibilidade oral do verapamil aumenta.

Observações bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histoquímica têm mostrado que a maioria das lesões hepáticas induzidas por drogas ou traumatismo envolve processos celulares dependentes de cálcio. O distúrbio da homeostase do cálcio resultante da agressão às células hepáticas dispara uma cascata de eventos que envolvem formação de radicais livre os quais, covalentemente, se ligam em pontos críticos da membrana celular dos hepatócitos, promovendo peroxidação lipídica, desintegração do citoesqueleto, ativação de enzimas catabólicas, alteração da morfofuncionalidade mitocondrial com conseqüente efeito deletério para as células. A habilidade dos bloqueadores de canais de cálcio, especialmente do verapamil, em inibir preferencialmente a liberação e o movimento de cálcio na mitocôndria, levou os pesquisadores a testar seus efeitos nas células hepáticas injuriadas. Dessa maneira, estudos recentes têm demonstrado a ação do verapamil e outros bloqueadores de canais de cálcio em lesões hepáticas induzidas por agentes como calor e hipóxia ou por drogas hepatotóxicas, relatando efeitos hepatoprotetores em algumas condições (BOWERS *et al.*, 1987; DEAKIN *et al.*, 1991; MATSUDA, 1991; LIANG & THURMAN, 1992; SCHMITZ *et al.*, 1995; RATRA *et al.*, 1998; FARGHALI *et al.*, 2000).

MATTOS-FILHO (1976) e ARAUJO (1992), relataram que as aminotransferases séricas são marcadores sensíveis de dano hepatocelular, sendo úteis na identificação e reconhecimento de várias doenças hepáticas agudas e crônicas, assim como de lesões hepáticas experimentais induzidas por hepatectomia parcial, no estudo de regeneração hepática.

De acordo com ZIMMERMAN (1974), KAPLAN (1993), HENRY (1995) e ANDERSON & COCKAINE (1995), a elevação da atividade enzimática das aminotransferases reflete o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, favorecendo seu extravasamento, levando a extensa necrose do parênquima hepático,

constituindo assim essas enzimas, em identificadores de lesão hepática. A AST é enzima encontrada em grandes concentrações no citosol e na mitocôndria das células hepáticas onde apresenta elevada atividade. Aparece em baixa atividade e pequenas concentrações nas células cardíacas, musculares esqueléticas, renais, pancreáticas e pulmonares. A ALT é uma enzima citosólica com alta atividade no fígado e baixa atividade no coração, músculo esquelético, rins, pâncreas e baço. Os níveis plasmáticos de AST, em determinadas circunstâncias, são mais elevados que os níveis de ALT, em função da primeira ser encontrada simultaneamente em dois compartimentos celulares.

A ALP - enzima pertencente ao grupo da fosfohidrolases – encontra-se em vários tecidos biológicos com elevada concentração no fígado, epitélio do trato biliar e no tecido ósseo. Tem afinidade pela membrana plasmática dos hepatócitos. Seu fracionamento em isoenzimas é útil para diferenciar doenças hepáticas de doenças ósseas. A isoenzima de origem hepática (ALP₁) é termo-estável, enquanto que a fração óssea (ALP₂) pode ser inativada pelo calor. Nas doenças hepatocelulares como a hepatite viral, cirrose hepática, metástase hepática e outras, os níveis enzimáticos de ALP aparecem elevados (COLEMAM, 1960; ROY, 1970; ZIMMERMAM, 1974; NASH, 1983).

A γ -glutamil transferase (GGT) localiza-se na membrana plasmática dos hepatócitos. Nas doenças hepatocelulares obstrutivas é encontrada em concentrações significativamente elevadas. É mais específica que a ALP e AST para avaliar doenças hepáticas, pois suas concentrações não se encontram alteradas nas doenças ósseas, como a ALP e nem nas doenças da musculatura esquelética, como a AST (ZIMMERMAM, 1974; WESTERGARD, 1981).

A AchE sérica ou pseudocolinesterase é sintetizada pelo fígado. Pelo fato de se encontrar diminuída em todas as afecções hepáticas parenquimatosas difusas, tais como: hepatite virótica, cirrose hepática, neoplasia maligna metastática, necrose amebiana do fígado, tornou-se grande indicador de injúria celular do fígado (GARY, 1971; DIETZ, 1973).

2.4 - Enzimas e hepatotoxicidade

No trabalho de revisão da literatura, ZIMMERMAN (1974) relata que enzimologia clínica e hepatotoxicidade experiemntal têm íntima ligação. A medida dos níveis séricos de enzimas, tornou-se poderosa ferramenta auxiliar no estudo de hepatotoxicidade. O desenvolvimento de testes enzimáticos proveitosos clínica e experimentalmente para reconhecer doença hepática, como por exemplo, doseamento de AST, ALT, ornitina carbamil transferase (OCT), sorbitol desidrogenase (SDH), arginase, guanase e isocitrato desidrogenase (ICDH) têm contribuído para a realização de estudo de hepatotoxicidade. O emprego de enzimas séricas como marcadores de injúria hepática , requer qualidade especifica do teste empregado, reflexão de doença hepática, conhecimento de mecanismos que podem conduzir para alterar os níveis enzimáticos no soro e a ligação entre estados hepatotóxicos conhecidos e níveis elevados das enzimas.

KANASHIMA *et al.* (1983) relatam que em ratos parcialmente hepatectomizados, a atividade enzimática da ALT e AST está aumentada nas primeiras vinte e quatro horas após a cirurgia e as mesmas se mantêm constantes até o décimo quarto dia. Paralelamente, há diminuição das concentrações de albumina nas primeiras quarenta e oito horas, com aumento significativo até o décimo quarto dia. A atividade mitótica máxima nos hepatócitos ocorreu trinta horas após hepatectomia parcial.

Inúmeros trabalhos têm demonstrado a ação de drogas bloqueadoras dos canais de cálcio (BCC) na hepatotoxicidade induzida por diferentes tipos de dano celular, tais como: injúria celular induzida por isquemia e ou/ reperfusão (NAUTA *et al.* ,1991; STEIN *et al.*, 1993; CHAVEZ-CARTAYA, 1994; KURITA *et al.*, 1994), injúria pelo calor (BOWERS *et al.*, 1987), injúria por estress oxidativo (RATRA *et al.*, 1998; FARGHALI *et al.*, 2000), injúria induzida por drogas (ERWIN, *et al.*, 1986; DEAKIN *et al.*, 1991; DIMOVA *et al.*, 1995; SIPPEL *et al.*, 1993; SCMHITZ *et al.*, 1994; ELLOUK-ACHARD *et al.*, 1995) e injúria induzida pela inibição do metabolismo de drogas microssomais hepáticas (MURRAY & BUTLER, 1996; DROBITH ,1997; JONES *et al.*, 1999; ZANGAR, 1999).

Embora o trabalho de NASH (1983) relate que pacientes com distúrbios cardiovasculares sob uso terapêutico constante de três doses diárias de 120mg de verapamil, via oral, apresentaram atividade plasmática aumentada de AST, ALT e ALP associada à náusea e constipação intestinal, indicando injúria hepática induzida pelo verapamil, muitos autores mostraram-se favoráveis aos efeitos hepatoprotetores de drogas bloqueadoras dos canais de cálcio.

Assim ERWIN *et al.* (1986), estudando os efeitos de BCC no conteúdo de cálcio e na necrose centrolobular de fígado de ratos tratados com agentes hepatotóxicos, demonstraram que o verapamil, na dose de 25mg/kg injetado via intraperitoneal uma hora antes do agente hepatotóxico e duas doses após sete horas, promove diminuição considerável, em cerca de 90%, no conteúdo de cálcio e na necrose das células hepáticas induzida pelo CCl₄ e dimetilnitrosamina. Os autores sugerem efetiva hepatoproteção do verapamil pelo mecanismo da ação clínica na dilatação dos vasos sanguíneos, com aumento da circulação vascular local e diminuição da concentração de cálcio livre. A ação protetora do verapamil suporta evidências da participação do cálcio no processo de lesão hepatocelular.

Por outro lado, o trabalho realizado por BOWERS *et al.*, em 1987, mostra que fígado isolado e perfundido de ratos, exposto a 42⁰C por 90 min, apresenta ruptura das células, comprometendo a integridade da membrana celular. Essas alterações são caracterizadas pela perda do endotélio, vazamento de K⁺, enzimas citosólicas, produção da bile e por alterações típicas da estrutura fina das células. Os autores constataram que o verapamil (10mg/100ml) e a nifedipina (0,03mg/100ml) não foram hábeis para melhorar a função e estrutura hepatocelular, indicando que a hipóxia contribuiu para a injúria das células.

Posteriormente, ROSE *et al.* (1990) avaliaram os efeitos do diltiazem, bloqueador dos canais de cálcio, na alteração da regulação do cálcio hepatocelular na injúria oxidante do choque hemorrágico e ressuscitação; verificaram que o BCC diminui a concentração de cálcio extracelular e o influxo de cálcio na membrana plasmática, assim como previne a peroxidação lipídica e a oxidação do glutathion hepático

Os efeitos citoprotetores dos BCC e bem como os mecanismos envolvidos e a potencial aplicação na injúria hepatocelular foram descritos por DEAKIN *et al.*, (1991). Os autores relataram que muitos processos celulares são regulados por alterações de cálcio livre citosólico incluindo transcrição e replicação de DNA, regulação do citoesqueleto, renovação do estoque de proteínas e fosfolipídeos e regulação da via enzima dependente de cálcio. O desequilíbrio da homeostase do cálcio está largamente implicado no desenvolvimento da injúria hepatocelular e parece ser o caminho limitante na transição do estágio irreversível. Níveis elevados de íons cálcio através da membrana plasmática danificada aumentam a concentração de cálcio intracelular e a redistribuição dos estoques celulares. O alvo para conduzir a morte das células hepáticas mediada por cálcio são as enzimas degradativas cálcio-dependentes. A hidrólise das fosfolipases, fosfolipídeos biologicamente ativos da membrana plasmática, lisofosfolipídeos e ácido araquidônico são um processo ativo nas células hepáticas injuriadas. As altas concentrações de endonucleases no núcleo dos hepatócitos, originada pela fragmentação de DNA, aumentam os níveis de cálcio, desencadeando injúria dos hepatócitos. Os canais de cálcio voltagem-dependentes, são mais sensíveis às hepatotoxinas do que os canais receptor-dependentes, sugerindo a existência de maior número de canais de cálcio voltagem-dependentes nos hepatócitos com grande capacidade para transportar cálcio. Os BCC exercem seus efeitos hepatoprotetores nas organelas da membrana plasmática, modificando os níveis de cálcio por diferentes mecanismos, que envolvem bloqueio dos canais de cálcio tipo L, redução do estresse oxidativo, antagonismo para sítios receptores e mediadores inflamatórios, interação com Na^+/K^+ -ATPase, AMPc fosfodiesterase, proteína Kinase C e calmodulina. Os autores sugerem que o aumento de evidências experimentais pode ser suficiente para autorizar a tentativa do uso clínico dos BCC em várias doenças hepatocelulares severas, agudas e crônicas, pelas quais outras opções terapêuticas ainda não foram corretamente avaliadas.

MATSUDA (1991) pesquisou os efeitos protetores dos BCC na injúria celular induzida pelo ionóforo de cálcio A23-187 em hepatócitos isolados em fígado perfundido de ratos e concluiu que a nitrenzepina e nifedipina protegem o fígado contra a injúria hepática, mas o verapamil e o diltiazem não foram hábeis para prevenir a

citotoxicidade do ionóforo. Os efeitos protetores das diidropiridinas podem resultar da ativação da calmodulina e proteína Kinase C.

Em outro trabalho DEAKIN *et al.* (1991) pesquisaram os efeitos dos BCC na hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol em camundongos, relatando que o diltiazem e a nifedipina, administrados nove horas após o paracetamol, reduzem a hepatotoxicidade, traduzida pela diminuição da atividade enzimática da AST no plasma. Os achados histológicos da biópsia do lóbulo mediano do fígado, corada por hematoxilina e eosina (HE) e analisado por microscopia de luz, mostraram aumento do índice mitótico, o que pode estimular a regeneração do tecido hepático, facilitando a recuperação do fígado pelos BCC.

NAUTA *et al.*, em 1991, estudaram os efeitos dos íons cálcio e de agentes BCC no modelo de injúria hepática induzida por isquemia-reperfusão e verificaram que o verapamil administrado na veia jugular de ratos, antes da indução da isquemia, tem efeito haptoprotetor, pois os níveis enzimáticos séricos de AST, ALT e ALP mantiveram-se semelhantes aos do controle. Os cortes histológicos analisados paralelamente, por microscopia ótica de luz, mostraram deposição de gorduras e grau de necrose centrolobular, semelhantes ao controle, mostrando efeitos benéficos do verapamil se administrado antes da isquemia e não depois.

AR' RAJAB *et al.* (1992) pesquisaram a ação dos BCC na preservação do fígado de coelhos para transplante e mostraram que a adição de verapamil ou nifedipina na solução de perfusão UW, aumenta a produção da bile em 70%. Os resultados sugerem importante função do cálcio intracelular na injúria hepática, durante a conservação e armazenamento do fígado a frio com solução de UW e que os BCC melhoram e prolongam a qualidade funcional do fígado. A nisoldipina não tem efeito protetor nas células endoteliais e na função dos hepatócitos de ratos, nas mesmas condições experimentais (BROIN *et al.*, 1992).

Os efeitos protetores de BCC na injúria hepatocelular foram estudados por GASBARRINI *et al.*(1992) e LIANG & THURMAN (1992). GASBARRINI *et al.* (1992) analisaram os efeitos da nifedipina e do diltiazem em hepatócitos isolados de ratos e

constatarem que esses BCC, em altas concentrações, não previnem o aumento de cálcio intracelular nem a liberação de LDH, ao contrário, aumentam significativamente a injúria celular induzida por anóxia. Já os resultados obtidos por LIANG & THURMAN (1992) mostraram que o diltiazem e TA3090 adicionados no meio de perfusão, diminuem a liberação de LDH e o movimento de oxigênio, na injúria hepática induzida por hipóxia. A histologia mostrou os efeitos protetores dos BCC nas células parenquimais e não parenquimais, através da ação bloqueadora de canais de cálcio voltagem-dependente, prevenindo a liberação de citocinas pelas células de Kupffer hepáticas.

De acordo com o trabalho de STEIN *et al.* (1993), quando investigaram os efeitos hepáticos do verapamil (2,5mg/Kg) em ratos normais e/ou sensibilizados por lesão hepática oxidativa pela depleção química de glutathione (GSH), um antioxidante endógeno, o pré-tratamento com o verapamil causa diminuição da atividade enzimática da ALT associada a queda de peroxidação lipídica no fígado dos ratos GSH depletados, enquanto nos ratos normais, tal não ocorre. Esses achados indicam que o fígado está protegido da injúria oxidativa após pequenos períodos de total isquemia, pelo rico suprimento do GSH endógeno, sugerindo que o BCC protege contra o ataque de O₂ livre e/ou pelo mecanismo vasodilatador sistêmico e local.

Ainda em 1993, SIPPEL *et al.* estudaram os efeitos de vários BCC na sobrecarga de cálcio, induzida experimentalmente pelo composto diamidinotionaftene (98/202) em hepatócitos isolados de ratos. Usando verapamil, diltiazem e nifedipina demonstraram que os três BCC diminuem a atividade da fosforilase A e previnem o aumento do conteúdo de cálcio mitocondrial e citosólico causado pelo 98/202 e conseqüentemente previnem a morte celular dos hepatócitos. Entretanto somente o verapamil foi hábil para inibir a depleção dos estoques extracelulares de cálcio mitocondrial. Dando continuidade aos estudos dos efeitos dos agentes BCC no tecido hepático, CHAVEZ-CARTAYA (1994) estudou a ação da nimodipina (10mg/Kg) na injúria do fígado de ratos induzida por isquemia e reperfusão, demonstrando que a nimodipina administrada 30 min antes da isquemia e imediatamente após a interrupção do fluxo sanguíneo, diminui a atividade enzimática ALT no soro. A histologia revela

diminuição do edema das células e ausência de alterações necróticas teciduais, indicando efeitos hepatoprotetores da nimodipina. Ainda em 1994, KURITA *et al.*, demonstraram que o diltiazem administrado por via IV em infusão contínua por 180 min, iniciando 30 min antes da isquemia, diminui o acúmulo de cálcio intra-hepático em ratos. O diltiazem bloqueia o influxo de cálcio para o citosol inibindo o aumento de cálcio intracelular e pode proteger o dano hepático induzido por isquemia. Por outro lado SCHMITZ *et al.* (1995) demonstraram que o diltiazem e o verapamil em doses equivalentes a 0,5 e 0,1 mM, falharam em prevenir os efeitos hepatotóxicos induzidos pelo diclofenaco de potássio.

Posteriormente, em 1995, DIMOVA *et al.* pesquisaram os efeitos da nifedipina, diltiazem, verapamil e trifluoperazina na toxicidade do acetaminofem em camundongos e verificaram que o pré-tratamento com nifedipina (50mg/Kg), verapamil (20mg/Kg) e diltiazem (70mg/Kg) administrados uma hora antes do acetaminofem, mantêm os níveis enzimáticos da AST iguais aos do controle, demonstrando que as doses desses agentes foram igualmente efetivas na proteção contra a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofem, sugerindo proveitoso uso terapêutico dos BCC em caso de superdosagem de acetaminofem. ELLOUK-ACHARD *et al.* estudaram os efeitos protetores da nifedipina contra a citotoxicidade e as alterações do cálcio induzidas pelo acetaminofem em cultura de hepatócitos de ratos e concluíram que o pré-tratamento, *in vitro*, com essa droga, exibe efeitos preventivos contra a injúria hepática.

Nos anos subseqüentes, outros estudos foram realizados para mostrar as ações dos BCC no fígado de ratos. Foi mostrado que a nicardipina e a nifedipina inibem a dessaturação de ácidos gordurosos em microsomas de fígado de ratos (KAWASHIMA *et al.*, 1996). A terapia com múltiplas doses de diltiazem favorece o efeito cumulativo do seu metabólito N-desmetil-DTZ com maior ação microsomal inibitória do citocromo P-450, sugerindo que a eliminação desse composto pode restaurar a capacidade de oxidação hepática a níveis normais (MURRAY & BUTLER, 1997). A amlodipina, inibe diferentes formas do citocromo P-450 em células hepáticas de ratos, conseqüentemente tem potencial para inibir o metabolismo hepático de muitas drogas, indicando significativa atenção de relevância clínica no processo de interação de drogas.

No trabalho realizado por RATHA *et al.* (1998), foi avaliado a ação do verapamil na hepatotoxicidade relacionada com estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial induzida por drogas. Os resultados mostraram que o verapamil administrado 1 hora antes do agente tóxico metaprilene, em cultura de hepatócitos de ratos, causa potencial proteção contra a hepatotoxicidade desse agente, reduzindo significativamente a morte celular, de maneira dose dependente.

Trabalho recente de FARGHALI *et al.* (2000) com hepatócitos perfundidos de ratos, avaliou os efeitos do verapamil e do diltiazem, na injúria oxidativa induzida por terbutilhidroperóxido (TBH). Os autores mostraram que o pré-tratamento com verapamil e diltiazem no meio de perfusão, causou diminuição da peroxidação lipídica, diminuição do vazamento de LDH, aumento do consumo de oxigênio, aumento da síntese e ativação de proteínas no retículo endoplasmático granular e no citoplasma dos hepatócitos. Concluíram que os BCC exibem propriedades hepatoprotetoras, efeitos esses acompanhados por diminuição da atividade da ATPase revelada por microscopia eletrônica, o que pode implicar em normalização do cálcio após a intoxicação.

2.5 -Regeneração hepática

Desde 1931, através da técnica de hepatectomia parcial (HP) concretizada por HIGGINS & ANDERSON, os estudos sobre a regeneração dos tecidos hepáticos vêm trazendo notável contribuição para o desenvolvimento de pesquisas que visam esclarecer questões sobre a ação de drogas no tecido hepático em regeneração, permitindo determinar seus efeitos sobre a capacidade regenerativa deste tecido, assim como os aspectos funcionais e morfológicos, oriundos da interação droga/fígado durante o processo regenerativo.

A hepatotoxicidade dos agentes terapêuticos, em uso atual, tornou-se fenômeno de conhecimento generalizado, sendo óbvio o crescimento do número de compostos com potencial para alterar morfológica e funcionalmente a atividade hepática,

associado ao elevado aparecimento de novas e potentes drogas liberadas para uso terapêutico.

Lesões hepáticas no homem tornam-se cada vez mais comuns, devido a automedicação e a prescrição inadequada por profissionais que muitas vezes vaidosos por propagandas e marketing, se vêem “perdidos” em meio à enxurrada de novos medicamentos constantemente lançados no mercado farmacêutico.

O fígado classicamente conhecido como um grande laboratório do organismo, exercendo papel central em muitos processos fisiológicos, tem recebido a denominação de “zelador do meio interno”. É o principal local onde se processa a síntese de lipídeos e de lipoproteínas plasmáticas. É ainda responsável pela síntese, metabolismo e degradação de muitas enzimas, dentre elas a AST, ALT, ALP, GGT e a colinesterase. Essas funções biológicas o torna vulnerável a uma variedade de agressões metabólicas, circulatórias, tóxicas microbianas e neoplásicas. Por isso vem trazendo notável contribuição para o desenvolvimento de pesquisas que visam esclarecer mecanismos de ação de drogas no tecido hepático lesado ou em regeneração, permitindo avaliar seus efeitos sobre a capacidade regenerativa desse tecido, assim como aspectos funcionais, estruturais e morfológicos, oriundos da interação droga/fígado, durante processo regenerativo

O fenômeno da regeneração hepática, embora conhecido desde a antiguidade, tem despertado continuado e sempre atual interesse, haja vista a abundância da literatura. Trabalhos experimentais têm sido realizados em diversos animais, como o porco e o cão, porém o rato e o camundongo são os mais utilizados, realizando-se estudos *in situ*. Segundo HIGGINS & ANDERSON (1931), GRISHAM (1962) quando cerca de 70% do fígado de ratos é removido cirurgicamente, a porção residual cresce e rapidamente, com restauração de todas as estruturas. GRISHAM, fez um estudo morfológico da síntese de DNA e proliferação celular na regeneração hepática, por meio da incorporação da timidina- H^3 e autoradiografia em fígado de ratos parcialmente hepatectomizados, e verificou que um apreciável número de hepatócitos iniciou a síntese de DNA entre 12 e 18 horas, alcançando um pico até 20 horas após HP, depois diminuindo lentamente para níveis normais. A presença de figuras mitóticas foi observada nas primeiras 6 horas. Esse método,

autoradiografia e incorporação de TK, permite identificação de células específicas sustentadoras da síntese de DNA e sua localização dentro do lóbulo hepático, aumentando a sensibilidade para detectar o crescimento mitótico.

Durante o processo de crescimento, as moléculas sintetizadoras de enzimas e metabolizadoras de drogas, provavelmente o Citocromo P-450, são incorporadas dentro da matriz lipídica do retículo endoplasmático. Há uma associação morfológica entre a síntese de proteínas ribossomais e membrana do retículo endoplasmático. A microviscosidade da membrana microssomal diminui simultaneamente com o aumento da atividade da metiltransferase PMTI e diminuição da metiltransferase PMTII (JAISWAL, 1982).

A hepatectomia parcial resulta numa rápida proliferação celular do parênquima hepático. Em ratos, um marcado aumento no índice mitótico no fígado ocorre em 24 a 48 horas após a cirurgia, enquanto que a síntese de DNA alcança um pico máximo entre 22 e 24 horas. A proliferação celular diminui após a restauração do peso do fígado e o metabolismo do órgão ser restabelecido. Uma dramática alteração na fluidez da membrana, acompanhada de aumento de proliferação celular, ocorre simultaneamente com ou precede a síntese máxima de proteínas, indicando a importância destas alterações para a incorporação de proteínas e enzimas dentro da membrana durante metilação fosfolipídica (SCULTZE & OEILERT, 1961; JAISWAL, 1982).

McGOWAN *et al.* (1978) estudaram os efeitos da deprivação de proteínas na regeneração hepática do fígado de ratos parcialmente hepatectomizados e verificaram que, os ratos mantidos em dieta livre de proteínas por três dias, apresentaram alterações no curso de tempo da síntese de DNA durante a regeneração hepática, o que pode ser eliminado pela administração de caseína hidrolisada. Apesar dessas alterações, o aumento do “pool” de aminoácidos hepático, que dá lugar ao estágio precoce do processo regenerativo, ocorre em padrão normal no fígado regenerado de ratos com dieta livre de proteínas. Os autores sugerem que o déficit de polirribossomas livres encontrado no fígado regenerado desses ratos, pode ser uma consequência de pequeno acúmulo de espécies de mRNA codificado para proteínas intracelulares.

Em 1984, ZIEVE e seus colaboradores estudaram o desenvolvimento do processo de regeneração hepática após resecção de 80 a 90% do fígado em comparação com hepatectomia parcial de 37, 67, e 78% em ratos normais, e verificaram que o primeiro importante pico da atividade da ornitina descarboxilase ocorreu precocemente e aumentou muito nos ratos submetidos a HP de 67 e 78%. A distribuição e o tempo da atividade da timidinaquinase (TK) correspondeu, favoravelmente, ao número de mitoses contadas nos cortes histológicos, nos três níveis de HP estudados. Conseqüentemente, a iniciação do processo regenerativo foi diminuída após HP, mas a resposta regenerativa, refletida pela síntese e multiplicação de DNA, foi prolongada. Foram analisadas também, no sangue, atividades enzimáticas da SDH e ALT e ácidos biliares. Tanto SDH quanto ALT foram significativamente elevadas após HP e retornaram a linha de base entre sete e oito dias e a extensão das respostas variou proporcionalmente ao grau de HP. Os ácidos biliares mantiveram-se aumentados do primeiro ao terceiro dia, após 80 a 90% de HP e decaíram até o oitavo dia. Nos ratos submetidos a HP de 67 e 78%, a concentração dos ácidos biliar manteve-se significativamente mais baixa e constante até o terceiro dia após HP. Com 37% de HP não houve alterações. Isso, presumivelmente, reflete a habilidade do fígado residual em regeneração para excretar ácidos biliares, retornando pelo circuito entero-hepático e conduzindo ao fígado residual. Esta função foi aparentemente comprometida pela HP de maneira proporcional a sua extensão .

O modelo experimental de hepatectomia parcial foi testado em porcos por KAHAN *et al.* (1988). Os autores avaliaram a atividade da TK, índice mitótico e índice de regeneração do tecido hepático concluindo que as respostas regenerativas foram influenciadas pela quantidade de fígado removida na operação, ocorrendo resposta máxima após 70% de HP, resultados esses semelhantes aos encontrados em ratos.

As revisões feitas por JUNGERMAN & KATZ (1989) sobre a função de especialização de diferentes populações de hepatócitos e por YAMAZAKI & LaRUSSO (1989) sobre a digestão intracelular do fígado, acrescentaram valores científicos aos estudos de regeneração de tecido hepático. JUNGERMAN & KATZ, relataram que no metabolismo energético oxidativo das células hepáticas a alta capacidade dessas células se

movimentarem para o final da oxidação está relacionada á sua capacidade de iniciar um colapso de ácidos gordurosos e aminoácidos, como indicado pela localização de β -hidroxibutiril CoA desidrogenase e alanina aminotransferase (ALT). Na gluconeogênese, além da grande capacidade de nova síntese de glicose, a lactato desidrogenase (LDH) e alanina aminotransferase (ALT) que ajudam a alimentar a lactato e a alanina dentro da via gluconeogênica, mostram alta atividade. Investigações histoquímicas revelaram que somente pequena porcentagem de hepatócitos normais contém albumina, mas na cirrose hepática todos hepatócitos são ricos em albumina . Na zona periportal predomina a significância funcional da γ -glutamyl transferase (GGT). YAMAZAKI & LaRUSSO descreveram que o fígado exerce função pivô no movimento de macromoléculas porque: a) é suprimido por sangue portal rico em nutrientes, b) tem anatomia que permite contacto físico direto entre sangue sinusoidal e células hepáticas, c) é a principal origem da maioria das proteínas séricas, d) é composto por vários tipos de células que contêm receptores e outras membranas de especialização que otimiza a remoção de matérias circulantes. A maior atividade celular que contribui para o movimento de macromoléculas inclui, síntese, extração, metabolismo e excreção; atividade que pode ser generalizada como “processamento celular”. Cerca de 99% de proteínas celulares reside nos hepatócitos e o colapso dessas tem sido estudado mais extensivamente do que a digestão intracelular de lipídeos e carboidratos. A diminuição da proteólise é considerada de melhor significância do que a síntese, como causa da regeneração do hepatócito após HP.

Para estudar a atividade específica e o conteúdo de DNA no fígado de ratos, assim como o índice mitótico dos hepatócitos, ZIVNY & SIMEK (1989) usaram administração parenteral de glicose e emulsão de lipídeos, em diferentes fases pós-operatória e no início do desenvolvimento do processo de regeneração, em ratas fêmeas após HP. Demonstraram que a infusão de glicose não alterou os parâmetros estudados, enquanto que a infusão continua da emulsão de lipídeos alterou a síntese e o conteúdo de DNA em todos os grupos experimentais, mostrando aumento de mitoses quando dada 24 horas após HP.

MICHALOPOULOS (1990), aprofundando os estudos sobre a regeneração do fígado de ratos, fez uma revisão sobre os mecanismos moleculares e controle do crescimento, envolvidos no processo de regeneração hepática, o que veio contribuir para o grande avanço das pesquisas. O autor relata que o estudo controle de crescimento do tecido hepático em regeneração, avançou pela identificação de um conjunto de novos fatores de crescimento com especificidade pelo fígado, e bem como estabelecer importantes padrões de expressão de genes para os fatores de crescimento, já conhecidos. Baseado em estudos com cultura de hepatócitos e expressão de genes já foram identificados várias substâncias com função chave na regeneração hepática tais como os fatores de crescimento dos hepatócitos, que são protótipos de estimulador mitótico e síntese de DNA (EGF, TGF α , HBGF-1, HPTB, HSS), fatores inibidores do crescimento (TGF β , IL-1B), fatores de crescimento comitogênicos (HPTA/EGF, norepinefrina, vasopressina, angiotensina I e II, estrógenos, insulina e glucagon e Hepatopoitin B). As cinéticas das respostas regenerativas dos hepatócitos após HP, são explanadas pela produção de mRNA em torno de 6-8 horas, síntese de DNA em torno de 12-16 horas, mudanças bioquímicas no parênquima hepático, síntese de albumina, síntese de bile, fatores de coagulação entre outros. As alterações bioquímicas no plasma após 2/3 de hepatectomia, induzem nutrição geral e alterações na homeostase do cálcio que colaboram para que o primeiro hepatócito abandone a fase G₀ e entra na fase G₁ da regeneração celular. É possível que altos níveis de TGF β inibem a proliferação dos hepatócitos no final da regeneração, apesar da forte resistência dessa células contra o TGF β . Também, é possível que os hepatócitos sejam programados para proliferar-se depois de um ou dois ciclos de proliferação. Assim, a função de cessação da síntese de DNA dos hepatócitos, produção de TGF β , poderá ter importante função na regulação da proliferação das células parenquimais e não parenquimais, envolvidas na recuperação do tecido hepático.

DESIDERIO *et al.* (1990) descreveram que após HP de 70% do fígado de ratos, o acúmulo de ornitina descarboxilase (ODC) concomitante com aumento de mRNA, ocorreu dentro de oito a dezesseis horas, respectivamente. A ativação de α e β adrenoceptores reconhecida pela administração de prazosin e propranolol, antagonistas α e β , libera catecolaminas e induz aumento de cálcio nas células hepáticas. A manipulação

farmacológica, dos níveis de cálcio intracelular do verapamil ou neomicin – inibidores da liberação de cálcio dos estoques endógenos – diminui a atividade da ODC em 55% nas quatro horas após hepatectomia, sugerindo que os processos mediados por cálcio induzidos pelas catecolaminas estão envolvidos na expressão de genes ODC mRNA, na fase pré-replicativa da regeneração hepática.

No mesmo ano, ANDERSON *et al.* fizeram um estudo ultraestrutural das alterações seqüenciais ocorridas na regeneração hepática seguida da retirada de um lóbulo (30%), dois lóbulos (70%) e subtotal (80-90%). Os resultados demonstraram que as alterações observadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica foram similares para os três grupos estudados, mas o grau de extensão das alterações diferiu entre si, quando comparadas à retirada de somente um lóbulo. A biópsia do fígado de todos os grupos demonstrou presença de lipídeos, fagolisossoma e desorganização do RER, degeneração mitocondrial, aumento da atividade TK e índice mitótico, em extensão pronunciada diretamente proporcional ao tamanho do tecido hepático retirado. A atividade mitótica e o índice da atividade regenerativa foram correlatos com a atividade de TK.

ZARNEGAR *et al.* (1991) estudaram a expressão do fator de crescimento mRNA em hepatócitos, na regeneração do fígado após HP e concluíram que o nível de HGF mRNA em fígado de ratos aumenta drasticamente entre três e seis horas após HP, com pico máximo em doze horas, retornando gradualmente para níveis não detectáveis por setenta e duas a noventa e seis horas. Os autores sugerem que o HGF pode ser um dos maiores e primitivos sinais que dispara a proliferação dos hepatócitos, durante a regeneração hepática.

Com o passar dos tempos o veemente interesse pelo estudo de regeneração do tecido hepático aumentou gradativamente e ganharam atenção em diversas áreas. Assim o estudo feito por MACHINTOSH (1993) foi dirigido para determinar se a extensão de fibrose hepática era correlata com a atividade da regeneração do fígado, após HP de ratos tratados com CCl₄. A regeneração hepática foi determinada pela incorporação de TK dentro do DNA dos ratos após 70% de HP, mostrando que nos fígados fibróticos a quantificação pré-operatória de fibrose, analisada por imagem, não serve como prognóstico

útil de atividade regenerativa. No mesmo ano, TSUKAMOTO *et al.* estudando os efeitos da idade na regeneração hepática após dois terços de HP em ratos com seis e sessenta semanas de vida, verificaram que a indução da TS e TK – enzimas determinantes da síntese de DNA na regeneração hepática – diminui ao redor de 24 horas e a atividade máxima foi menor em ratos idosos. A restauração relativa do rendimento de DNA, RNA, proteínas e peso do fígado, em ratos idosos nas noventa e seis horas após HP, foram respectivamente, 87%, 84%, 63% e 87%, sugerindo capacidade de regeneração preservada nos ratos com sessenta meses. Ainda em 1993, KATO *et al.* demonstraram que a ativação do sistema retículo endotelial por OK-432 quando 90% do tecido hepático é retirado, aumenta a regeneração do fígado e melhora a sobrevida de ratos.

Atualmente o modelo experimental mais usado para estudar a regeneração do fígado, continua sendo através da clássica técnica de hepatectomia parcial de HIGGINS & ANDERSON (1931).

Recente revisão sobre regeneração hepática, foi descrita por STEER, (1995), o que veio contribuir para continuidade dos trabalhos experimentais na área. Segundo STEER, o conceito de regeneração hepática se traduz pela capacidade do órgão repor a massa de tecido após remoção parcial ou injúria. O fígado é o único órgão com habilidade em tolerar hiperplasia e repor perdas de tecidos e células. A hiperplasia é compensatória para restabelecer, em série, uma massa “ótima”, que está relacionada à área corporal. Morfológica e funcionalmente, os hepatócitos remanescentes não se diferenciam, mas preferivelmente mantêm ativos, o ciclo da uréia, a síntese de albumina, metabolismo de drogas assim como exibe normal polaridade de domínio de membrana.

STEER, (1995) relata ainda que, o hepatócito adulto é, normalmente, uma célula quiescente, altamente diferenciada com atividade replicativa mínima, – uma mitose para dois mil hepatócitos – mas em resposta a um dano celular por injúria física, infecção ou injúria tóxica, quase imediatamente, ele pode iniciar o processo de replicação celular. Após 70% de HP, a regeneração hepática em ratos, é remarcadamente rápida e os eventos envolvidos nas respostas regenerativas são precisos, cuidadosamente orquestrados e altamente regulados. Os hepatócitos passam de seu estado quiescente para aquiescente, já

nas primeiras horas após cirurgia, ocorre síntese protéica, atividades mitótica e enzimática. Os lóbulos residuais crescem alcançando o tamanho e volume do fígado original, em seguida param completa e abruptamente, sem promover nenhum crescimento. Essa habilidade do fígado para regenerar-se é governada pelo complexo de sinalização e transdução de sinais, eventos que dependem da atividade metabólica do fígado, interação entre células parenquimais e não parenquimais, componentes da matriz extracelular, componentes endócrinos, autócrinos e parácrinos e circuitos neuronais regulatórios. A sobrecarga metabólica e /ou de nutrientes são importantes fatores na iniciação da resposta ao crescimento celular dos hepatócitos.

Com o avanço das sofisticadas técnicas de Biologia Celular e Molecular já alcançamos habilidades para tentar elucidar os eventos envolvidos na replicação celular, *in vivo*, lançando mão das importantes informações sobre fatores de crescimento e inibidores hepáticos (RICHMAN *et al.*, 1976; NAKAMURA *et al.*, 1988 – 1989; MIYZAWA *et al.*, 1989; ZANEGAR & MICHALOPOULOS, 1991; ZANEGAR *et al.*, 1991), fatores de replicação de DNA (HIGASTSHITSUJI *et al.*, 1995), receptores e transdução de sinal (STEER, 1995), modulação e expressão de genes (HABER *et al.*, 1993; HAGIYA *et al.*, 1994) e ciclo celular ativo (YAMAMOTO *et al.*, 1995)

KANAYAMA & YAMAGUCHI (1995) estudaram as alterações do conteúdo de cálcio, atividade da Ca^{++} ATPase, conteúdo e fragmentação de DNA no núcleo das células hepáticas em regeneração. Demonstraram que há elevação da atividade da Ca^{++} ATPase com correspondente aumento do conteúdo de cálcio nuclear. Esse sistema sinalizador de cálcio pode ser envolvido na regulação da função nuclear de DNA, no processo de regeneração do fígado de ratos. O aumento da atividade dessa enzima e do conteúdo de DNA evoca uma diminuição da fragmentação de DNA nuclear, sugerindo função do transporte de cálcio no sistema de proliferação das células do fígado.

A relação entre a ação das citocinas e a regeneração do fígado de ratos, após HP de 70% do órgão, foram estudadas por HIGASHITSUJI *et al.* (1995) quando verificaram que as IL-1 α e β mRNA aumentam transitoriamente uma hora após HP, sugerindo cinética específica na expressão do gene citocina no fígado. Especial atenção

tem sido dada para a interação entre células parenquimais (PC) e não parenquimais (NPC) para manter a integridade da função hepática. As células de Kupffer e as do endotélio sinusoidal – células NPC – produzem ativamente mediadores solúveis, incluindo citocinas e fator humoral, que podem estar envolvidos na proliferação e homeostasia dos hepatócitos.

Para elucidar o metabolismo do colágeno hepático durante a regeneração do fígado de ratos, YAMAMOTO *et al.* (1995) mediram o conteúdo, a síntese de colágeno e a atividade colágeno-dependente no fígado remanescente em 3,5,7, e 14 dias após 68% de HP. Os autores demonstraram que a síntese de colágeno aumenta significativamente aos 3, 5 e 7 dias após HP atingindo o pico máximo no quinto dia, já o conteúdo de colágeno no fígado remanescente, aumenta rapidamente com a regeneração até o sétimo dia. A síntese de colágeno hepático foi significativa e inversamente correlata com a atividade do Cathepsin L e com a degradação intracelular de novo colágeno sintetizado. Sugerem que a combinação do aumento da síntese com a diminuição da degradação de colágeno podem contribuir para um rápido suprimento de colágeno, durante a fase inicial da regeneração hepática.

De acordo com o trabalho realizado por YAMAGUCHI & KANAYAMA (1995), o metabolismo hepático é regulado pelo aumento de cálcio no citosol das células hepáticas devido estimulação hormonal, sendo esses efeitos amplificados pela calmodulina e proteína Kinase. O peso do fígado dos ratos foi completamente restaurado e o conteúdo de cálcio aumentou significativamente, após retirada de 70% do tecido hepático. Os níveis de regucalcin mRNA, claramente aumentaram do primeiro ao quinto dia após HP, quando comparados ao controle, sugerindo importante função do regucalcin na regulação da função celular do fígado relacionada à função do cálcio.

Trabalho realizado por TSUKAMOTO *et al.* em 1996, mostra que durante a regeneração hepática, após dois terços de hepatectomia parcial, as alterações da atividade enzimáticas da TK são causadas pela correspondente alteração dos níveis da proteína TK que é controlada pelos níveis de mRNA. A prolongada hipocalcemia induzida por bloqueadores dos canais de cálcio inibe a atividade de TK pela repressão dos níveis de

mRNA, sugerindo alterações nos processos fisiológicas que controlam o crescimento celular.

CHIJIWA *et al.* (1996) estudaram a razão entre a síntese de ácidos biliares e a síntese de DNA na regeneração hepática de ratos. Através do estudo da atividade da enzima 7α -hidrolase, razão limitante para a síntese de ácidos biliares, em microsomas de fígado de ratos, concluíram que a atividade dessa enzima está suprimida durante o período de ativação da síntese de DNA após HP. A razão entre a síntese de DNA é inversamente correlacionada à síntese enzimática da colesterol 7α -hidrolase, na regeneração hepática pós HP.

Foi demonstrado por YAMAGUCHI & UEOKA (1997), que o regucalcin, – proteína ligante de cálcio – isolada do citosol de fígado de ratos normais e/ou parcialmente hepatectomizados, pode ter função inibitória na regulação da síntese de RNA. O peso do fígado aumentou em 50% no primeiro dia após hepatectomia parcial, em relação aos ratos normais. Sugerindo que o regucalcin pode estar envolvido na regulação da síntese de RNA no núcleo do fígado de ratos.

Recentemente, YAMAGUCHI & KATSUMATA e OMURA & YAMAGUCHI, (1999) investigaram os efeitos do Regucalcin, uma proteína ligante de cálcio, na regeneração hepática de ratos após HP. YAMAGUCHI & KATSUMATA (1999) estudaram atividade da proteína Kinase no citosol de hepatócitos de ratos, após 68% de HP, e verificaram que a atividade da proteína kinase está aumentada no citosol das células hepáticas em regeneração e que o regucalcin endógeno tem função inibitória no aumento da fosforilação de proteínas por várias proteínas kinases. OMURA & YAMAGUCHI (1999) estudaram a função do regucalcin endógeno na regulação da atividade da fosfatase neutral e demonstraram que a atividade dessa enzima está aumentada no citoplasma e no núcleo dos hepatócitos em regeneração, após 70% de HP e que esse aumento pode ser regulado pelo regucalcin.

O constante interesse no estudo de regeneração hepática após HP, despertou atenção dos pesquisadores levando-os a explorarem outras áreas. Assim, CASTRO *et al.* (2001) estudaram os efeitos da bioestimulação do laser na regeneração hepática de ratos

parcialmente hepatectomizados . Os resultados mostraram diminuição da atividade enzimática sérica da ALT e AST, aumento da produção de ATP, aumento da atividade mitocondrial e proliferação intensa de hepatócitos nos ratos irradiados com laser após HP, sugerindo explanação do uso terapêutico de laser na regeneração do tecido hepático. YAKIMOFF *et al.* (2003) pesquisaram os efeitos da radiação laser de baixa potência na regeneração hepática de ratos parcialmente hepatectomizados e tratados com verapamil. Os autores avaliaram a atividade enzimática da AST, ALT e GGT e bem como a concentração de proteínas totais, no fígado e no plasma. Concluíram que o verapamil promove efeito hepatoprotetor pela redução da atividade enzimática aos 14 dias após HP e pelo aumento da capacidade do fígado em sintetizar proteínas. A terapia laser, isoladamente, promove uma possível bioestimulação do tecido hepático, mantendo os níveis enzimáticos favoráveis a recuperação tecidual. Porém, a associação das duas terapias, laser e verapamil, demonstraram exacerbação da atividade enzimática da AST e ALT, sugerindo atenção de relevância clínica no que diz respeito ao uso dessas terapias associadas.

Com base na literatura exposta, não há estudos que avaliem a ação do verapamil sobre a regeneração hepática após hepatectomia de dois terços do fígado, simultaneamente, por meio do estudo da atividade de várias enzimas (AST, ALT, ALP, GGTe Colinesterase), da análise de proteínas totais e albumina e da análise histológica, o que despertou nosso interesse nesse estudo.

A droga de eleição empregada foi cloridrato de verapamil (Dilacoron^R), primeiro bloqueador de cálcio a ser usado com finalidade terapêutica. Atualmente, a indicação do seu uso terapêutico se estende além das cardiopatias, como por exemplo no tratamento da enxaqueca, cólicas biliares e diminuição da pressão intraocular. Por isso, atualmente, constitui uma droga de suma importância no campo de pesquisas biológicas atuais.

3 - PROPOSIÇÃO.

CONSIDERANDO-SE :

a) que o cálcio é elemento importante na formação dos tecidos biológicos, com função chave no metabolismo respiratório das células hepáticas;

b) que a maioria das lesões hepáticas induzidas por drogas e ou traumatismos é cálcio- dependente;

c) que os bloqueadores dos canais de cálcio (BCC) atuam em vários tecidos biológicos em desenvolvimento;

d) que o verapamil (BCC) é droga largamente utilizada no tratamento de distúrbios cardiovasculares por tempo prolongado ou por toda a vida, reveste-se do maior interesse o estudo de seus efeitos colaterais, desejáveis ou não, em quaisquer outros órgãos e sistemas;

OBJETIVOU-SE estudar a influência do verapamil sobre a regeneração hepática de ratos submetidos a hepatectomia parcial de dois terços do fígado, observando-se:

1) evolução histomorfológica do órgão;

2) evolução funcional do fígado em regeneração, por meio da avaliação da concentração de **Proteínas Totais (PT)** e **Albumina (ALB)** e da atividade enzimática, da: **Colinesterase (chE)**, **Fosfatase alcalina (ALP)**, **γ -glutamil transferase (GGT)**, **Aspartato aminotransferase (AST)** e **Alanina aminotransferase (ALT)**, no tecido hepático e no sangue.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Animais.

Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, com idade de 90-100 dias ao início das experiências, pesando entre 180 a 200g, S.P.F, criados em condições padronizadas desde o nascimento e fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade de Campinas - CEMIB/UNICAMP. Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, a saber:

Grupo1 - **Grupo HV** - Constituído de 24 ratos hepatectomizados e tratados com verapamil.

Grupo2- **Grupo H** – Constituído de 24 hepatectomizados e não tratados com verapamil.

Grupo 3- **Grupo V** – Constituído de 24 ratos não hepatectomizados e tratados com verapamil .

Grupo 4 – **Grupo L** - Constituído de 24 ratos submetidos a Laparatomia (cirurgia simulada) e manipulação do fígado, não hepatectomizados e não tratados com verapamil.

Grupo 5 - **Grupo C – Controle** - Constituído de 24 ratos não submetidos a hepatectomia parcial, laparatomia ou tratamento com verapamil.

Para as cirurgias, os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina (10mg/Kg) associada a xilazina (4mg/Kg), administrada por via intraperitoneal.

4.2 – Drogas

Cloridrato de verapamil ($C_{27} H_{38} N_2 O_4 - HCL$) - Dilacoron[®], na dose de 24mg/rato/dia;

Ketamina ($C_{13}H_{16}ClNO$) anestésico geral de uso veterinário na dose de 10mg/Kg;

Xilazina ($C_{12}H_{16}N_2S$) sedativo, analgésico e relaxante muscular na dose de 4mg/Kg;

Kit de reagentes analítico LABTEST (ANALISA DIAGNOSTICA), para análises bioquímicas.

4.3 - Administração de verapamil

A droga foi adicionada na água de beber e administrada durante 14 dias antes das cirurgias e após, até o sacrifício dos animais, na dose de 24 mg/rato/dia, utilizando-se o esquema preconizado por VILELA-GOULART *et al.* (1999).

4.4 - Hepatectomia parcial e cirurgia simulada

Foram utilizadas duas técnicas cirúrgicas distintas, a de hepatectomia parcial descrita por HIGGINS & ANDERSON (1931) e a de cirurgia simulada descrita por KANASHIMA *et al* (1983). Para a hepatectomia parcial realizou-se incisão abdominal na linha mediana, de 3-4 cm, próximo ao apêndice xifóide. Por compressão do abdôme ocorreu a extrusão dos lóbulos mediano e lateral esquerdo do fígado, os quais foram retirados após ligação de seus pedículos ("lóbulos retirados"). O abdôme foi suturado em dois planos, ficando, na cavidade abdominal, os lóbulos lateral direito e pequeno caudado, para regeneração ("lóbulos residuais"). Para a cirurgia simulada (laparotomia) seguiu-se o mesmo procedimento, realizando-se somente a extrusão e manipulação do órgão.

Os lóbulos em regeneração foram retirados em três tempos, a saber: 10, 20 e 30 dias após a hepatectomia parcial. Em paralelo, considerando-se os mesmos tempos, retirou-se também os correspondentes lóbulos hepáticos dos animais dos grupos cirurgia simulada, tratado com verapamil e do controle.

4.5 - Coleta das amostras biológicas

4.5-1-Coleta de sangue e obtenção do soro

As amostras de sangue foram coletadas da veia cava, por ocasião do sacrifício dos animais, com auxílio de tubos “vacuotainer” e mantidas sob resfriamento. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada a 4.º C e 10.000 rpm por 10 minutos, para obtenção de amostras de soro para análises bioquímicas.

4.5-2 - Coleta de tecido hepático

A porção retirada foi recebida sob resfriamento em tampão fosfato (pH 7,4) -1 grama de tecido para 3ml de tampão - homogeneizada com auxílio de moimho de abertura de células (Potter) e preparada para determinações bioquímicas. Fixou-se um fragmento em formol a 10% para análise histológica complementar.

4.6 - Análises bioquímicas

Foram realizadas nas amostras biológicas de fígado e soro.

4.6-1- Proteínas totais (PT) e albumina (ALB). Foram realizadas, respectivamente, pelo método do biureto e pelo método do verde bromocresol descritos por GORNALL (1949).

4.6-2- Colinesterase (Che). Utilizou-se o método descrito por DIETZ *et al.* (1973).

4.6-3- γ -glutamil transferase (GGT). Utilizou-se o método descrito por BERGMAYER (1983).

4.6-4- Fosfatase alcalina (ALP). Utilizou-se o método descrito por ROY (1970)

4.6-5- Aspartato e alanina aminotransferase (ALT e AST). Utilizou-se o método descrito por REITMAM & FRANKEL (1957).

Para análises bioquímicas de colinesterase utilizou-se de “Kit” de reagentes DOLES e para as outras análises utilizou-se de “Kits” de reagentes químicos LABTEST adquiridos do laboratório ANALISA DIAGNOSTICA S.A .

4.7 – Análise Histológica complementar

Fragmentos de fígado retirados dos lóbulos lateral esquerdo foram fixados em formol a 10% por 72 horas. Posteriormente incluídos em paraplast (Oxford, St Louis, USA) seccionados em 5 micrômetros de espessura, corados com HE, analisados em microscopia ótica e fotografadas. Através de leitura microscópica foram pesquisadas manifestações histopatológicas tais como: esteatose, necrose e edema intracelular (tumefação). Considerando a área central do corte histológico, os critérios usados para avaliação seguiram os seguintes graus de intensidade:

N = células normais

+ = alterações celulares leves

+ + = alterações celulares moderadas

+ + + = alterações celulares severas

+ + + + = alterações celulares intensa

4.8- SISTEMATIZAÇÃO DA PESQUISA

Para estudo da regeneração hepática, convencionou-se a seguinte denominação: “**fígado retirado**” tecido hepático normal retirado durante a hepatectomia,; “**fígado residual**” porção do fígado que permaneceu na cavidade abdominal após a cirurgia e “**fígado novo**” que sofreu o processo de regeneração.

Os procedimentos experimentais foram sistematizados como segue:

a) - Os ratos foram pesados, divididos aleatoriamente em cinco grupos (HV – H – L – V e C), mantidos em gaiolas, seis em cada qual, alimentados com dieta “LABINA”

ou similar, receberam água “*ad libitum*” em ciclo claro- escuro de 12h, com controle de temperatura e umidade. Os ratos tratados com verapamil foram mantidos em gaiolas individuais.

1 – Grupo HV – Os 24 ratos foram tratados com verapamil e, sob anestesia geral com associação de ketamina e xilazina, foram submetidos à hepatectomia parcial, com retirada em cerca de 70% do órgão.

2 – Grupo H – Os 24 ratos, sob anestesia geral com associação de ketamina e xilazina, foram submetidos à hepatectomia parcial, com retirada em cerca de 70% do parênquima hepático, porém não foram tratados com verapamil.

3 – Grupo L – Os 24 ratos, sob anestesia geral com associação de ketamina e xilazina, foram submetidos à cirurgia simulada por laparotomia, não sendo tratados com verapamil.

4 – Grupo V – Os 24 ratos foram tratados com verapamil, mas não sofreram qualquer procedimento cirúrgico

5 – Grupo C – Os 24 ratos não foram tratados com verapamil nem submetidos aos procedimentos cirúrgicos.

b) – O verapamil foi administrado por via oral, na água de beber, diariamente preparado segundo o esquema preconizado por VILELA-GOULART *et al.* (1999), da seguinte maneira: os comprimidos de Dilacoron® foram triturados em gral de porcelana e dissolvidos em água filtrada. A solução depois de filtrada foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico, completando-se o volume com água filtrada q.s.p. 30ml por rato. Colocou-se em frascos tipo mamadeira o volume de 30ml de solução de verapamil, distribuindo-se um por gaiola, para permitir a ingestão diária de 24mg/rato/dia. Para os ratos dos outros grupos experimentais - não tratados com verapamil – colocou-se apenas água filtrada no volume de 30ml/rato (180ml/gaiola), para padronização da experiência.

O volume da solução de verapamil oferecido diariamente a cada rato foi padronizado de acordo com resultados obtidos em experiência piloto, quando dez animais foram observados durante o período de sete dias. Calculando-se a média de consumo

semanal de água por rato, constatou-se que 30ml/dia seria o volume adequado para padronização da experiência, para que cada rato ingerisse completamente a droga dissolvida, na concentração proposta pelo esquema experimental. Este volume estaria sujeito a ajustes de acordo com a temperatura ambiente. Assim, após a ingestão completa do volume padrão de 30 ml da solução de verapamil, os ratos recebiam, se necessário, água filtrada pura, até a oferta, no dia seguinte, de nova solução com a droga.

Todos os animais foram tratados com a droga, durante 14 dias, antes da cirurgia, continuando-se o tratamento até o sacrifício (10, 20 e 30 dias após HP), seguindo-se rigorosamente o horário entre 8 e 8:30 horas. Os ratos não tratados receberam água filtrada obedecendo ao mesmo tempo e horário utilizado para os grupos tratados.

c) - Para a realização da hepatectomia parcial e /ou cirurgia simulada, os ratos foram mantidos em jejum por 12h antecedentes às cirurgias. Na ocasião da hepatectomia e/ou cirurgia simulada, foram anestesiados pela associação de ketamina (10mg/Kg) e xilazina (4mg/Kg), injetada por via intraperitoneal, tricotomizados na região abdominal seguido de anti-sepsia com polivinil-pirrolidone iodine (PVPI). Na hepatectomia parcial foram extirpados os lóbulos mediano e lateral esquerdo do fígado, após secção dos ligamentos suspensores e ligadura dos lóbulos com fio de algodão, permanecendo na cavidade abdominal do rato o chamado “fígado residual”, para processo de regeneração. Na cirurgia simulada seguiu-se o mesmo procedimento experimental, sem excisão do fígado, porém manipulando-o, com a finalidade de verificar-se a influência do estresse cirúrgico sobre os resultados. Após extrusão e manipulação, os lóbulos hepáticos expostos foram recolocados intactos na cavidade abdominal. Após as cirurgias, o abdôme foi suturado com fio de algodão em dois planos, musculatura e pele respectivamente, com pontos contínuos e a região novamente desinfetada. Posteriormente os ratos foram colocados nas respectivas gaiolas.

d)- No período pós-operatório, os ratos receberam solução de dextrose a 20%, na água de beber por dois dias consecutivos, para evitar possível hipoglicemia.

e)- Decorridos 10, 20 ou 30 dias após a hepatectomia parcial, sob anestesia com éter etílico, após tricotomia e anti-sepsia com Polvidini[®] da área cirúrgica, foi realizada

laparotomia retirando-se o fígado total de todos os ratos, bem como as amostras de sangue. Paralelamente, considerando-se o mesmo esquema experimental, ou seja, anestesia, tempo e antissepsia, retirou-se também por laparotomia, o fígado total dos ratos dos grupos cirurgia simulada, tratado com verapamil e do controle. Na vigência da anestesia, os animais foram sacrificados por decapitação. O fígado total retirado foi recebido em tampão fosfato pH 7,4, sob resfriamento e pesado. As porções do fígado – lóbulo direito e pequeno caudado – dos ratos hepatectomizados ou não, foram desprezadas. Os lóbulos mediano e lateral esquerdo foram divididos em duas partes. Um fragmento do fígado foi colocado em formol a 10% e posteriormente preparado para análise histológica. A outra porção (um grama), retirada de diferentes pontos da alíquota, foi mantida em banho de gelo, homogeneizada com tampão fosfato (3ml/g de tecido) em Potter-Elvehjem, filtrada em gaze e centrifugada a 10.000 rpm por dez minutos em centrífuga refrigerada (CR3i Jouan), a 4° C, separando-se o sobrenadante para determinações bioquímicas. As amostras de sangue (5ml) retiradas da veia cava, com auxílio de tubos “vacuotainer” foram também mantidas em banho de gelo e centrifugadas sob refrigeração, congelando-se o soro, sendo posteriormente analisado o perfil bioquímico. As amostras de fígado foram analisadas imediatamente após a homogeneização.

f)- Para todas as análises bioquímicas, utilizou-se “KIT” de reagentes analíticos LABTEST adquiridos do laboratório ANALISA DIAGNÒSTICA S.A. As leituras das amostras biológicas, em absorbância, foram realizadas em Espectrofotômetro UV-VISIVEL SPEC 20-D-CID.

g) – Todas as cirurgias foram realizadas no período de 8 às 10h, para minimizar a influência das variações diurnas nas respostas regenerativas. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no tempo médio de 10 minutos para hepatectomia parcial e 5 minutos para cirurgia simulada.

h)– Para as análises histológicas complementares, as amostras de fígados fixadas em formol a 10%, após 72 horas foram preparadas seguindo técnica rotineira de histologia. As lâminas foram coradas pelo método de coloração com hematoxilina e eosina (HE), analisadas por microscopia ótica e posteriormente fotografadas.

4.9. Análise estatística

Os dados obtidos das análises bioquímicas foram estatisticamente analisados pelo método de análise de variância ANOVA com 5% de probabilidade representados graficamente pela média e desvio padrão da média. Foi realizado o teste de comparações múltiplas de TUKEY, considerando estatisticamente significante os valores com (***) $p < 0,001$ – (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$.

A fase experimental deste trabalho foi realizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP - no laboratório de Farmacologia e Experimentação Animal em São José dos Campos – SP. A Histologia do tecido hepático foi realizada no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP.

5 – RESULTADOS

São transcritos a seguir os resultados das análises bioquímicas realizadas no tecido hepático e no soro e bem como análise histológica do tecido hepático, dos diversos grupos experimentais.

Nas tabelas e nos gráficos estão computados os resultados das análises bioquímicas no tecido hepático e no soro dos ratos dos grupos controle (C), tratado com verapamil na dose de 24mg/rato/dia (V), hepatectomizado (H), hepatectomizado e tratado com verapamil na dose de 24mg/rato/dia, quatorze dias antes da HP e após até o sacrifício (HV) e laparatomizado (L), nos tempos 10, 20 e 30 dias. Todos os valores estão expressos em média e desvio padrão da média. Os valores com alterações significantes estão sinalizados com (***) $p < 0,001$ - (**) $p < 0,01$ - (*) $p < 0,05$.

Para facilitar a interpretação dos resultados, os grupos experimentais estão representados por letras seguidas dos números 10, 20 e 30, correspondentes aos tempos de tratamento com verapamil após hepatectomia parcial (10 dias, 20 dias e 30 dias) ao momento do sacrifício dos animais.

Os resultados bioquímicos de proteínas totais (PT) e albumina (ALB) estão expressos em concentração (g/dl), enquanto que os das dosagens enzimáticas em U/ml e U/L.

A atividade enzimática expressa em U/L é a quantidade de enzima que transforma 1 μ mol de substrato em produto, no tempo de 1 minuto.

5.1- Análises bioquímicas

5.1.1- **Concentração de Proteínas Totais (g/dl) - PT.**

Os dados da **Tabela 1 e Figuras 1 (A e B)**, referem-se às concentrações de proteínas totais no fígado e soro de ratos.

5.1.1.1- Resultados no fígado - **Figura 1 A.**

Observa-se na figura 1 A, uma variação na concentração de PT em todos os grupos estudados nos tempos 10 e 20 dias, em relação aos respectivos grupos controle, contudo essa variação não foi estatisticamente significativa.

A concentração de PT nos grupos V, não mostrou diferença significativa, em relação aos correspondentes grupos controle e os tempos estudados.

Nos grupos H e HV as concentrações de PT aumentaram significativamente em relação direta aos tempos estudados ($p < 0,001$), ou seja apresentaram valores máximos no tempo 30 dias.

Verifica-se aumento estatisticamente significativo na concentração de PT nos grupos H30 ($p < 0,05$), HV30 e L30 ($p < 0,001$), em relação a C30, contudo os resultados encontrados no grupo V30 foram semelhantes a C30. Os valores médios encontrados nos grupos C30 ($5,4 \pm 0,4$) e V30 ($5,7 \pm 0,7$) estão apresentados na tabela 1.

Os grupos H30 e HV30 diferem entre si. No grupo H30, observa-se aumento significativo na concentração de PT, em relação a HV30 ($p < 0,001$).

O grupo L30 apresentou aumento significativo de PT, em relação a L20 ($p < 0,01$) e L10 ($p < 0,001$).

5.1.1.2- Resultados no soro - **Figura 1 B.**

Os níveis séricos de PT, no tempo 10 dias, não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados.

A **Figura 1 B**, mostra que no tempo 20 dias, a concentração de PT aumentou significativamente no grupo H20, em relação ao C20 ($p < 0,001$). A concentração de PT nos grupos V20, HV20 e L20 não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a C20.

Os níveis séricos de PT aumentaram significativamente nos grupos H30, HV30 ($p < 0,001$) e L30 ($p < 0,05$), em relação ao grupo C30, mostrando valores mais elevados no grupo H30.

A concentração de PT dos grupos V10, V20 e V30 não apresentaram diferença estatística, em relação aos seus respectivos grupos controle, nos três tempos estudados.

Os grupos H e HV não diferem entre si nos tempos estudados.

Pode-se observar ainda, na **Figura 1 (A e B)** que a concentração de PT no soro se encontra mais elevada do que no tecido hepático.

Tabela 1. Concentração de Proteínas Totais (g/dL) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média \pm SD para cada grupo (n=8)

Grupos Tempos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
10dias	5,2 \pm 0,4	5,4 \pm 0,5	4,1 \pm 1,5	4,3 \pm 1,1	4,2 \pm 0,8	6,8 \pm 0,7	6,7 \pm 0,8	6,3 \pm 0,3	6,1 \pm 0,9	6,7 \pm 0,3
20dias	5,4 \pm 0,3	5,2 \pm 0,7	6,1 \pm 0,4	5,7 \pm 0,7	5,4 \pm 0,4	7,4 \pm 0,5	6,9 \pm 0,7	8,8 \pm 0,2	8,0 \pm 0,4	7,0 \pm 0,2
30dias	5,4 \pm 0,4	5,7 \pm 0,7	8,8 \pm 0,4	7,9 \pm 0,3	7,3 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	7,0 \pm 0,4	9,8 \pm 0,3	8,9 \pm 0,6	8,3 \pm 1,4

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia

Difere do Controle

- * (p < 0,05)
- ** (p < 0,01)
- *** (p < 0,001)

Figura 1A - Concentração de Proteínas totais (g/dL) em fígado de ratos

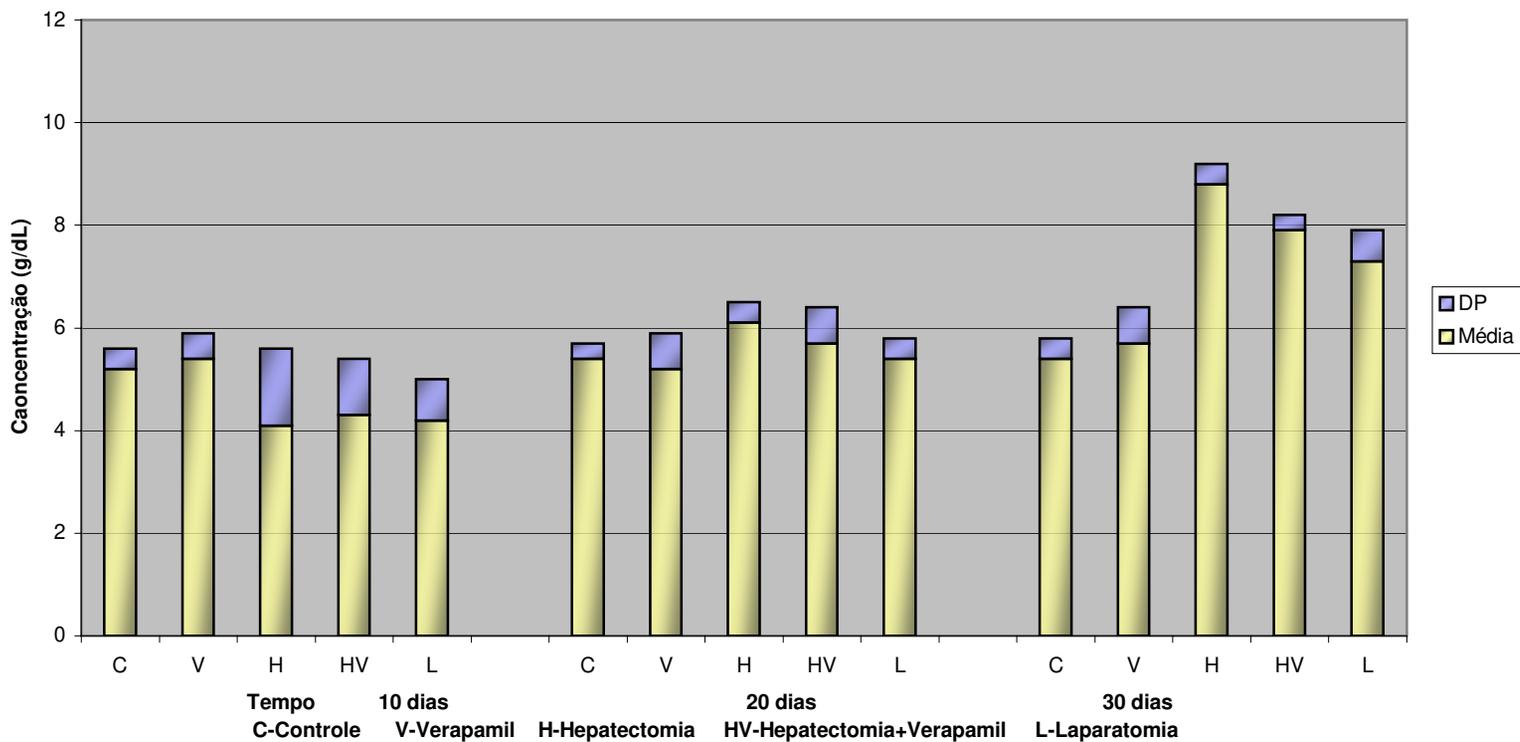
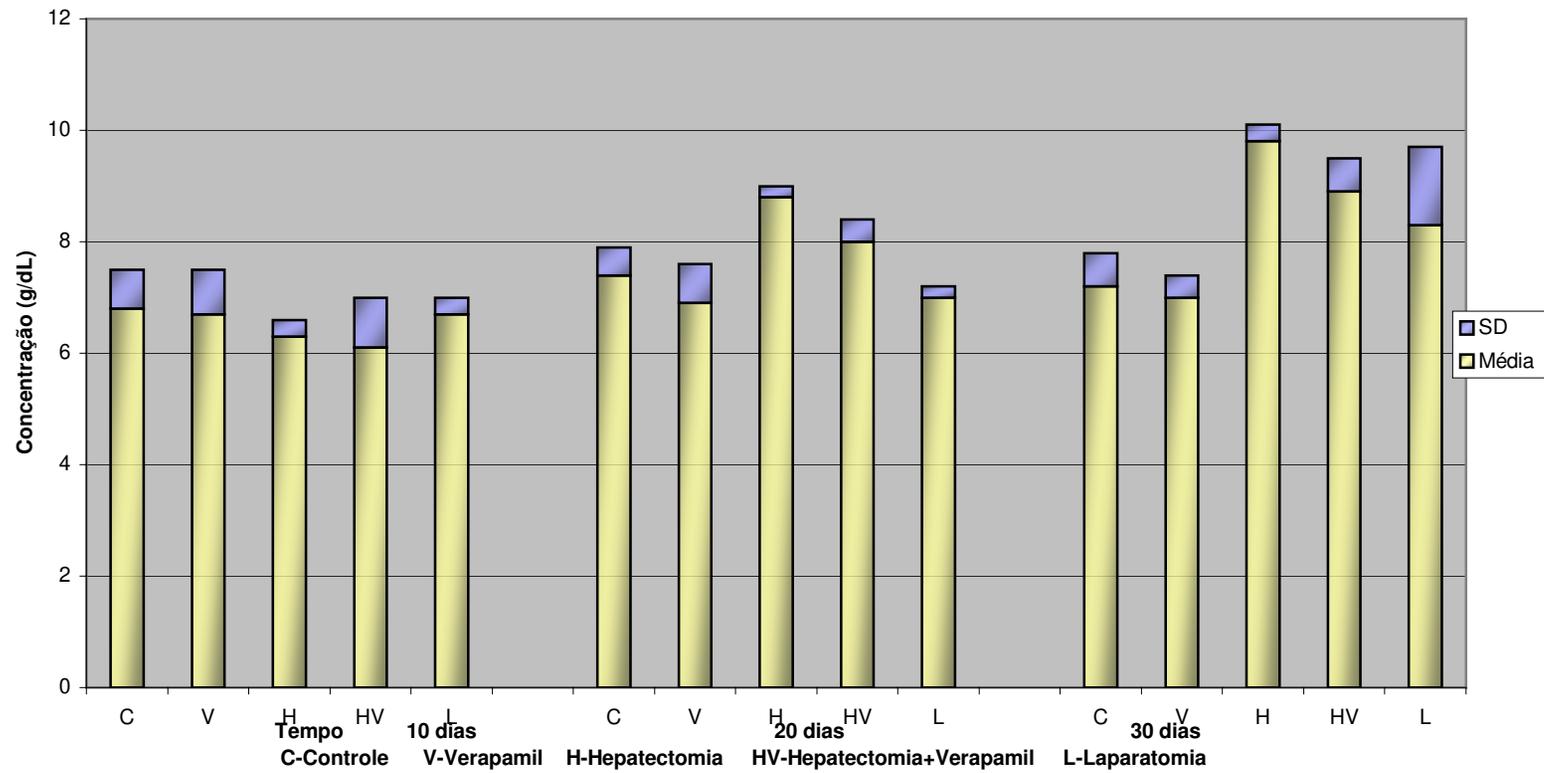


Figura 1B- Concentração de Proteínas Totais (g/dL) em soro de ratos



.1.2 – Concentração de Albumina (g/dL) – ALB.

Os valores médios da concentração de albumina estão apresentados na **Tabela 2** e representados nas **Figuras 2 (A e B)**.

5.1.2.1 Resultados no fígado - **Figura 2 A** .

Observa-se que a concentração de ALB, aumentou significativamente nos grupos V10, HV10 e L10, em relação ao grupo C10 ($p < 0,001$), contudo o grupo H10 não apresentou diferença significativa em relação a C10.

Verifica-se aumento significativo na concentração de ALB nos grupos V20, H20 e L20, em relação a C20 ($p < 0,001$).

Nos grupos V30, H30, HV30 e L30 consta aumento significativo na concentração de ALB, em relação a C30 ($p < 0,001$).

O grupo V manteve valores constantes em todos os tempos estudados: V10 ($3,0 \text{ g/dL} \pm 0,9$), V20 ($3,0 \text{ g/dL} \pm 0,1$) e V30 ($3,0 \text{ g/dL} \pm 0,3$).

Nos grupos H, HV e L, a concentração de ALB aumentou gradualmente em relação direta aos tempos estudados, ou seja alcançaram concentrações mais elevadas em 30 dias após as cirurgias.

Os grupos H e HV diferem entre si nos tempos 10 e 30 dias, enquanto que no tempo 20 dias as alterações não foram significantes. O grupo HV10 mostrou aumento significativo em relação ao H10 ($p < 0,001$) e o grupo HV30 mostrou diminuição significativa em relação ao H30 ($p < 0,05$).

O grupo L apresentou aumento significativo na concentração de ALB em relação direta aos tempos estudados.

5.1.2.2 – Resultados no soro - **Figura 2 B**

Analisando a **Figura 2 B**, verifica-se que os níveis séricos de ALB, apresentaram-se mais elevados que aqueles encontrados no tecido hepático.

Os níveis séricos da ALB aparecem significativamente diminuídos nos grupos H10, HV10 e L10, em relação a C10.

No grupo V10, os níveis séricos não diferiram de C10, mas aumentaram significativamente em relação ao V20 ($p < 0,05$) e V30 ($p < 0,001$).

Nos grupos V20 e H20, a concentração de ALB aumentou significativamente em relação ao C20 ($p < 0,001$). Os grupos HV20 e L20 não apresentaram diferença estatística em relação ao C20

Os grupos V30, H30, HV30 e L30, demonstraram valores elevados em relação a C30 ($p < 0,001$), mostrando valores mais expressivos no grupo H30.

Observa-se que nos grupos H e HV, os níveis séricos de ALB aumentaram gradualmente, alcançando níveis máximos em H no tempo 30 dias.

Os grupos H e HV diferem entre si em todos os tempos estudados. Os níveis séricos de ALB no grupo HV10 aumentaram em relação aos do grupo H10 ($p < 0,001$) e diminuíram em relação ao H20 e H30 ($p < 0,001$).

O grupo L20 apresentou aumento significativo na concentração de ALB, em relação ao L10 ($p < 0,001$) e manteve seus valores semelhantes ao L30.

Tabela 2. Concentração de Albumina (g/dL) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média ± SD para cada grupo (n=8)

Grupos Tempos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
10dias	2,1 ± 0,1	3,0 ± 0,9	1,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,0 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1
20dias	2,2 ± 0,1	3,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1	3,9 ± 0,6	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,8 ± 0,1
30dias	2,2 ± 0,1	3,0 ± 0,3	5,3 ± 0,1	4,9 ± 0,2	4,8 ± 0,2	3,7 ± 0,3	4,6 ± 0,1	6,1 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia

Difere do controle

* (p< 0,05)

** (p<0,01)

*** (p< 0,001)

Figura 2A - Concentração de Albumina (g/dL) em fígado de ratos

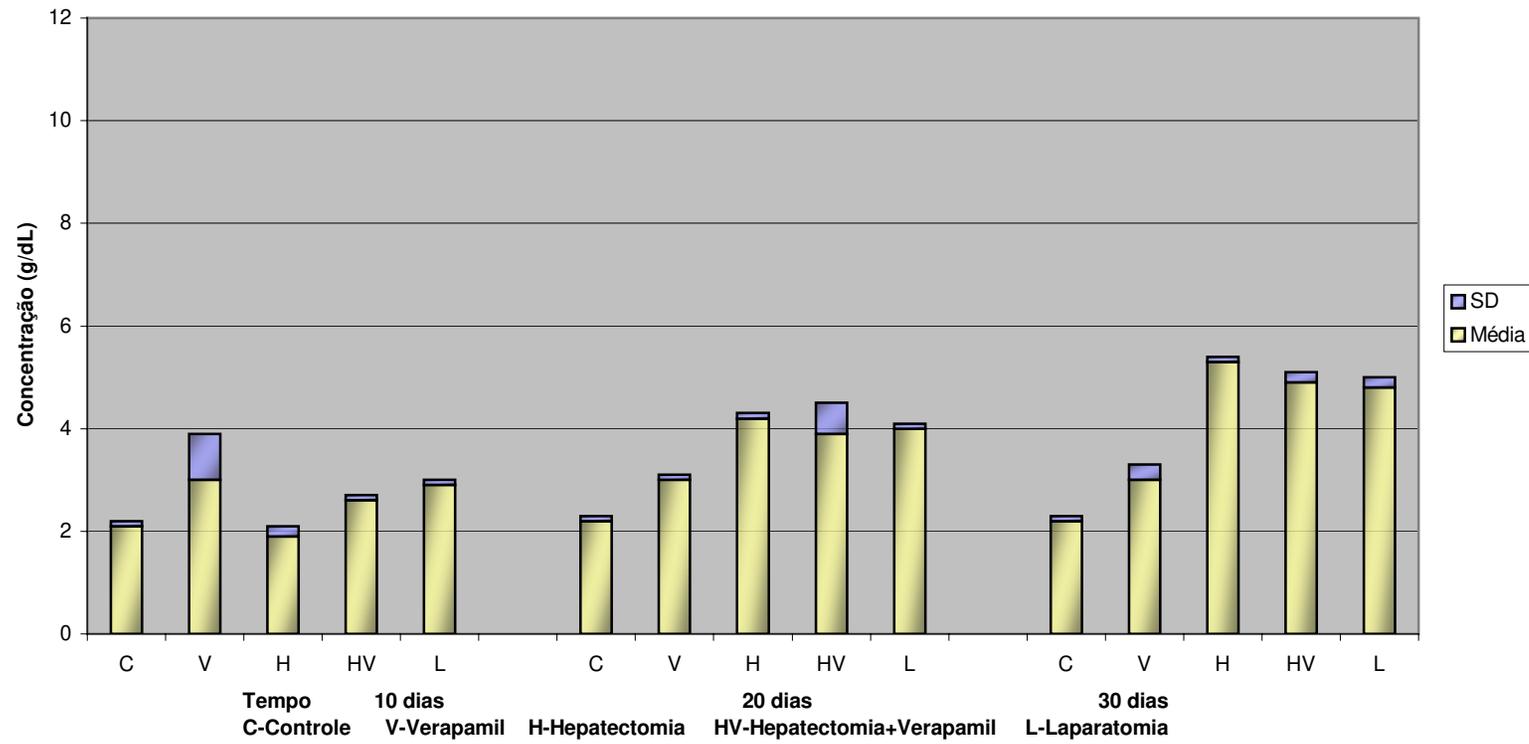
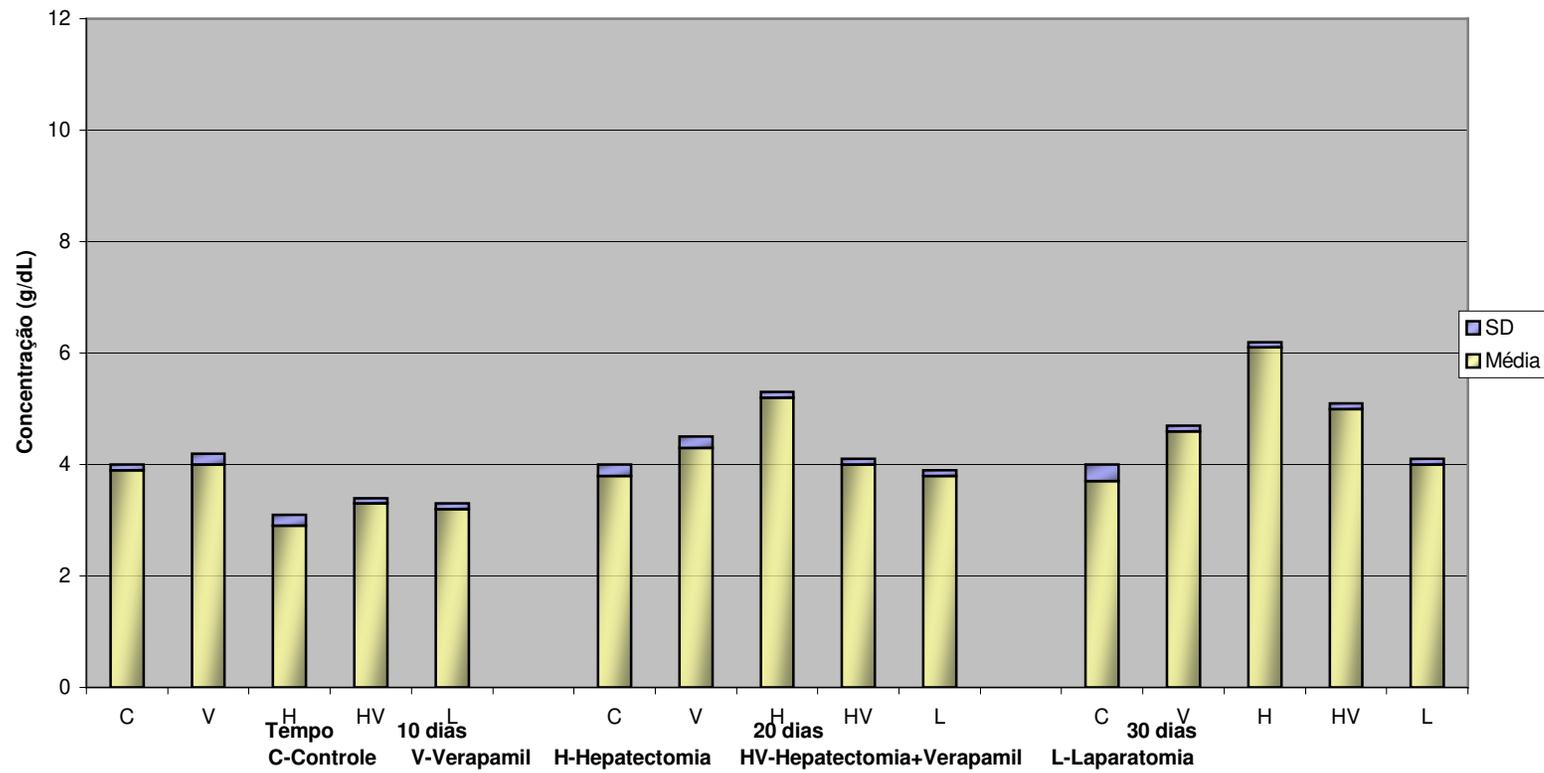


Figura 2B - Concentração de Albumina (g/dL) em soro de ratos



5-1-3 – Atividade enzimática da colinesterase (U/ml) – chE.

A **Tabela 3** e as **Figuras 3 (A e B)** mostram os valores médios da atividade enzimática da colinesterase (chE) no fígado e soro de ratos.

5.1.3.1 – Resultados no fígado – **Figura 3 A.**

Observa-se uma diminuição significativa da atividade enzimática da chE nos grupos H, HV e L nos três tempos estudados, em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,001$).

No grupo V10 os valores encontrados mostraram-se semelhantes aos valores de C10, enquanto que nos grupos V20 e V30 aumentaram significativamente em relação aos respectivos controles ($p < 0,001$).

Observa-se que existe uma relação direta entre o aumento da atividade da chE encontrada nos grupos V e os tempos estudados.

No grupo HV20, observa-se aumento significativo da atividade enzimática da chE em relação ao HV10 ($p < 0,001$), enquanto que no grupo HV30, os valores diminuíram em relação ao HV20 ($p < 0,001$) e aumentaram em relação ao HV10 ($p < 0,05$).

Quando se compara os grupos, HV e H entre si, verifica-se aumento significativo no grupo HV nos três tempos estudados, alcançando níveis enzimáticos máximos no tempo 20 dias ($p < 0,001$).

A atividade enzimática aumentou significativamente no grupo L20, em relação a L10 ($p < 0,05$) e diminuiu no L30 em relação ao L20 ($p < 0,01$), igualando-se aos valores encontrados no L10.

5.1.3.2 – Resultados no soro - **Figura 3B.**

Verifica-se diminuição significativa da atividade enzimática da chE nos grupos H, HV e L em todos os tempos estudados, em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,001$).

No grupo V10 os valores encontrados mostraram semelhança ao C10, enquanto que os valores encontrados no grupo V20 e V30, mostraram aumento significativo em relação aos respectivos controles, ($p < 0,001$). O aumento da atividade enzimática tem relação direta aos tempos estudados.

Nota-se que os níveis enzimáticos no grupo H20 e H30 ($4,5\text{U/L} \pm 0,3$ e $2,9\text{U/L} \pm 0,1$) são significativamente mais baixos que os encontrados no grupo HV20 e HV30 ($5,1\text{U/L} \pm 1,3$ e $4,7\text{U/L} \pm 0,6$) ($p < 0,001$), enquanto que no tempo 10 dias ($3,3 \pm 0,2$ e $4,0 \pm 0,6$) a diferença estatística entre os grupos não é significativa. Os resultados estão representados na **Tabela 3**.

No grupo HV20, a atividade da chE aumentou significativamente em relação ao HV10 ($p < 0,05$), contudo no HV30 os valores apareceram estatisticamente diminuídos em relação ao HV20 ($p < 0,05$) e semelhantes ao HV10 .

No grupo L20 os níveis enzimáticos aumentaram em relação ao L10 e L30, quando esses diminuíram igualando-se ao L10 ($p < 0,001$).

No soro os valores dos níveis enzimáticos da chE aparecem mais baixos do que aqueles encontrados no fígado (tabela 3).

Tabela 3. Atividade enzimática da Colinesterase (U/ml) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média ± SD para cada grupo (n=8)

Grupos Tempos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
10dias	71,8 ± 2,3	75,6 ± 2,3	40,6 ± 1,6	64,0 ± 1,5	45,6 ± 2,5	6,6 ± 0,3	7,5 ± 0,3	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,6	3,5 ± 0,2
20dias	72,3 ± 1,9	85,4 ± 1,8	51,0 ± 2,6	73,8 ± 2,5	54,3 ± 2,0	6,4 ± 0,4	9 ± 0,3	4,5 ± 0,3	5,1 ± 1,3	4,7 ± 0,2
30dias	73,4 ± 1,9	88,8 ± 2,5	42,2 ± 1,0	67,9 ± 1,9	43,8 ± 3,1	6,2 ± 0,2	11,2 ± 0,4	2,9 ± 0,1	4,7 ± 0,6	3,7 ± 0,2

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia

Difere do controle

* (p< 0,05)

** (p<0,01)

*** (p< 0,001)

Figura 3A - Atividade enzimática da Colinesterase (U/mL) em fígado de ratos

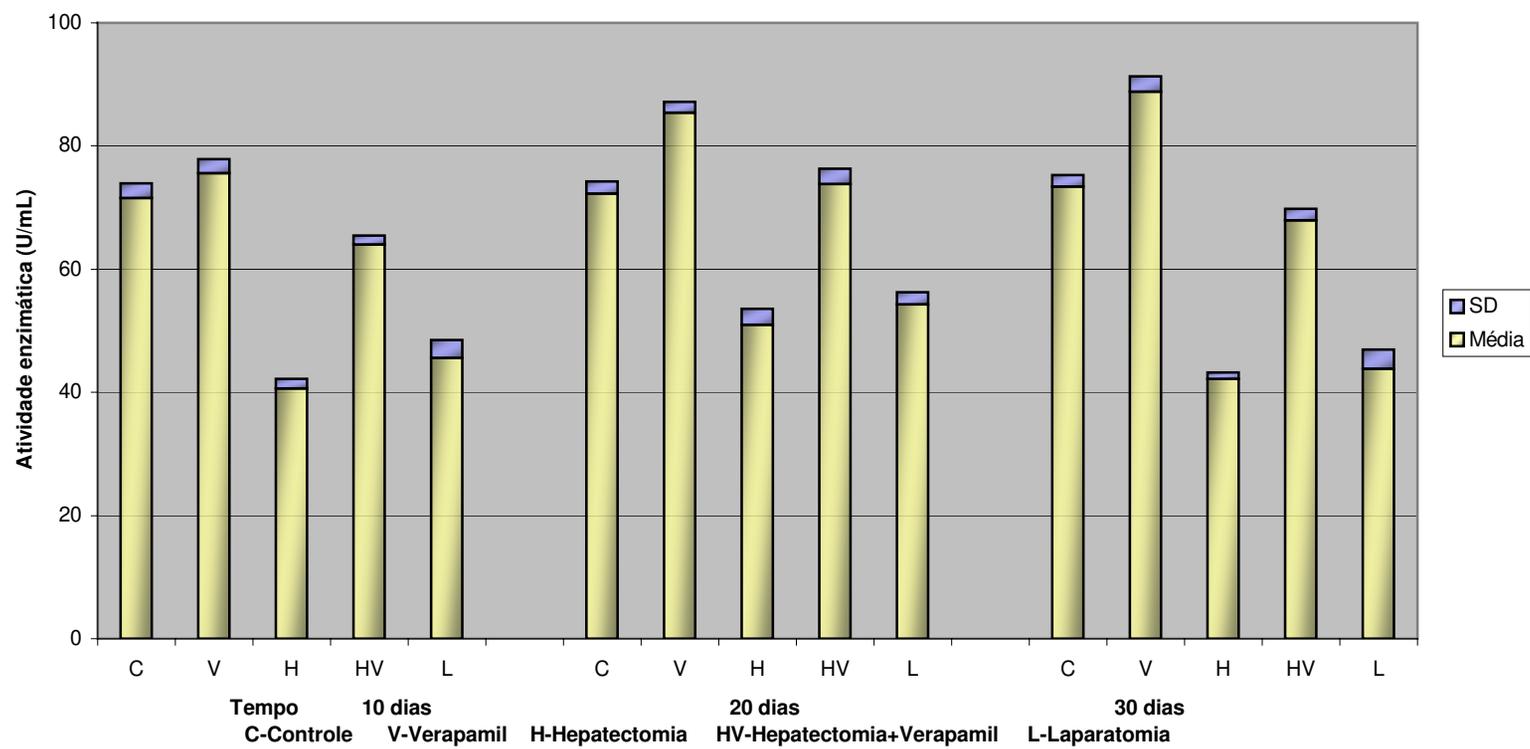
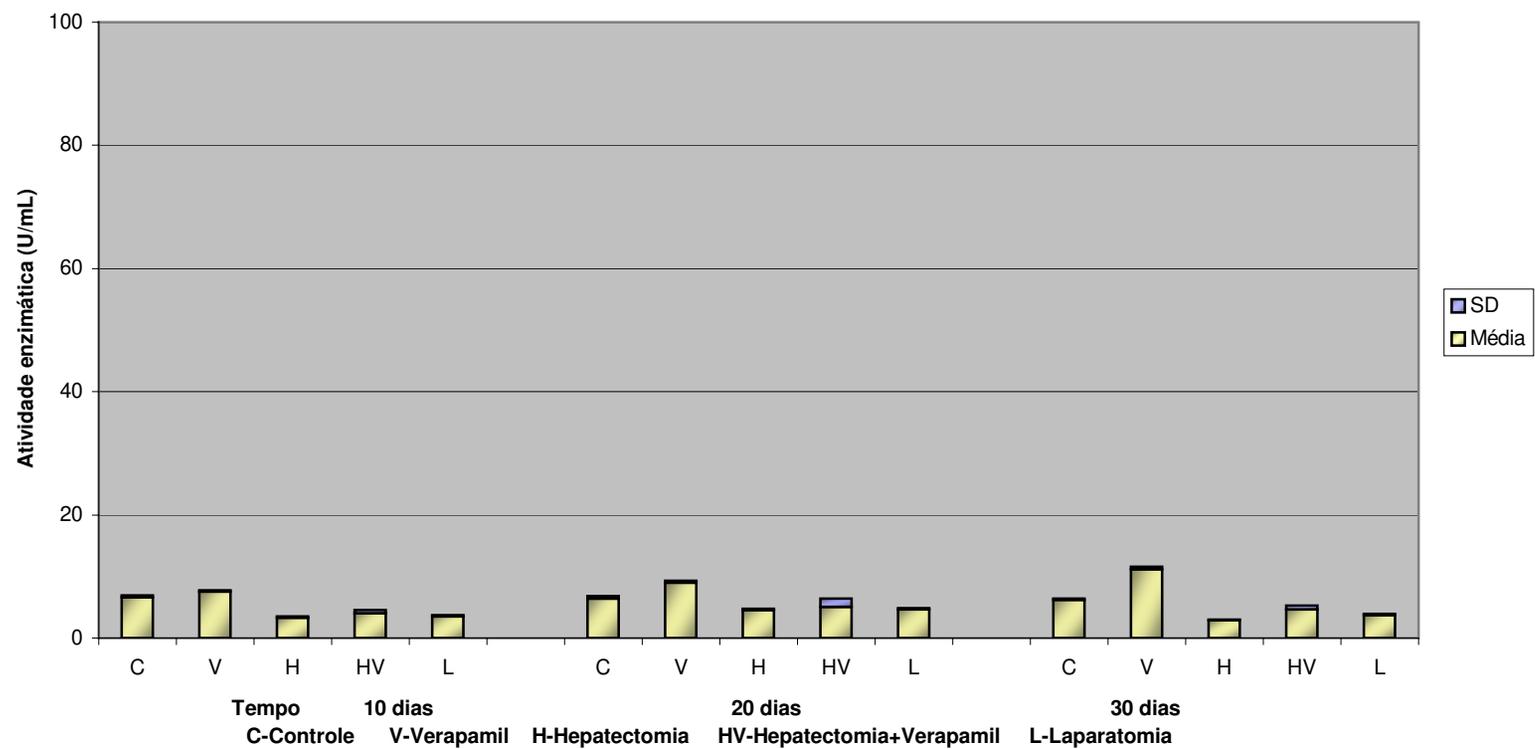


Figura 3B - Atividade enzimática da Colinesterase (U/mL) em soro de ratos



5.1.4 – Atividade enzimática da γ -Glutamil transferase (U/L) – GGT.

A **Tabela 4** e as **Figuras 4 (A e B)**, mostram os resultados obtidos das análises bioquímicas da atividade enzimática da GGT, no tecido hepático e no soro.

5.1.4.1 – Resultados no fígado – **Figura 4 A**

Podemos observar que houve aumento significativo da atividade enzimática da GGT nos grupos H10, HV10 em relação ao C10 ($p < 0,001$). Nos tempos 20 e 30 dias houve aumento significativo nos grupos H, HV e L, em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,001$). Não foi constatada diferença estatística entre os grupos V10, V20 e V30, em relação aos respectivos grupos controle.

Constata-se que a atividade enzimática da GGT aumentou significativamente nos grupos H10, H20 e H30, em relação aos correspondentes grupos controle ($p < 0,001$). Alcançou níveis máximos no tempo 20 dias e diminuiu bruscamente no tempo 30 dias, quando os valores se tornaram semelhantes ao grupo H10 ($p < 0,001$). Já no grupo HV10, a atividade enzimática aumentou estatisticamente em relação a C10 ($p < 0,001$), diminuiu bruscamente no tempo 20 e 30 dias em relação a HV10 ($p < 0,001$), e manteve valores mais baixos em relação ao grupo H, no tempo 30 dias. Os valores médios encontrados estão na **Tabela 4**: HV10 (710 U/L \pm 65), HV20 (437 U/L \pm 43) e HV30 (387 U/L \pm 71).

Comparando H e HV entre si, observa-se aumento significativo nos níveis enzimáticos do grupo HV10 ($p < 0,001$), diminuição no HV20 ($p < 0,001$). Entre H30 e HV30, não houve diferença estatística.

O grupo L10 apresentou aumento significativo na atividade da GGT no tempo 10 dias, alcançando níveis máximos no tempo 20 dias e diminuindo no tempo 30 dias ($p < 0,001$) com valores não significantes em relação ao L10.

5.1.4.2 – Resultados no soro – **Figura 4 B.**

A atividade enzimática da GGT aumentou significativamente nos grupos H e HV em todos os tempos estudados, em relação aos seus respectivos grupos controle

($p < 0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos V10, V20 e V30, em relação aos seus correspondentes grupos controle.

A atividade enzimática da GGT aumentou estatisticamente no grupo H, apresentando valores mais acentuados no tempo 20 dias, em relação ao tempo 10 dias ($p < 0,001$) e diminuiu significativamente no tempo 30 dias ($p < 0,001$), retornando aos valores semelhantes aos do grupo H10 ($p < 0,001$).

Observa-se aumento significativo da atividade enzimática da GGT no grupo HV10, atingindo níveis máximos no tempo 20 dias, e queda drástica no tempo 30 dias ($p < 0,001$), com valores muito abaixo daqueles encontrados no grupo HV10 ($p < 0,01$). Os valores são: HV10 ($346\text{U/L} \pm 47$), HV20 ($578\text{U/L} \pm 30$) e HV30 ($194\text{U/L} \pm 25$) e constam na **Tabela 4**.

Verifica-se valores estatisticamente aumentados nos grupos H20, HV20 e L20, em relação aos tempos 10 e 30 dias, sendo que HV apresenta resultados mais expressivos que H e L. A média \pm SD no tempo 20 dias foram : H ($423\text{ U/L} \pm 30$), HV ($578\text{ U/L} \pm 30$) e L (305 ± 23) e estão registrados na tabela 4.

O grupo H10 mostrou níveis enzimáticos estatisticamente diminuídos em relação aos grupos HV10 enquanto que o grupo H20 mostrou níveis enzimáticos nte aumentados em relação HV20 ($p < 0,001$). O grupo H30 e HV30, apresentaram diferença significativa em relação a H20 e HV20 ($p < 0,001$), mas não foram estatisticamente diferentes entre si.

O grupo L manteve os níveis enzimáticos semelhantes aos do grupo controle no tempo 10 dias, porém aumentou significativamente no tempo 20 ($p < 0,001$) e diminuiu no tempo 30 dias ($p < 0,001$) com valores não significantes em relação C30.

A atividade enzimática da GGT apresenta mais elevada no tecido hepático do que no soro, em todos os tempos e grupos estudados.

Tabela 4. Atividade enzimática da Gama Glutamil Transferase (U/L) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média ± SD para cada grupo (n=8).

Grupos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
Tempos										
10dias	267 ± 42	272 ± 41	395 ± 73	710 ± 64	319 ± 50	157 ± 30	165 ± 21	256 ± 23	346 ± 47	200 ± 15
20dias	266 ± 33	275 ± 44	787 ± 53	437 ± 43	518 ± 63	160 ± 14	171 ± 19	423 ± 30	578 ± 24	305 ± 23
30dias	265 ± 48	279 ± 55	452 ± 58	387 ± 71	404 ± 40	160 ± 17	175 ± 28	231 ± 28	194 ± 25	205 ± 26

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia

Difere do controle

* (p < 0,05)

** (p < 0,01)

*** (p < 0,001)

Figura 4A - Atividade enzimática da Gama Glutamil Transferase (U/L) em fígado de ratos

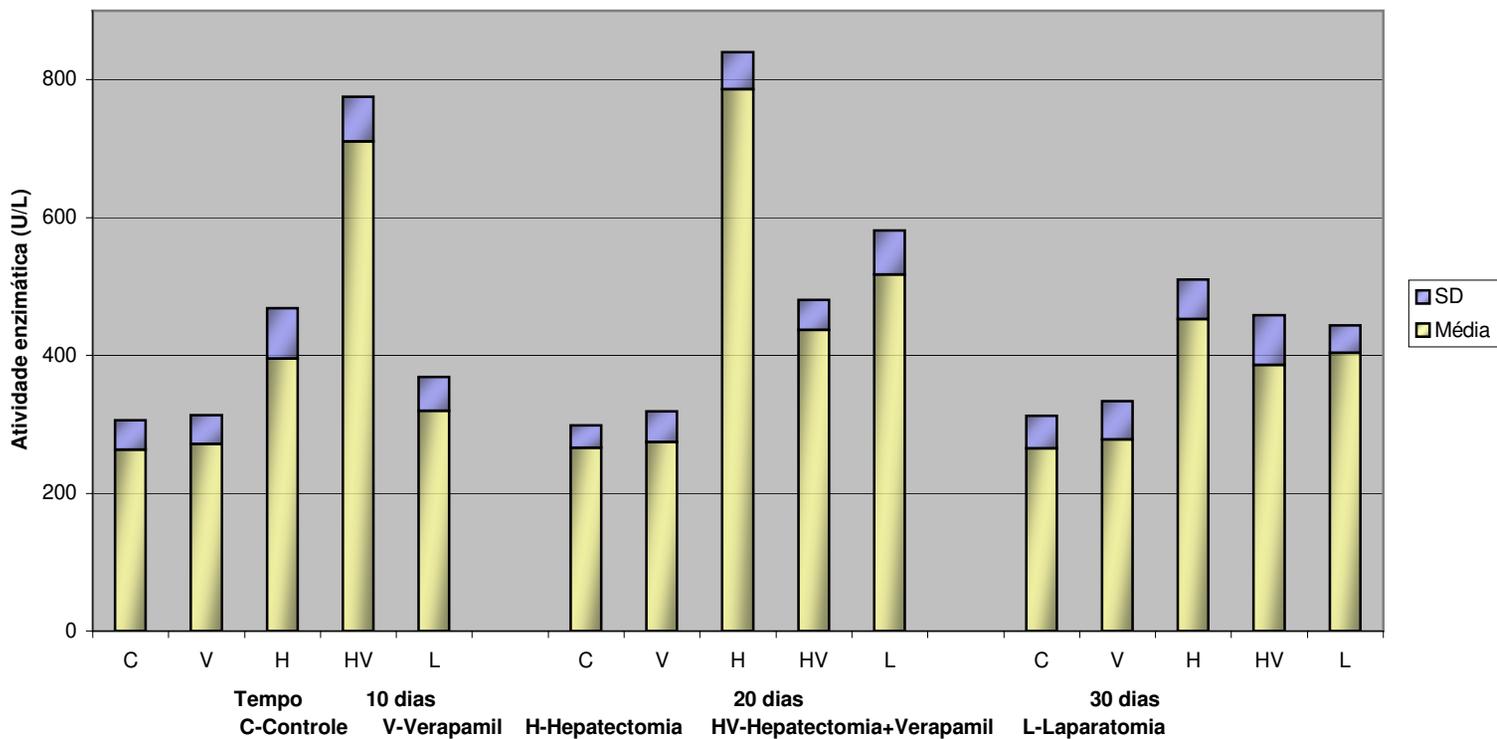
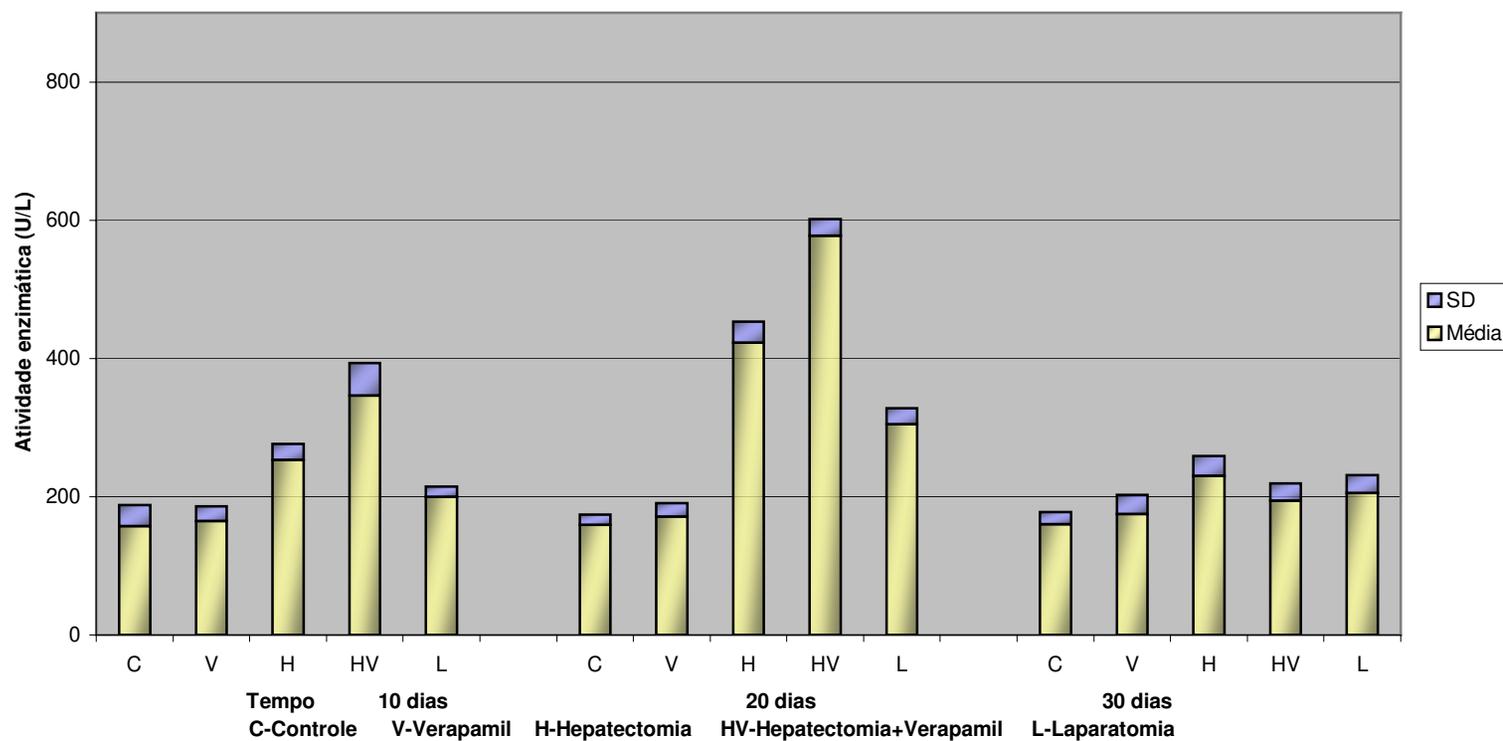


Figura 4B - Atividade enzimática da Gama Glutamil Transferase (U/L) em soro de ratos



5.1.5 - Atividade enzimática da Fosfatase alcalina (U/L) – ALP.

Na **Tabela 5** estão apresentados os resultados das análises bioquímicas da atividade enzimática da ALP no fígado e no soro, expressos em média \pm SD.

5.1.5.1 – Resultados no fígado – **Figura 5 A** .

A **Figura 5 A**, mostra aumento significativo na atividade enzimática da ALP no fígado de ratos em todos os grupos e tempos estudados, em relação a seus correspondentes grupos controle ($p < 0,001$).

Nos grupos H, HV e L, a atividade da ALP tem relação inversa aos tempos estudados, ou seja alcança níveis máximos no tempo 10 dias e diminui gradativamente até o tempo 30 dias.

Pode-se observar, ainda que a atividade da ALP nos grupos H10 e HV10, diferiram entre si, apresentando-se aumentada no HV10 ($p < 0,001$). No grupo HV20 os níveis enzimáticos apresentaram valores estatisticamente mais elevados que os do grupo H20 ($p < 0,001$), com diminuição gradual do tempo 10 para o tempo 30 dias ($p < 0,001$). Os grupos H30 e HV30, apresentaram valores diminuídos em relação a H20 e HV20, respectivamente, sendo que no grupo HV30 os níveis enzimáticos foram mais elevados que no H30 ($p < 0,001$)

No grupo V a atividade enzimática da ALP é diretamente proporcional aos tempos estudados, ou seja aumenta acentuadamente no tempo 10 dias em direção ao tempo 30 dias, quando alcança níveis máximos. O verapamil aumenta significativamente a atividade da ALP em relação aos demais grupos e aos tempos estudados ($p < 0,001$).

5.1.5.2 – Resultados no soro – **Figura 5 B**.

Verifica-se que os níveis enzimáticos da ALP apresentaram-se mais elevados no soro do que no tecido hepático, embora acompanhe os mesmos parâmetros bioquímicos detectados no fígado, com exceção dos grupos H30 e L30 cujos valores

diminuíram significativamente, alcançando níveis séricos semelhantes aos do grupo controle.

Houve aumento significativo da atividade da ALP nos grupos V, H, HV e L nos tempos 10 e 20 dias ($p < 0,001$), quando comparados aos respectivos grupos controle. Já no tempo 30 dias, pode-se observar que no grupo H e L, os níveis enzimáticos séricos são semelhantes àqueles do controle e significativamente mais baixos que H e L, no tempo 10 e 20 dias ($p < 0,001$)

Os níveis enzimáticos séricos da ALP no grupo V aumentam gradativamente em relação direta aos tempos estudados.

Pode-se observar também, uma acentuada diferença estatisticamente significativa nos níveis enzimáticos da ALP, entre os grupos H e HV, nos três tempos, sendo estes valores mais elevados no grupo HV ($p < 0,001$).

Tabela 5. Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (UL) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média \pm SD para cada grupo (n=8)

Grupos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
10dias	13 \pm 4	31 \pm 2 ^{***}	54 \pm 7 ^{***}	59 \pm 2 ^{***}	50 \pm 5 ^{***}	35 \pm 4	48 \pm 1 ^{***}	60 \pm 8 ^{***}	69 \pm 2 ^{***}	51 \pm 4 ^{***}
20dias	13 \pm 4	39 \pm 1 ^{***}	44 \pm 2 ^{***}	52 \pm 1 ^{***}	42 \pm 1 ^{***}	36 \pm 4	53 \pm 2 ^{***}	52 \pm 4 ^{***}	65 \pm 3 ^{***}	44 \pm 2 ^{***}
30dias	13 \pm 4	56 \pm 1 ^{***}	33 \pm 7 ^{***}	42 \pm 2 ^{***}	31 \pm 3 ^{***}	36 \pm 4	58 \pm 4 ^{***}	40 \pm 4 ^{***}	61 \pm 3 ^{***}	38 \pm 3 ^{***}

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia

Difere do controle

* (p < 0,05)

** (p < 0,01)

*** (p < 0,001)

Figura 5A - Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (U/L) em fígado de ratos

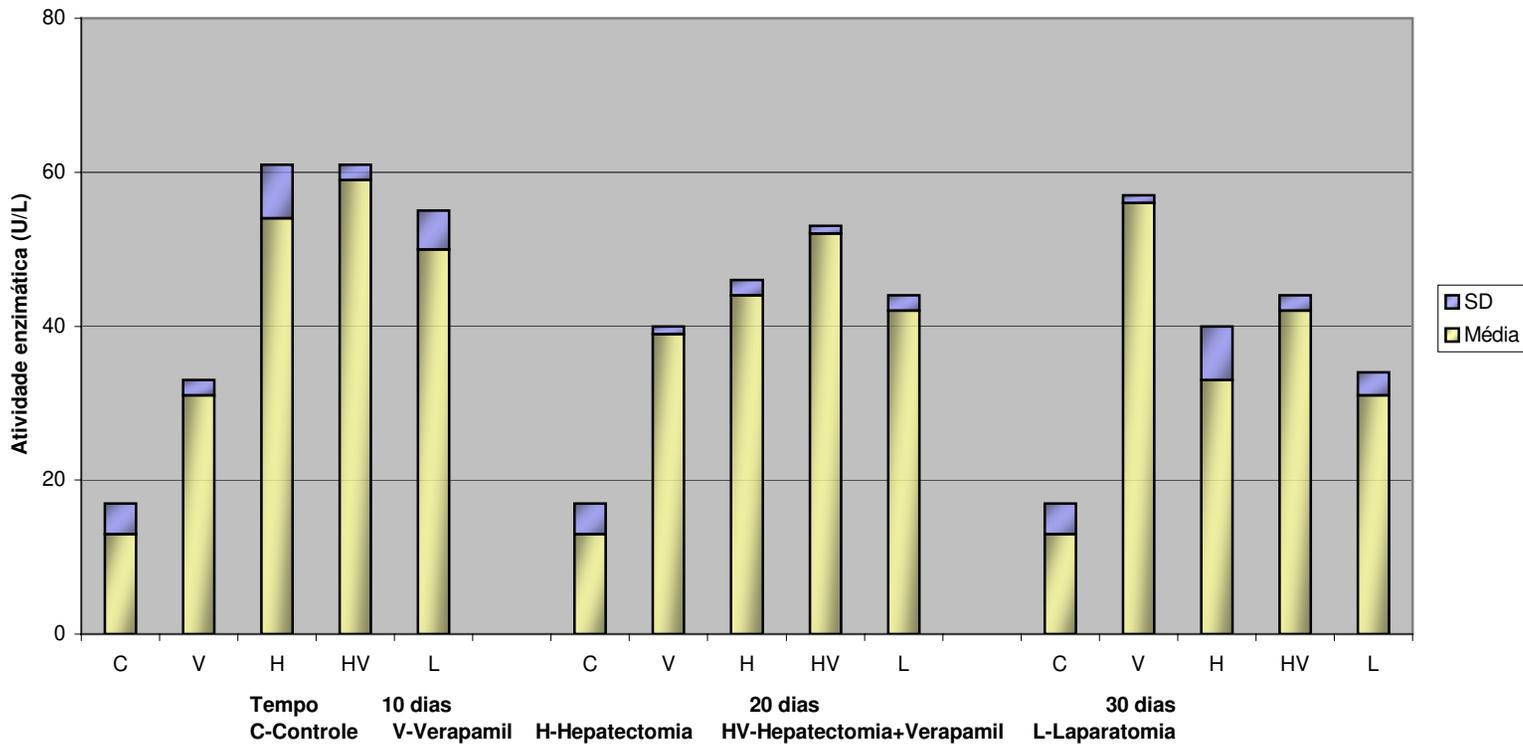
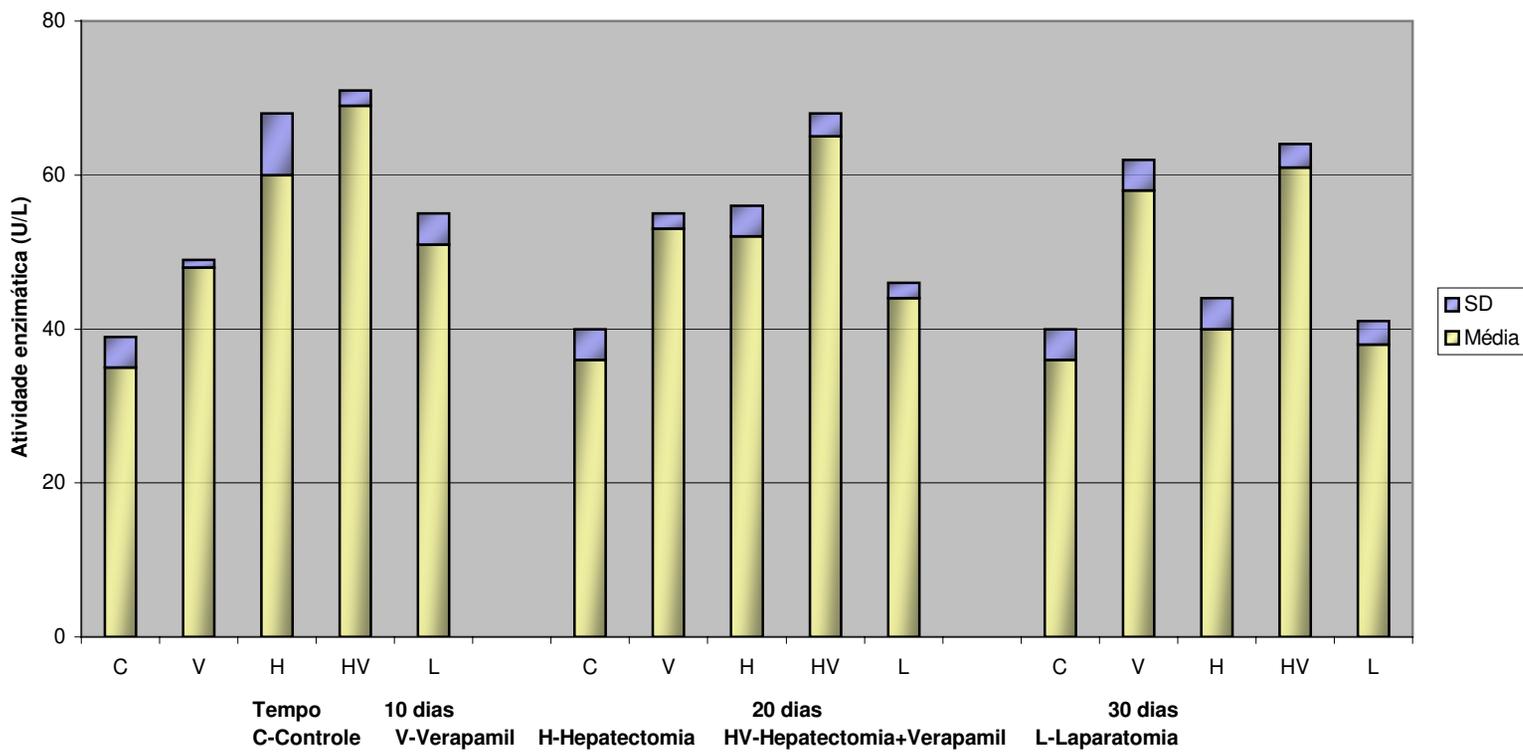


Figura 5B - Atividade enzimática da Fosfatase Alcalina (U/L) em soro de ratos



5-1-6 – Atividade enzimática da Asparatato aminotransferase (U/L) – AST.

Os dados da **Tabela 6** e **Figuras 6 (A e B)**, referem-se a atividade enzimática da AST no fígado e no soro.

5.1.6.1 – Resultados no fígado – **Figura 6 A** .

Analisando a figura 6 A, verifica-se que no tempo 10 dias, a atividade enzimática da AST apresentou aumento estatisticamente significativo somente no grupo HV, em relação ao grupo controle ($p < 0,001$).

Os níveis enzimáticos aumentaram significativamente nos grupos H20, HV20 e L20, em relação aos grupos controle, mostrando valores mais acentuados nos grupos H20 e L20 ($p < 0,001$).

No tempo 30 dias, embora o grupo H30 apresente alterações na atividade enzimática, não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

Os níveis enzimáticos dos grupos V não apresentaram diferença estatística em relação aos seus grupos controle, nos três tempos estudados.

No grupo H, os níveis enzimáticos apresentaram significância estatística ($p < 0,001$) somente no tempo 20 dias, em relação a H10 e H30 mostrando níveis não significantes entre si, nos tempos 10 e 30 dias.

A atividade enzimática da AST no grupo HV aumentou significativamente alcançando pico máximo no tempo 10 ($p < 0,001$), com diminuição significativa e inversamente proporcional aos tempos 20 e 30 dias, quando alcançaram novamente níveis aproximados aqueles do grupo C30 ($p < 0,01$).

Os grupos H e HV, diferiram entre si nos tempos 10 e 20 dias. A atividade enzimática do grupo HV10 aumentou estatisticamente, em relação a H10 ($p < 0,001$), enquanto que no grupo HV20 diminuiu em relação a H20 ($p < 0,001$). Os grupos H30 e HV30, não diferiram entre si.

O grupo L20, mostrou níveis enzimáticos estatisticamente aumentados ($p < 0,001$) em relação a L10 e L30 e estes mostraram semelhanças entre si.

5.1.6.2 – Resultados no soro – **Figura 6 B.**

Analisando a **Figura 6B**, observa-se que a atividade enzimática da AST apresenta diferença estatística entre todos os grupos nos tempos 10 e 20 dias, em relação aos respectivos grupos controle ($p < 0,001$), enquanto que no tempo 30 dias não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Certifica-se que os tempos não influenciaram os resultados dos grupos V10, V20 e V30.

No grupo HV os níveis enzimáticos da AST aumentaram acentuadamente no tempo 10 dias e diminuíram gradualmente nos tempos 20 e 30 dias, sendo essa queda estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Observa-se diminuição significativa da atividade da AST nos grupos H30, HV30 e L30, em relação ao tempo 20 dias.

Os níveis séricos da GGT nos grupos H e HV, diferiram entre si nos tempos 10 e 20 dias. A atividade enzimática do grupo HV10 aumentou estatisticamente, em relação a H10 ($p < 0,001$), enquanto que no grupo HV20 diminuiu em relação a H20 ($p < 0,001$). Os grupos H30 e HV30, não diferiram entre si.

No grupo L20, observa-se aumento significativo na atividade enzimática da AST, em relação aos grupos L10 e L 30.

A atividade enzimática da AST apresenta mais elevada no tecido hepático do que no soro.

Tabela 6. Atividade enzimática da Aspartato Aminotransferase (U/L) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média \pm SD para cada grupo (n=8)

Grupos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
Tempos										
10dias	188 \pm 16	196 \pm 9	239 \pm 26	924 \pm 95	213 \pm 21	48 \pm 6	48 \pm 8	66 \pm 8	91 \pm 8	55 \pm 9
20dias	187 \pm 15	192 \pm 21	987 \pm 78	410 \pm 72	701 \pm 96	47 \pm 6	49 \pm 8	89 \pm 12	74 \pm 8	63 \pm 5
30dias	189 \pm 13	193 \pm 21	284 \pm 35	234 \pm 34	209 \pm 30	48 \pm 6	56 \pm 7	68 \pm 8	61 \pm 8	56 \pm 8

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia

Difere do controle

- * (p< 0,05)
- ** (p<0,01)
- *** (p< 0,001)

Figura 6A - Atividade enzimática da Aspartato Aminotransferase em fígado de ratos

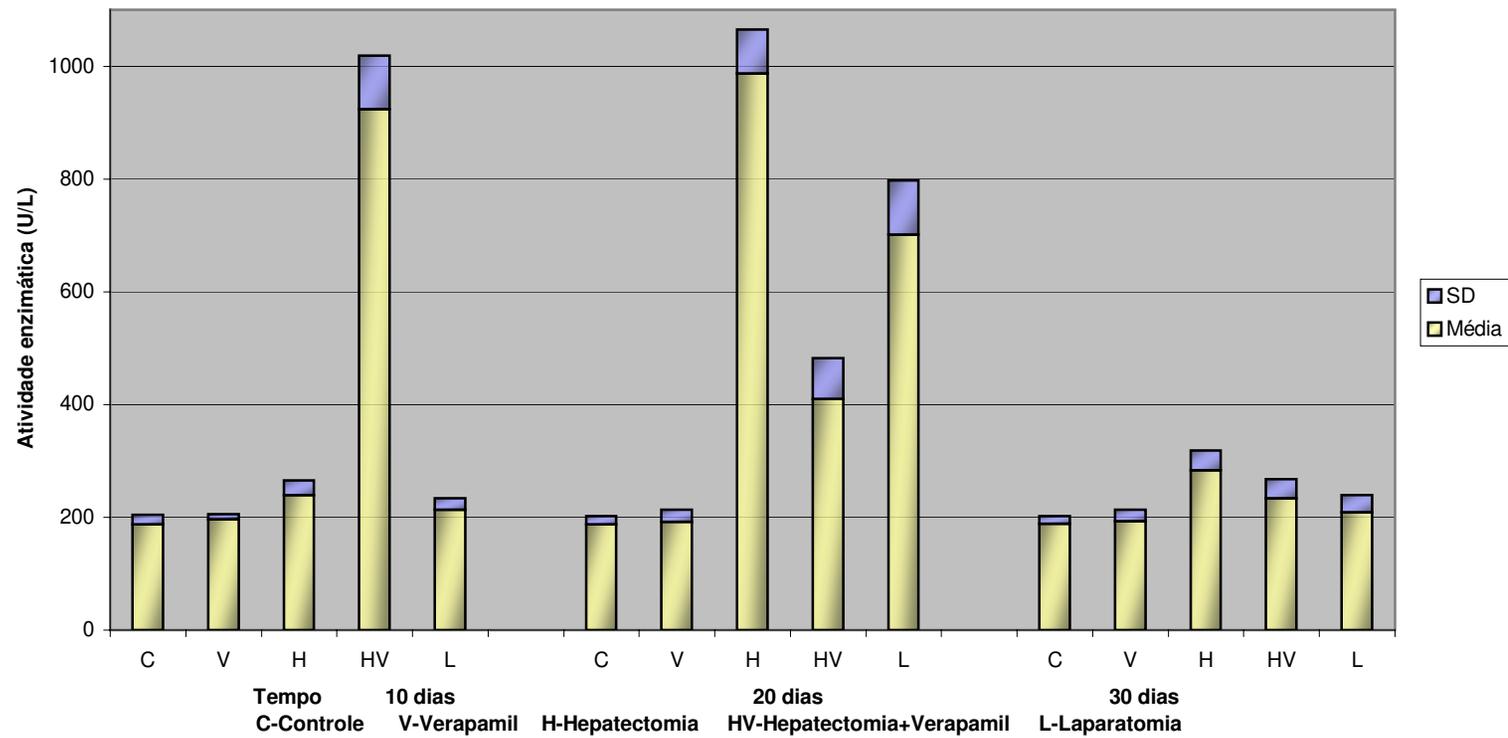
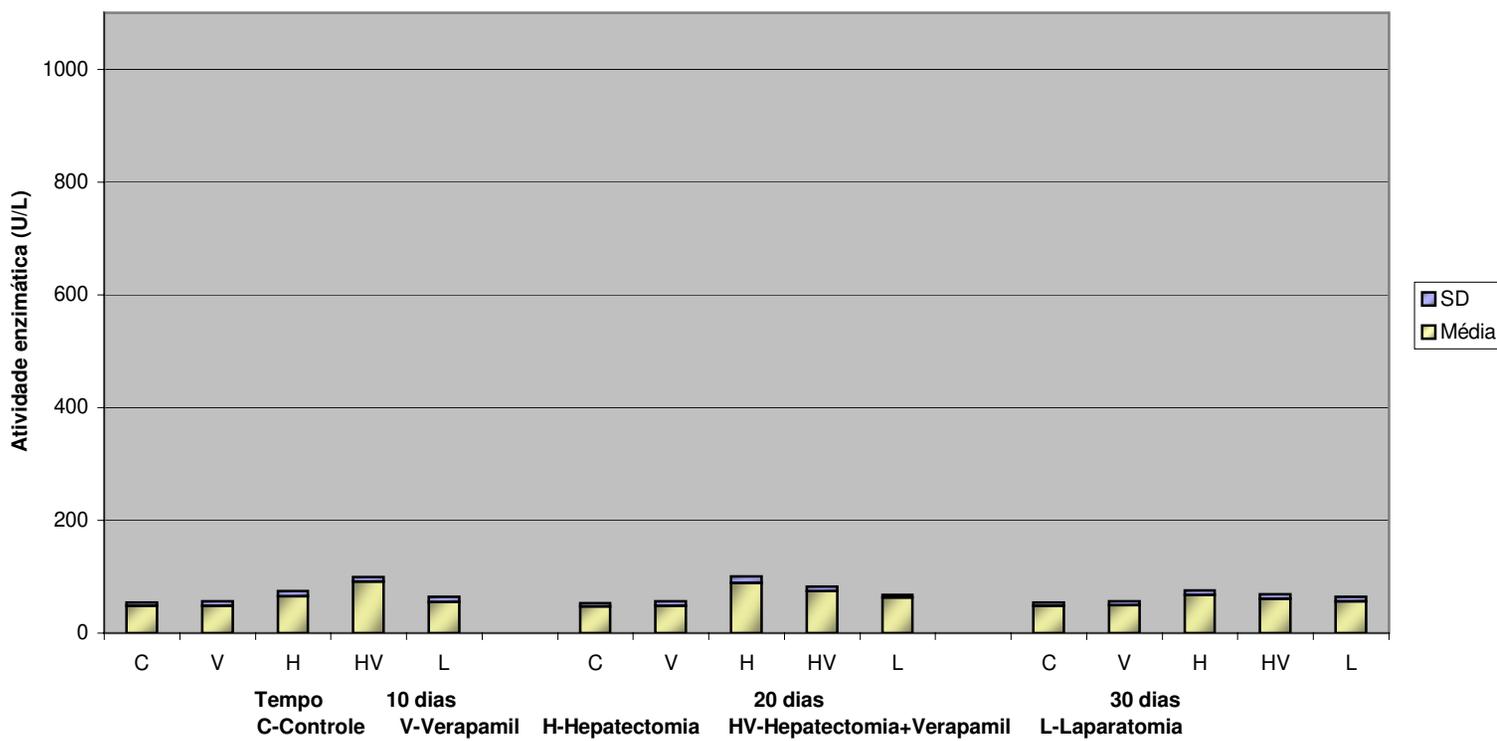


Figura 6B - Atividade enzimática da Aspartato Aminotransferase (U/L) em soro de ratos



5.1.7 – Atividade enzimática da Alanina aminotransferase (U/L) – ALT.

Constam na **Tabela 7**, os resultados bioquímicos referentes à atividade enzimática da ALT em fígado e soro.

5.1.7.1 – Resultados no fígado – **Figura 7 A** .

Os dados da **Figura 7 A** referem-se aos níveis enzimáticos da ALT no tecido hepático.

Os dados mostram que no tempo 10 dias, houve alteração significativa somente no grupo HV, em relação ao grupo controle ($p < 0,001$).

Os grupos H20, HV20 e L20 apresentaram aumento significativo na atividade enzimática da ALT, em relação ao grupo C20 ($p < 0,001$).

No tempo 30 dias observa-se aumento significativo somente no grupo H, em relação ao grupo C30.

A atividade enzimática da ALT no grupo V não mostrou diferença estatística, em relação aos correspondentes grupos controle e os tempos estudados.

A **Figura 7 A** mostra também uma relação inversa entre a atividade enzimática da ALT, no grupo HV e os tempos estudados, alcançando níveis máximos no tempo 10 dias, aproximando dos valores de C no tempo 30 dias.

Os níveis enzimáticos no grupo H20 apresentaram valores significativamente elevados, em relação aos dos grupos H10 e H30. Os valores médios foram : H10 ($121 \text{U/L} \pm 16$), H20 ($731 \text{U/L} \pm 73$), H30 ($187 \text{U/L} \pm 32$).

Os níveis enzimáticos da ALT nos grupos H e HV diferiram entre si nos tempos 10 e 20 dias. A atividade enzimática do grupo HV10 aumentou estatisticamente em relação a H10 ($p < 0,001$), enquanto que no grupo HV20 diminuiu em relação a H20 ($p < 0,001$). Os grupos H30 e HV30 não diferiram entre si.

No grupo L20, a atividade enzimática da ALT aumentou significativamente, em relação a L10 e L30 ($p < 0,001$).

5.1.7.2 – Resultados no soro – **Figura 7 B.**

A **figura 7 B** mostra que a atividade enzimática da ALT, no soro de ratos dos grupos H10, HV10 e L10 e H20, HV20 e L20, difere estatisticamente da atividade enzimática dos grupos C10 e C20, respectivamente ($p < 0,001$), enquanto que os grupos V10 e V20 não houve diferença estatística em relação aos correspondentes grupos controle.

Os grupos H30 e HV30 mostraram níveis enzimáticos significativamente elevados, em relação a C30, contudo os resultados dos grupos V30 e L30 foram semelhantes os do C30 ($p < 0,001$).

Observa-se uma relação inversa entre a atividade enzimática da ALT no grupo HV e os tempos estudados, atingindo níveis significativamente mais elevados no tempo 10 dias.

O grupo HV10 apresentou níveis séricos enzimáticos estatisticamente elevados, em relação a H10 ($p < 0,001$), enquanto que no grupo HV20 esses níveis diminuíram em relação a H20 ($p < 0,01$). Os níveis séricos encontrados nos grupos H30 e HV30, não diferiram entre si.

A atividade enzimática da ALT se encontra significativamente mais elevada no grupo H20 quando comparada aos grupos H10 e H30.

No grupo L20, a atividade enzimática difere estatisticamente da atividade dos grupos L10 e L30 ($p < 0,001$) Os valores enzimáticos da ALT são mais baixos no soro do que no fígado.

Tabela 7. Atividade enzimática da Alanina Aminotransferase (U/L) em fígado e soro de ratos.
Valores expressos por média \pm SD para cada grupo (n=8)

Grupos Tempos	FIGADO					SORO				
	C	V	H	HV	L	C	V	H	HV	L
10dias	87 \pm 7	92 \pm 5	121 \pm 16	748 \pm 89	108 \pm 21	25 \pm 4	28 \pm 5	43 \pm 8	65 \pm 10	35 \pm 7
20dias	89 \pm 6	96 \pm 7	731 \pm 73	270 \pm 36	584 \pm 48	26 \pm 6	30 \pm 5	64 \pm 9	44 \pm 7	51 \pm 7
30dias	88 \pm 9	99 \pm 8	187 \pm 32	131 \pm 42	138 \pm 22	25 \pm 4	31 \pm 4	46 \pm 9	38 \pm 7	35 \pm 7

C = Controle V = Verapamil H = Hepatectomia HV = Hepatectomia + Verapamil L = Laparatomia
Difere do controle

* (p < 0,05)
** (p < 0,01)
*** (p < 0,001)

Figura 7A - Atividade enzimática da Alanina Aminotranferase (u/L) em fígado de ratos

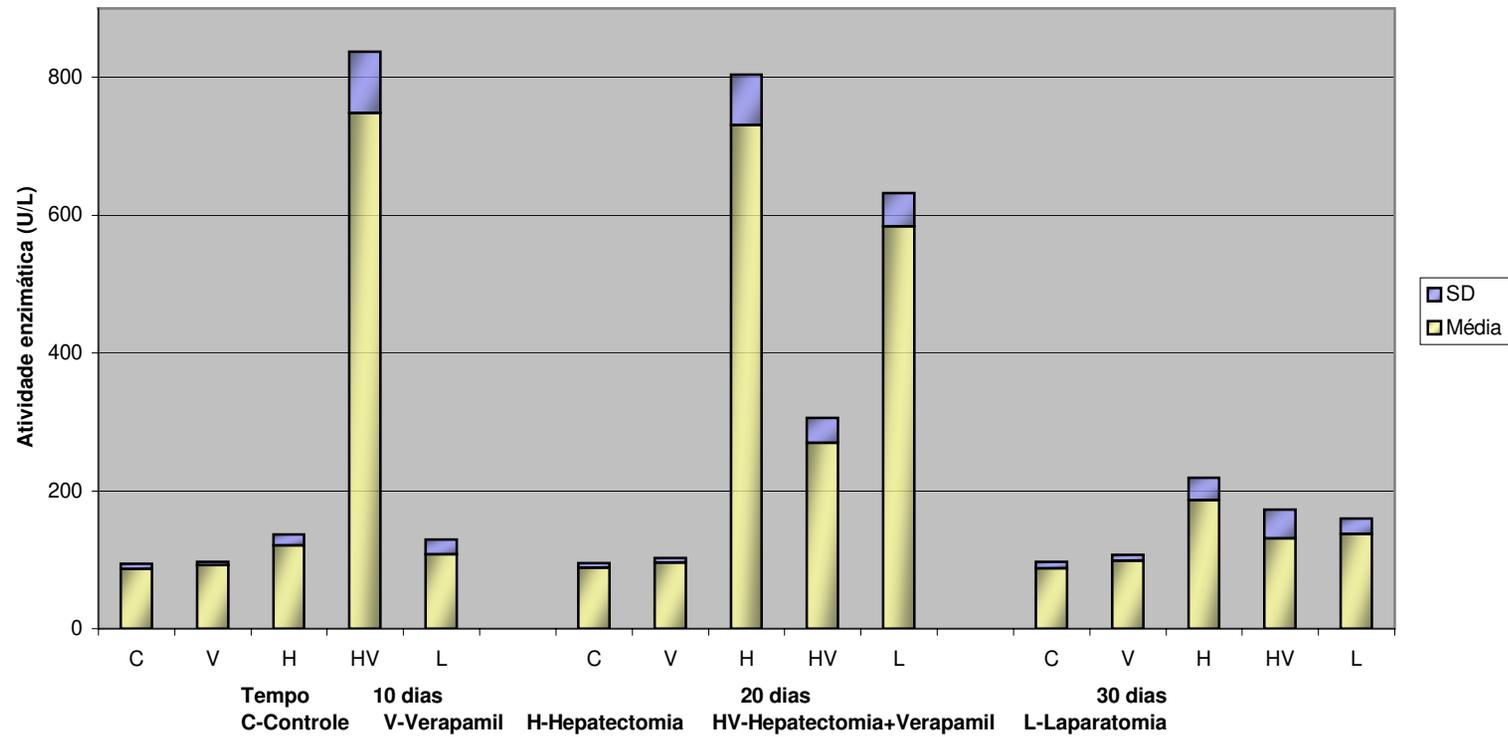
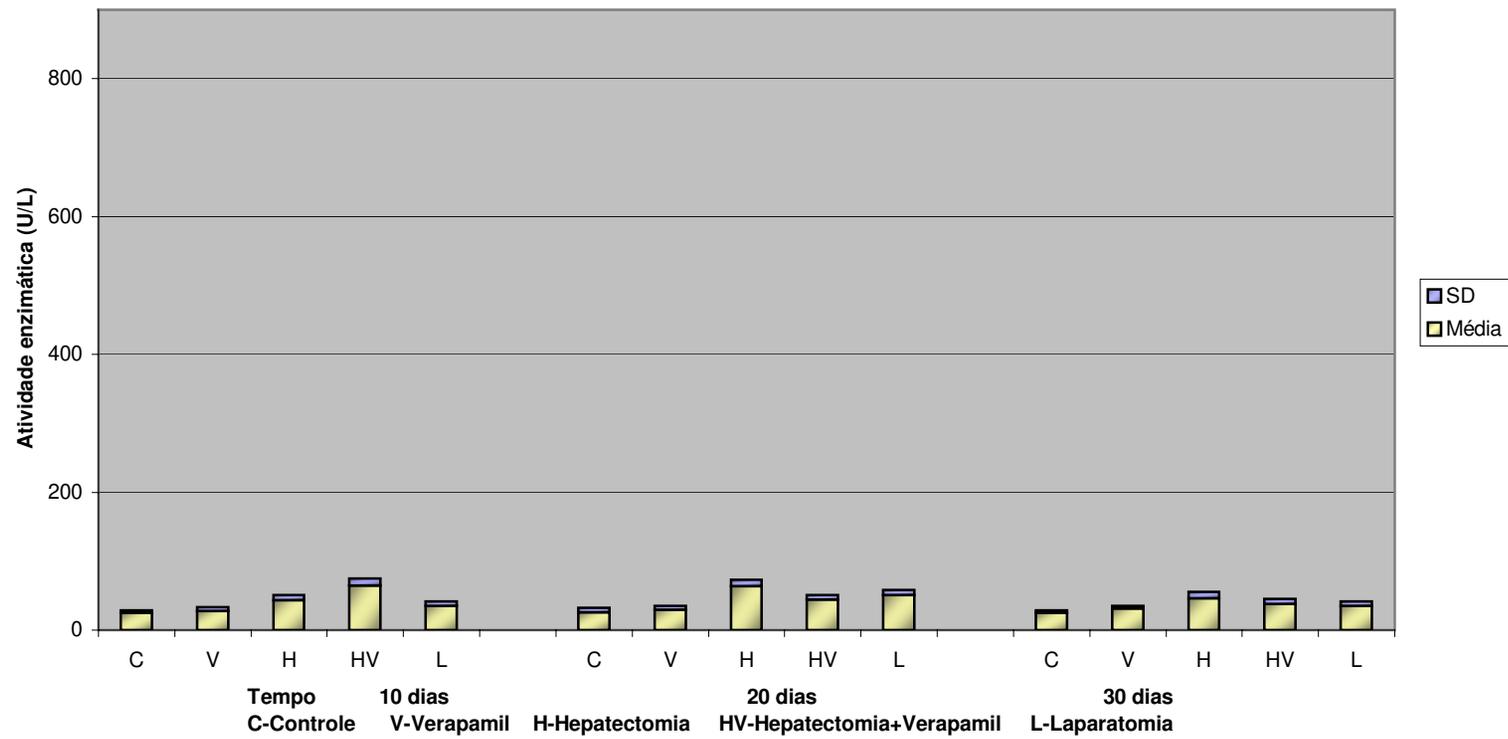


Figura 7B - Atividade enzimática da Alanina Aminotransferase (U/L) em soro de ratos



5.2 – Análise histológica complementar

Os resultados da análise histológica estão apresentados, no quadro abaixo, de acordo com o grau de intensidade do edema intracelular (tumeفاção) caracterizado nos hepatócitos.

Quadro 1 - EDEMA INTRACELULAR (TUMEFACÃO)

<u>TEMPOS</u>	10dias	20dias	30 dias
<u>GRUPOS</u>			
C	N	N	N
L	+	N	N
H	+++	++	+
HV	++	+	+

N = células hepáticas com aspectos normais

+ = alterações celulares leves

++ = alterações celulares moderadas

+++ = alterações celulares severas

Os resultados da observação histológica mostraram grande variabilidade do aspecto morfológico dos elementos teciduais dos fragmentos de fígado analisados.

A observação histológica dos fragmentos de fígado dos ratos do grupo C mostrou que os cordões de células hepáticas e os capilares sinusóides apresentaram aspectos normais em todos os tempos estudados.

O parênquima hepático dos ratos do grupo L, mostrou uma leve tumefação dos hepatócitos aos 10 dias (L10) após a cirurgia, com capilares sinusóides levemente congestos. Aos 20 dias (L20) e aos 30 dias (L30) observou-se que os hepatócitos e os capilares sinusóides apresentaram aspectos normais.

O fígado dos ratos do grupo hepatectomizado (H) mostrou hepatócitos com severa tumefação aos 10 dias (H10), moderada aos 20 dias (H20) e leve aos 30 dias (H30). Os capilares sinusóides hepáticos estavam muito congestos em todos os tempos experimentais.

Os fragmentos de fígado do grupo HV mostraram hepatócitos com tumefação moderada aos 10 dias e aspecto leve aos 20 e 30 dias. Os capilares sinusóides apresentaram-se pouco congestos e alguns com aspectos normais aos 10 dias (HV10). Aos 20 dias (HV20), os vasos maiores mostraram-se congestos e os capilares sinusóides, aspecto normal. Entretanto, aos trinta dias observou-se alguns sinusóides levemente congestos, sendo que a maioria deles apresentaram aspectos normais.

Não foram encontradas células inflamatórias, necrose hepática e/ou outras alterações teciduais em nenhum dos grupos estudados.

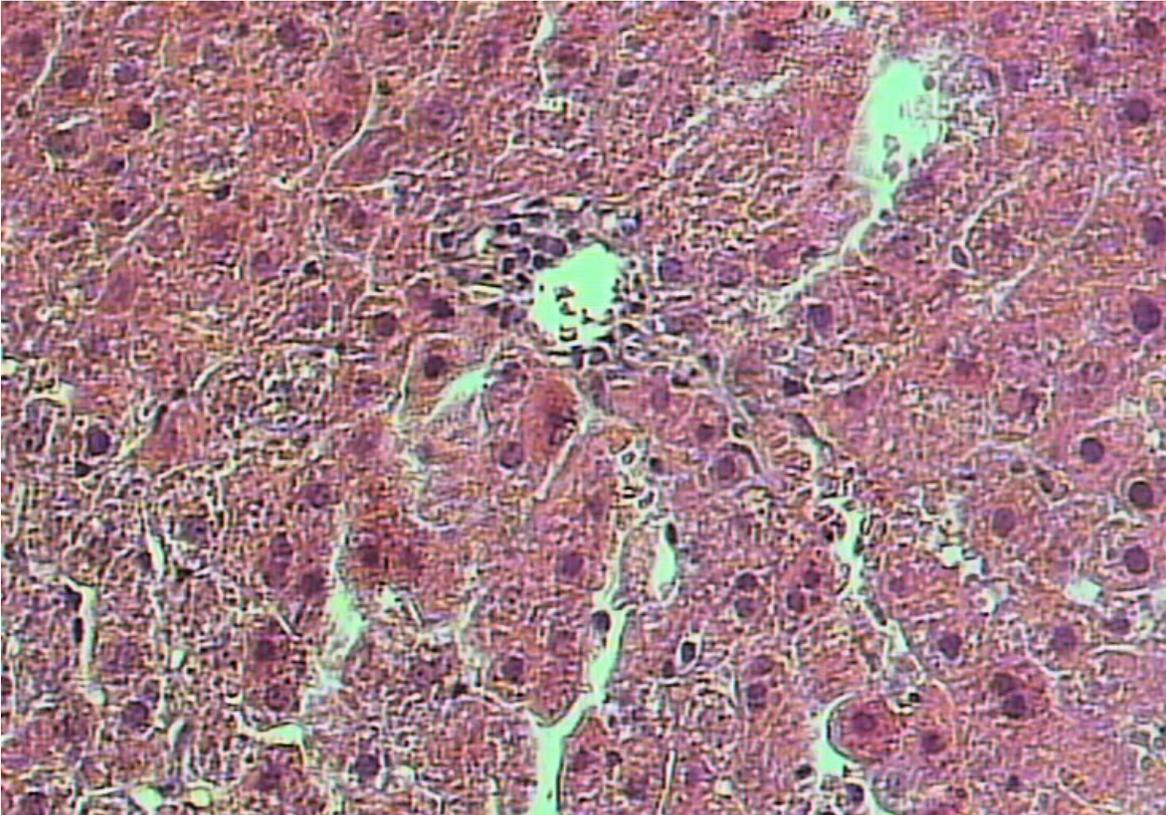


Figura 8. – **Grupo Controle (C20)**. Corte histológico de parênquima hepático de ratos, apresentando cordões de células hepáticas e capilares sinusóides dentro dos parâmetros de normalidade. HE.40X

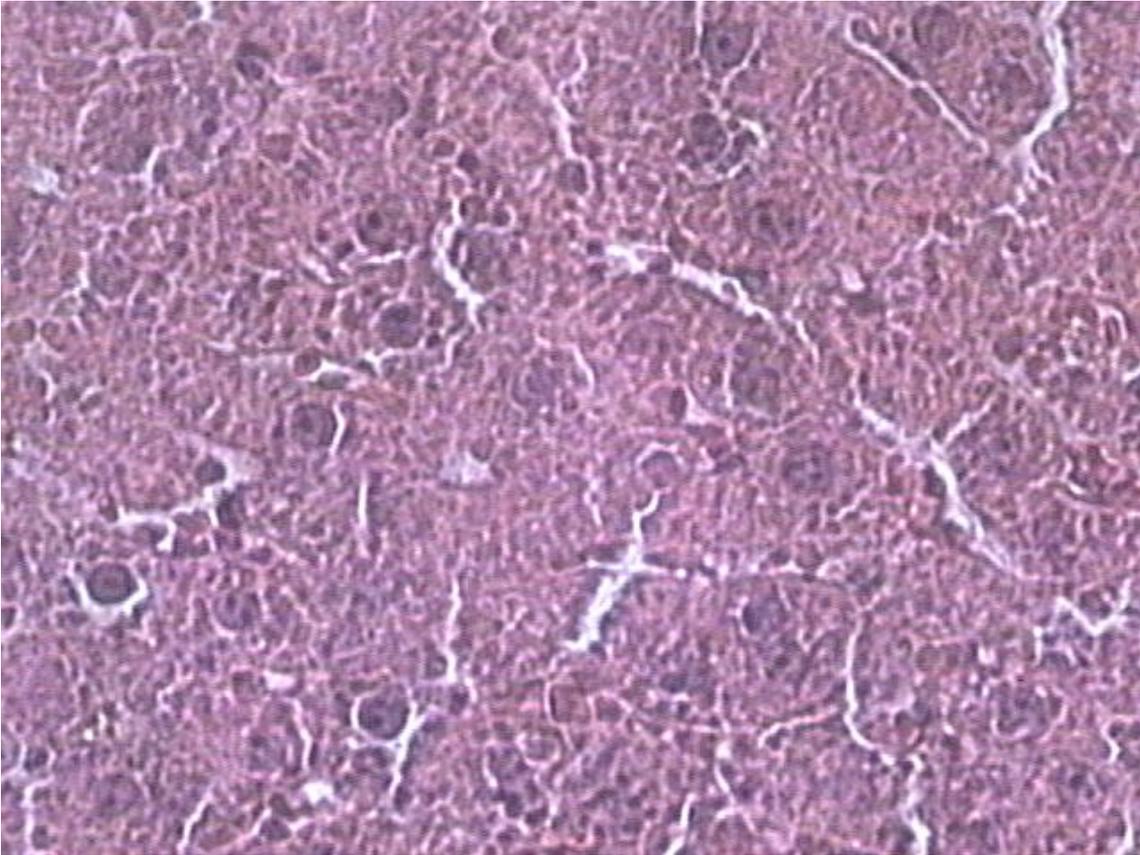


Figura 9. - **Grupo Laparatomia (L20)**. Corte histológico de parênquima hepático de rato, apresentando capilares sinusóides e cordões de células hepáticas dentro dos parâmetros de normalidade. HE 40X.

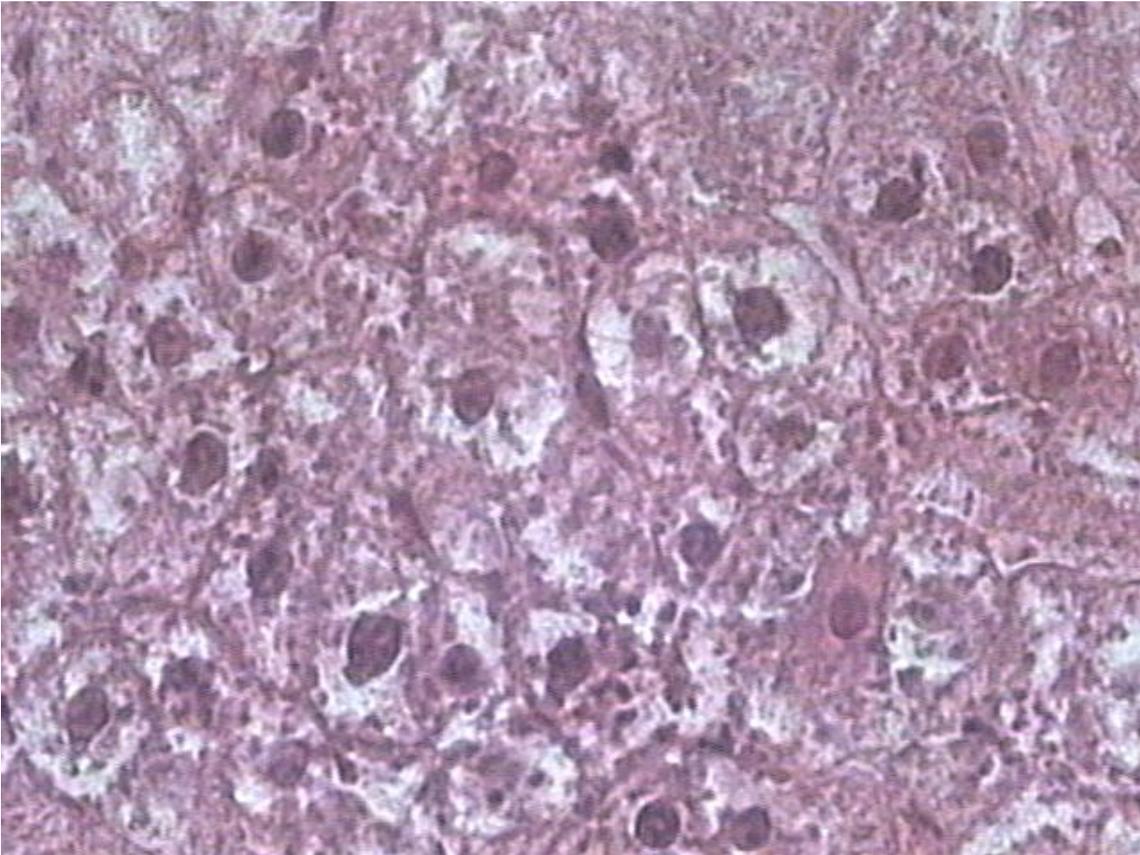


Figura 10. – **Grupo Hepatectomia (H20)**. Corte histológico de parênquima hepático de rato, apresentando moderada tumefação dos hepatócitos e capilares sinusóides congestos. HE 40X.

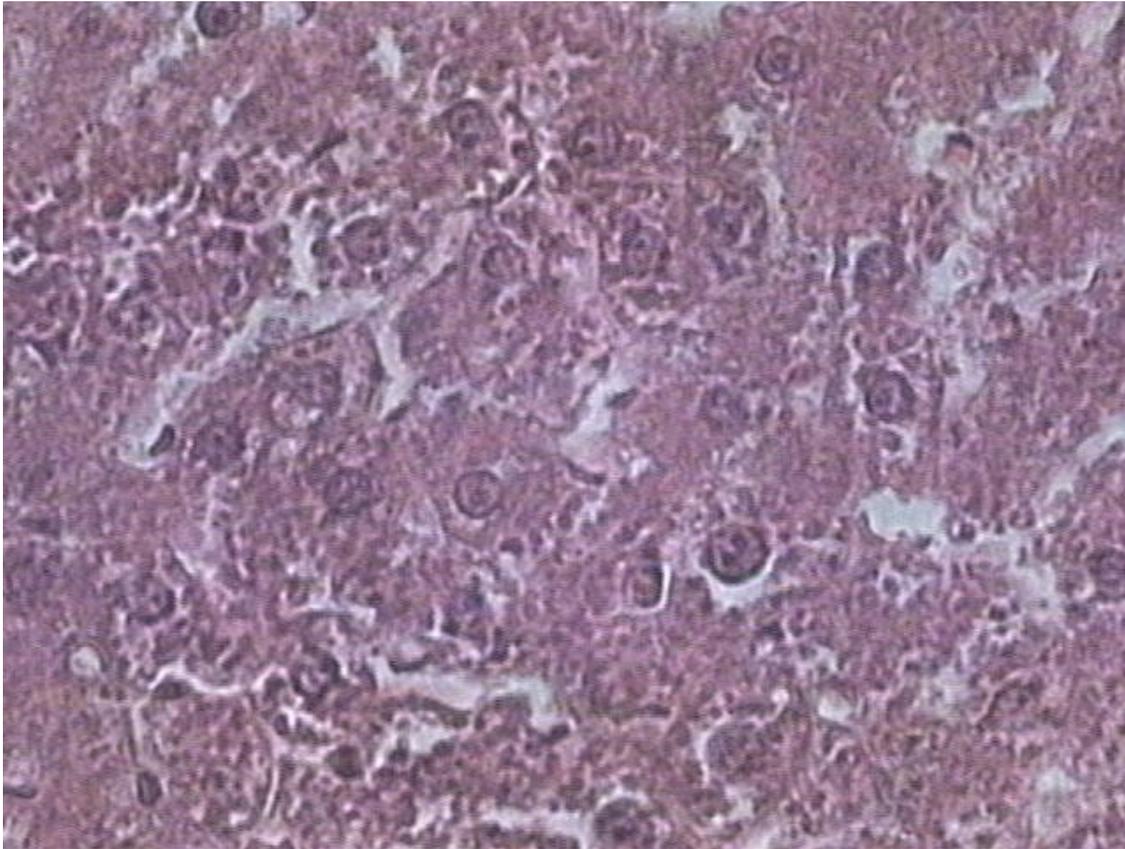


Figura 11. – **Grupo Hepatectomia + Verapamil (HV20)**. Corte histológico de parênquima hepático de rato, apresentando leve tumefação dos hepatócitos e capilares sinusóides com aspecto normal. HE 40X.

6 – DISCUSSÃO

Sabe-se que os íons cálcio participam de maneira importante de funções celulares e extracelulares precisamente reguladas, interligadas e essenciais para manter o equilíbrio do meio interno, o que o torna indispensável à vida das células.

A regulação do cálcio intracelular representa função central no sistema de sinalização celular no controle e modulação da proliferação e diferenciação das células (HUGHES *et al*, 1986; ROSE *et al*, 1996; KEDDERIS, 1996), o que caracteriza a importância de se estudar os efeitos do verapamil, droga antiarritmica de uso prolongado com propriedades bloqueadoras dos canais de cálcio, nos tecidos em desenvolvimento.

Os processos envolvidos na homeostase do cálcio são rigorosamente controlados por mecanismos de retroalimentação que envolvem múltiplas glândulas, tecidos e órgãos, dentre eles o fígado (SCHANNE *et al*, 1979; CASINI & FARBER, 1981; CAROFOLI, 1987; DAWSON, 1990; DEAKIN *et al*, 1990; GAFFIN, 1999). Assim, o cálcio está constantemente presente na membrana celular dos hepatócitos, onde tem função chave no metabolismo respiratório das células hepáticas, sendo essencial para manter a homeostasia iônica dessas células. Quaisquer alterações mais pronunciadas dos níveis de cálcio biologicamente ativo na membrana dos hepatócitos, podem afetar diretamente a integridade da membrana citoplasmática ou provocar desordens nos processos bioquímicos e fisiológicos, causando efeitos deletérios às células hepáticas, ameaçando a vida humana. O aumento das concentrações intracelulares de cálcio conduz a um progressivo dano hepatocelular (DELEVE & KAPLOWITZ, 1975; SCHANNE *et al*, 1979; CASINI & FARBER, 1981; BOWERS *et al*, 1987; RECHNAGEL *et al*, 1989; DEAKIN *et al*, 1991; NISHIAW *et al*, 1994; KURITA *et al*, 1993; KEDDERIS, 1996).

A multiplicidade da ação do cálcio envolvida nas bases bioquímicas que regem os princípios básicos da função hepática, assim como a presença de canais de cálcio nos hepatócitos despertou interesse, ao longo dos anos, no estudo da função dos íons cálcio nos processos desencadeantes da morte celular nas células hepáticas, visto que essas células são

muito sensíveis aos efeitos deletérios resultantes do aumento da concentração de cálcio intracelular.

Observações bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histoquímica têm demonstrado que o distúrbio da homeostase do cálcio resultante da agressão às células hepáticas por lesão tecidual, como na hepatectomia parcial, ou por drogas hepatotóxicas, vírus, radiações, isquemia entre outras, dispara uma cascata de eventos que envolvem a formação de radicais livres que, covalentemente, ligam-se em pontos críticos da membrana celular dos hepatócitos, promovendo alteração da permeabilidade da membrana, peroxidação lipídica, desintegração do citoesqueleto, alterações da morfofuncionalidade mitocondrial, assim como alterações nos canais de cálcio com ativação de enzimas catabólicas cálcio e calmodulina-dependentes. Obviamente provoca grandes conseqüências toxicológicas para as células hepáticas. Dentre as enzimas catabólicas estão as proteases, endonucleases que degradam DNA, fosfolipases estimuladoras do metabolismo do ácido araquidônico e do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (SCHANNE *et al*, 1979; CASINI & FARBER, 1981; TAYLOR *et al*, 1984; KURITA *et al*, 1993).

Todos os eventos bioquímicos envolvidos nas alterações da homeostase do cálcio podem ser atenuados ou bloqueados pelo verapamil. A habilidade dos BCC, especialmente do verapamil, em inibir preferencialmente a entrada de cálcio na mitocôndria, levou vários pesquisadores a estudarem seus efeitos nas células hepáticas injuriadas. Vários trabalhos têm demonstrado a ação do verapamil e de outros BCC em lesões hepáticas induzidas por drogas hepatotóxicas (ERWIN *et al*, 1986; DEAKIN *et al*, 1991; SIPPEL *et al*, 1993; SCHMITZ *et al*, 1994; DIMOVA *et al*, 1995; ELLOUK-ARCHARD *et al*, 1995), injúria hepática induzida por isquemia/reperfusão (NAUTA *et al*, 1991; STEIN *et al*, 1993; CHAVEZ-CARTAYA, 1994; KURITA *et al*, 1994), injúria pelo calor (BOWERS *et al*, 1998; FARGHALI *et al*, 2000), injúria induzida pela inibição do metabolismo de drogas microssomais hepáticas (MURRAY & BUTLER, 1996; DROBITH, 1997; JONES *et al*, 1999, ZANGAR, 1999), relatando efeitos hepatoprotetores em algumas condições. Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos desses fármacos no fígado em regeneração, nos aspectos funcionais e histomorfológicos.

O uso clínico do verapamil no tratamento de arritmias cardíacas e hipertensão arterial é feito por tempo prolongado e muitas vezes durante toda a vida. Sendo uma droga metabolizada pelo fígado com efeito cumulativo, tem despertado preocupação em relação ao seu uso terapêutico por portadores de disfunção hepática, o que o torna de grande interesse no campo da pesquisa. O perfil farmacocinético, bem definido, assim como seu mecanismo de ação nos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L – identificados também nos hepatócitos - bloqueando a entrada ou acelerando a saída de cálcio das células, nos levou a supor possíveis efeitos na regeneração do tecido hepático após HP, já que o cálcio interfere com processos bioquímicos responsáveis pelo controle e modulação da proliferação e diferenciação das células no tecido biológico intacto. Por outro lado sabe-se que lesões hepáticas induzidas por drogas ou por agressão física, como é o caso da hepatectomia parcial, podem provocar ruptura da homeostase do cálcio, levando ao acúmulo de cálcio intracelular o que o torna patogênico para os hepatócitos, desencadeando necrose tecidual e, conseqüentemente, morte celular.

Medidas dos níveis séricos de enzimas tornaram-se poderosas ferramentas auxiliares no estudo de hepatotoxicidade. Como marcadores bioquímicos sensíveis de lesão hepática utiliza-se de testes enzimáticos como o doseamento de AST, ALT, ALP, GGT, lactato desidrogenase (LDH), sorbitol desidrogenase (SDH), ornitina carbamil transferase (OCT), glutatión redutase hepático, concentrações séricas de bilirrubina, glicogênio, fosfolipídeos, colesterol, ácidos graxos, ácidos biliares, proteínas totais, albumina, entre outras. Como ferramenta importante pode-se destacar também a histologia do tecido hepático.

No presente estudo optamos por estudar os efeitos do verapamil, bloqueador dos canais de cálcio, em lesões hepáticas induzidas por hepatectomia parcial de 2/3 do tecido hepático, através do estudo bioquímico e histomorfológico da evolução estrutural e funcional do fígado de ratos. Paralelamente ao estudo histológico do tecido hepático avaliamos as concentrações de proteínas totais e albumina e a atividade enzimática no fígado e no soro da AST, ALT, ALP, GGT, colinesterase, apoiados em evidências de serem enzimas encontradas em vários tecidos, porém com concentrações relativamente elevadas

no fígado. Conseqüentemente, comportam-se como sensíveis indicadores de lesões patológicas no órgão.

Não podemos deixar de enfatizar que lesões hepáticas no homem tornam-se cada vez mais freqüentes, obviamente devido ao elevado aparecimento de novas e potentes drogas liberadas para uso terapêutico, com grande potencial para alterar morfológica e funcionalmente a atividade hepática, paralelamente à automedicação.

O fígado, classicamente conhecido como “zelador do meio interno” exerce papel central em muitos processos fisiológicos responsáveis pelo controle das funções endócrinas e defesa bioquímica do organismo, contra drogas e agentes químicos. É o principal local onde se processa a síntese de lipídeos e proteínas plasmáticas, metabolismo e degradação de muitas enzimas responsáveis pela capacidade metabólica do fígado, dentre elas a AST, ALT, ALP, GGT e a colinesterase. Vulnerável a uma variedade de agressões metabólicas, circulatórias, tóxicas microbianas e neoplásicas é um dos órgãos mais freqüentemente lesados. Tais funções biológicas permitem avaliar mecanismos de ação e efeitos de drogas sobre os tecidos hepáticos intacto ou lesado, assim como sobre a capacidade regenerativa desses tecidos nos aspectos funcionais, estruturais e morfológicos, oriundos da interação droga/fígado, durante processo regenerativo”.

A clássica técnica de hepatectomia parcial, concretizada por HIGGINS & ANDERSON (1931) ainda é o modelo experimental mais empregado em animais. Segundo HIGGINS & ANDERSON (1931), GRISHAM (1962), em ratos, quando cerca de 70% do fígado é removido cirurgicamente, porção residual cresce e rapidamente, com restauração de todas as estruturas: lóbulos, vasos, ductos biliares.

STEER, (1995) relata que o conceito de regeneração hepática traduz-se pela capacidade do órgão repor a massa de tecido após remoção parcial ou injúria. O hepatócito adulto é, normalmente, uma célula quiescente, altamente diferenciada, com atividade replicativa mínima; mas em resposta a um dano celular por injúria física, infecção ou injúria tóxica, quase imediatamente, ele pode iniciar o processo de replicação celular. A regeneração hepática em ratos é remarcadamente rápida e os eventos envolvidos nas respostas regenerativas são precisos, cuidadosamente orquestrados, e, altamente regulados.

Os hepatócitos passam de seu estado quiescente para aquiescente e já nas primeiras horas após cirurgia ocorre síntese protéica (SCHULTZE & OEHLERT 1961), atividades mitótica e enzimática (BREBNOR & BALINSKI, 1983). A primeira resposta regenerativa, isto é, a transição das células remanescentes das fases G0 para G1, ocorre dentro da primeira meia hora após a operação. A síntese de DNA começa após cerca de 18 horas (TSUKAMOTO *et al* 1993) . Os lóbulos residuais crescem alcançando o tamanho e volume do fígado original, em seguida param completa e abruptamente, sem promover nenhum crescimento. Essa habilidade de regeneração do fígado é governada pelo complexo de sinalização e transdução de sinais. Eventos que dependem da atividade metabólica do fígado, interação entre células parenquimais e não parenquimais, componentes da matriz extracelular, processos endócrinos, autócrinos e parácrinos, e circuitos neuronais regulatórios. A sobrecarga metabólica e /ou de nutrientes são importantes fatores na iniciação da resposta ao crescimento celular dos hepatócitos. . Morfológica e funcionalmente, os hepatócitos remanescentes não se diferenciam , mas preferivelmente mantém ativos, ciclo da uréia, síntese de albumina, metabolismo de drogas; assim como exibe normal polaridade de domínio de membrana (STEER, 1995).

A regeneração ocorre mesmo após cirurgias sucessivas (BELIAEVA, 1977) . Vários tipos de fatores de crescimento e inibidores hepáticos têm sido descritos (RICHMEN *et al.*, 1976; NAKAMURA *et al.*, 1988 – 1989; MIYAZAWA *et al.*, 1989, ZARNEGAR e MICHELOPOULOUS,1990., ZANEGAR *et al.*,1991), destacando grande importância no crescimento e regeneração do tecido. O processo de regeneração, em ratos, se inicia imediatamente após a cirurgia, com significativo aumento de peso do órgão após 48 horas. Estudo relativo á recuperação funcional do fígado em regeneração, traduzido pela capacidade de metabolizar o metohexital foi realizado por MATTOS FILHO e BASTOS-RAMOS (1977) e MATTOS FILHO, 1984.

Em relação às proteínas, sabe-se que têm fundamental importância na estrutura dos seres vivos. Fazem parte da arquitetura das células, dão consistência ao conteúdo celular e formam as fibras dos tecidos de sustentação. Em experiências feitas em ratos, YAMAZAKI & LaRUSSO (1989) mostraram que o fígado é a principal fonte de proteínas,

sendo que 99% dessas se concentram nos hepatócitos. A diminuição da proteólise é considerada de melhor significância clínica do que o aumento da síntese de proteínas como causa de regeneração hepática após hepatectomia parcial. TSUKAMOTO *et al.* (1993), mostraram que a restauração relativa do rendimento de proteínas e peso do fígado em ratos idosos em 96 horas após hepatectomia parcial, foi respectivamente, 63% e 87%, sugerindo capacidade de regeneração preservada em ratos com sessenta meses. YAKIMOFF *et al.* (2003), pesquisando os efeitos da radiação laser de baixa potência na regeneração do fígado de ratos parcialmente hepatectomizados e tratados com verapamil verificaram que, o verapamil administrado na água de beber na dose de 24mg/rato/dia, promove efeitos hepatoprotetores pela redução da atividade enzimática de AST, ALT e GGT, aos 14 dias após HP e pelo aumento da capacidade do fígado em sintetizar proteínas.

Os dados do presente trabalho, mostram que a concentração de proteínas totais nos ratos dos grupos submetidos a HP e/ou cirurgia simulada (H, HV e L), aumenta gradativamente em relação direta aos tempos estudados. Na medida em que o fígado recupera sua massa hepática, a demanda da síntese de proteínas aumenta progressivamente, mostrando recuperação da capacidade metabólica. O que pode ser explicado pelo fato de que o fígado remanescente mantém parênquima hepático funcional e que os hepatócitos têm mecanismos compensatórios eficientemente rápidos para tamponar e seqüestrar cálcio, e bem como transportar proteínas ativadas no tecido injuriado. Considerando que o fenômeno de lesão hepática é cálcio dependente.

Embora 99% das proteínas celulares residam nos hepatócitos, a concentração de proteínas no soro apresenta-se mais elevada em todos os grupos e tempos estudados, traduzidas pela capacidade do fígado em transportar proteínas frente a uma agressão tecidual, por mecanismos compensatórios.

A albumina (ALB) é sintetizada exclusivamente no fígado a uma velocidade de 100 a 200mg/Kg de peso corpóreo ao dia, no homem. Sendo que a concentração de ALB que reflete o equilíbrio entre a velocidade de síntese e a degradação ou perda, pode ser influenciada por vários fatores como doença sistêmica ou hepática, hormônio tireoidiano, por glicorticoides, estado nutricional, pressão osmótica do sangue e por substância

hepatotóxica como o álcool etílico e tetracloreto de carbono. A velocidade de síntese se encontra aumentada em certas patologias como a dermatite esfoliativa, queimaduras graves, síndrome nefrótica e enteropatia perdedora de proteínas. A concentração sérica de ALB pode ser indicador útil de alteração de função hepática, visto que a hipoalbuminemia reflete uma síntese diminuída em pacientes portadores de danos hepáticos. Não se conhecem os mecanismos de degradação da ALB em condições fisiológicas.

Pudemos observar, em nosso experimento as concentrações de albumina significativamente alteradas nos grupos de ratos submetidas a hepatectomia parcial e/ou laparotomia em todos os tempos estudados, mostrando resultados mais elevados 30 dias após as cirurgias. Tal fato pode significar que o fígado remanescente continua funcionando, com grande capacidade em sintetizar proteínas, já que a ALB é a principal proteína do fígado.

Levando em consideração que a própria reserva funcional do parênquima hepático remanescente aumenta a capacidade do órgão em repor a massa do tecido hepático e células, após a remoção parcial de tecido ou injúria, obviamente para compensar o metabolismo, pudemos observar que o verapamil aumentou a síntese de ALB, tanto no fígado normal como no lesado. Foi observado aumento significativo na concentração de ALB tanto no grupo de ratos tratados apenas com verapamil (V) como no grupo hepatectomizado e tratado com verapamil (HV), sendo esse aumento mais elevado do que no grupo de ratos apenas hepatectomizados (H), em 10 dias após as cirurgias.

Os níveis séricos de ALB mostraram-se mais elevados do que os níveis hepáticos, o que pode ser justificado pela rápida velocidade de síntese de ALB no fígado, associada aos mecanismos especiais de transporte de proteínas ativadas quando o tecido hepático é lesado.

Observa-se que existe uma coerência entre os resultados do nosso trabalho e aqueles encontrados por KANASHIMA *et al.* (1983) e YAKIMOFF *et al.* (2003), quando demonstraram que após HP, a atividade enzimática da AST e ALT e as concentrações de ALB aumentam significativamente, 14 dias após HP. Sugerindo que a hipoalbuminemia

pode refletir a proliferação dos hepatócitos e que o fígado em regeneração tem grande capacidade para sintetizar proteínas.

De acordo com GARY (1971) e DIETZ (1973), do grupo das colinesterases, a enzima de maior importância é a acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela inativação da acetilcolina - neurotransmissor responsável pelo movimento das vísceras e órgãos internos. A acetilcolinesterase sérica é sintetizada no fígado. Pelo fato de encontrarse diminuída em todas as afecções hepáticas parenquimatosas difusas, tais como: hepatite viral, cirrose hepática, neoplasma maligno metastático, necrose amebiana do fígado, tornou-se grande indicador de injúria hepatocelular como complemento dos testes de AST, ALT, ALP e GGT.

Observando-se a tabela 3 e as figuras 3 (A e B), verifica-se uma diminuição da atividade enzimática da colinesterase no tecido hepático e no soro dos ratos dos grupos que sofreram hepatectomia parcial e/ou cirurgia simulada (H, HV e L), nos três tempos estudados, em relação aos respectivos grupos controle (C10, C20 e C30). Embora a cinética da atividade da colinesterase no soro acompanhe os mesmos parâmetros do fígado, os níveis séricos mostram valores mais baixos, o que pode ser explicado pelo processo de síntese da enzima acontecer no fígado.

No grupo V10 - ratos tratados com verapamil que não sofreram nenhum tipo de cirurgia - os valores encontrados mostram-se semelhantes aos obtidos no grupo controle (C10), enquanto que nos grupos V20 e V30 estes valores aumentaram significativamente, em relação aos respectivos grupos controle (C20 e C30). Podemos inferir que o verapamil aumenta a atividade da colinesterase em relação direta aos tempos estudados, quando o fígado se apresenta intacto. Por outro lado, a diminuição da atividade da colinesterase nos grupos de ratos que sofreram hepatectomia parcial e/ou laparotomia, veio nos confirmar a existência de injúria celular, já que esta enzima encontra-se diminuída nessas condições.

Quando se compara o grupo hepatectomizado tratado com verapamil (HV) ao grupo apenas hepatectomizado (H), observa-se que a atividade enzimática aumenta significativamente nos ratos do grupo HV em 10 dias após HP, atinge valores máximos em 20 dias após HP e diminui em 30 dias após HP, alcançando valores semelhantes àqueles

encontrados em 10 dias após HP. Embora, nesta situação, os níveis enzimáticos ainda se encontrem mais baixos que os valores encontrados nos ratos do grupo controle, os resultados mostram-se favoráveis à recuperação funcional do fígado, pois os mesmos apresentam-se mais elevados que nos grupos H e L, sugerindo efeitos benéficos do verapamil. Isto nos leva a supor que o verapamil contribuiu para manutenção dos níveis enzimáticos no tecido agredido, cirurgicamente, próximos aos níveis encontrados nos ratos controle, ou seja, com fígado intacto, melhorando assim a função hepática.

Outra enzima útil no estudo de regeneração hepática é a γ -Glutamil transferase, conhecida genericamente como Gama GT (GGT). É encontrada em concentrações relativamente altas nos rins, pâncreas, próstata e fígado. Segundo JUNGERMAN & KATZ, a GGT localiza-se na membrana plasmática dos hepatócitos, sendo que na zona periportal predomina sua significância funcional. Encontra-se aumentada no soro em doenças obstrutivas hepatobiliares e em outras condições, tais como: infarto do miocárdio, doenças neuromusculares, uso de álcool etílico e outras drogas indutoras de enzimas microsossomais hepáticas. É considerada um rastreador sensível de doença hepatobiliar e pode ser usada para identificação da fonte de elevação concomitante de ALP (WESTERGARD, 1981).

No presente trabalho, analisando a figura 4 A, podemos observar que a atividade enzimática da GGT aparece aumentada nos ratos dos grupos que sofreram HP e/ou laparotomia, alcançando níveis mais elevados 20 dias após as cirurgias, quando os valores se tornam semelhantes aos grupos H10 e L10, comprovando assim, lesão da membrana plasmática dos hepatócitos e da zona periportal, onde a GGT apresenta maior significância funcional. Através dessas informações podemos inferir que o estress cirúrgico resultante da HP e da cirurgia simulada pode ativar o sistema enzimático aumentando significativamente a atividade da GGT no tecido hepático, apresentando efeitos marcantes 20 dias após as cirurgias.

Paralelamente, constatamos que os ratos do grupo hepatectomizado e tratado com verapamil apresentam aumento significativo na atividade da GGT aos 10 dias após HP, diminui bruscamente aos 20 dias após HP, diminui e mantém níveis semelhantes ao grupo H30. Isso pode ser explicado pelo fato de que quando o parênquima hepático é removido

cirurgicamente, as funções do fígado tornam-se debilitadas ou insuficientes para metabolizarem o verapamil, aumentando seus efeitos tóxicos, visto que os ratos do grupo tratado com verapamil (V) sem passar pelo estress cirúrgico, apresentam níveis enzimáticos semelhantes aos do grupo controle, durante todo o experimento. O tempo de tratamento com verapamil pode ser fator determinante na recuperação funcional do fígado, quando essa aparentemente se completa aos 30 dias após HP, momento em que a atividade da GGT alcança níveis semelhantes aos do grupo controle.

Os resultados do nosso trabalho mostram semelhança àqueles encontrados por YAKIMOFF *et al.* (2003), quando usando o mesmo esquema experimental, mostraram aumento significativo da atividade enzimática da GGT aos 14 dias após HP, no fígado de ratos tratados com verapamil.

A alteração do metabolismo do verapamil resultante da agressão pela remoção do tecido hepático, pode ser nitidamente comprovada 10 dias após HP, quando analisamos a figura 4 B. Nessa situação os ratos do grupo hepatectomizado e tratado com verapamil, apresentam níveis enzimáticos séricos bem mais baixos do que aqueles encontrados no fígado. Possivelmente pela diminuição da circulação sanguínea local o verapamil demoraria a chegar à grande circulação. Deve-se levar em consideração que o fígado remanescente, na tentativa de repor o que foi perdido na agressão tecidual, para manter a homeostasia também altera o sistema enzimático levando ao aumento dos níveis séricos da GGT.

No período de 20 dias após as cirurgias, momento em que a proliferação celular se encontra em ritmo acelerado, a atividade enzimática da GGT diminui no tecido hepático e aumenta no soro (figura 4 B) dos ratos do grupo HV, mostrando mudanças no metabolismo do verapamil e ativação do sistema enzimático frente a maior demanda do fígado, no processo de recuperação da estrutura e funções perdidas com a agressão cirúrgica, já que não houve diferença significativa na atividade da enzima no grupo tratado somente com verapamil, nos três tempos estudados.

No tempo de 30 dias após a cirurgia, os níveis séricos se mantêm mais baixos em relação àqueles observados no fígado (figura 4 A e 4B).

Em relação à atividade da ALP, o trabalho realizado por NASH (1983) relata que pacientes com distúrbios cardiovasculares que receberam tratamento clínico com verapamil na dose de 120mg por 3 vezes ao dia por via oral, após 3 semanas de tratamento apresentaram aumento nos níveis séricos da AST, ALT e ALP associados a náuseas e constipação intestinal, sugerindo dano hepático induzido pelo verapamil.

Por outro lado, NAUTA *et al.* (1991) estudando os efeitos dos íons cálcio e de agentes bloqueadores dos canais de cálcio no modelo de injúria hepática induzida por isquemia e reperfusão, verificaram que quando o verapamil é administrado por via intravenosa antes da indução da isquemia, os níveis enzimáticos da AST, ALT e ALP mantêm-se semelhantes àqueles encontrados no grupo controle, diminuindo paralelamente a necrose do tecido hepático, analisado histologicamente. Os autores sugerem efeitos benéficos do verapamil traduzidos pela diminuição da concentração de cálcio encontrada nas células hepáticas. Frente ao dano hepático induzido por isquemia, a atividade dessas enzimas encontra-se significativamente elevadas, no período de 21 dias após.

A ALP é uma enzima pertencente ao grupo das fosfoidrolases encontrada em vários tecidos biológicos com elevada concentração no fígado, epitélio do trato biliar e no tecido ósseo, onde tem função importante na mineralização do tecido. Para diferenciar a isoenzima hepatobiliar (ALP1) da isoenzima óssea (ALP2), quando a fonte é menos detectável, mede-se, paralelamente, a atividade sérica da GGT, que tende a acompanhar a ALP na doença hepatobiliar.

De maneira geral, a atividade sérica da ALP aparece aumentada na obstrução do ducto biliar, hepatite viral, cirrose hepática, metástase hepática e em outras. O aumento da atividade sérica reflete a síntese de enzimas e não a excreção biliar diminuída ou um extravasamento a partir das células lesadas. Embora ocorram níveis mais elevados na obstrução do ducto biliar, valores altos podem estar associados a colestase intra-hepática ou a lesões infiltrativas ou tumorais. Por outro lado, o aumento da atividade sérica da ALP pode ser a única alteração clinicamente evidente na estenose do ducto biliar ou nas lesões que promovem obstrução de um único lóbulo ou segmento hepático.

A ALP tem afinidade pela membrana plasmática dos hepatócitos. O aumento da atividade sérica da ALP tem sido associado ao crescimento de tecidos (COLEMAM, 1966; ROY, 1970; ZIMMERMAM, 1974; NASH, 1983).

Nossos resultados, apresentados na tabela 5 e representados nas figuras 5 (A e B), mostram que a atividade enzimática da ALP apresenta níveis mais elevados no soro do que no tecido hepático em regeneração, embora a cinética da atividade sérica apresente parâmetros semelhantes àqueles encontrados no tecido hepático, em relação aos três tempos estudados, com exceção dos grupos H 30 e L30, onde diminuem significativamente alcançando níveis semelhantes aos do grupo controle (C30).

No tecido hepático dos ratos do grupo tratados com verapamil e não submetidos às cirurgias (V), a atividade da ALP aumenta gradativamente, em relação direta ao tempo de tratamento, levando-nos a supor a existência de efeitos dependentes da concentração do verapamil.

Os grupos de ratos submetidos às cirurgias (H, HV e L), apresentaram diminuição gradativa da atividade da ALP, em relação inversa aos tempos estudados, ou seja os resultados são mais expressivos no tempo de 10 dias após as cirurgias.

Nos grupos de ratos hepatectomizados e tratados com verapamil, os níveis enzimáticos apresentam-se mais elevados do que os encontrados nos grupos H e L, em todos os tempos estudados. Nesta situação parece que as alterações enzimáticas provocadas pela agressão tecidual, resultante do estresse cirúrgico, somam-se aos efeitos do verapamil, mostrando resultados mais elevados 10 dias após as cirurgias, quando a massa hepática está diminuída. É interessante observar que o fígado remanescente, mesmo estando funcionalmente debilitado pela agressão cirúrgica, o metabolismo do verapamil não foi prejudicado, visto que a droga aumenta atividade da ALP em fígados intactos (grupos V10, V20 e V30)

À medida que o fígado reconstitui sua massa hepática, a atividade da ALP diminui, mostrando resultados bem mais baixos 30 dias após as cirurgias, confirmando seu envolvimento no crescimento do tecido.

A recuperação dos níveis séricos da enzima é muito evidente. O verapamil aumenta significativamente os níveis séricos da ALP nas duas situações: quando o tecido hepático apresenta-se intacto (grupo V) ou quando agredido pela cirurgia (grupo HV). O fato é que o aumento da atividade sérica da ALP reflete maior síntese da enzima e não excreção biliar diminuída ou extravasamento à partir das células lesadas.

Nossos resultados contrariam aqueles encontrados por NAUTA (1991), quando descreve que o verapamil mantém níveis séricos da ALP semelhantes aos do grupo controle quando o fígado é injuriado por isquemia. No entanto, são coerentes quando o autor mostra que a atividade da ALP se encontra aumentada frente ao dano hepático induzido por isquemia, no período de 21 dias após a mesma. No nosso trabalho a atividade da ALP aparece aumentada tanto no tecido hepático quanto no soro em 20 dias após a indução da injúria pelas cirurgias.

Podemos observar também que a atividade da ALP acompanha os resultados obtidos com a análise da GGT, levando-nos a supor presença de distúrbio hepatobiliar. Devemos deixar claro que a atividade enzimática da GGT se apresenta mais elevada no tecido hepático do que no soro, enquanto a atividade da ALP mostra efeitos opostos.

As aminotransferases séricas (AST e ALT) são consideradas marcadores sensíveis de dano hepatocelular, o que as tornam ferramentas úteis no diagnóstico de doenças hepáticas agudas e crônicas, incluindo hepatites virais, icterícia colestática, cirrose hepática, metástase hepática e necrose tóxica (ZIMMERMAN, 1974; KAPLAN, 1993; ANDERSON & COCKAINE, 1995; HENRY, 1995;), assim como de lesões hepáticas experimentais provocadas pela secção de tecido hepático (HP), em estudo de regeneração hepática (MATTOS-FILHO, 1976; ARAUJO, 1998).

Em ensaios de hepatotoxicidade estes catalisadores biológicos têm sido utilizados como marcadores bioquímicos na pesquisa dos efeitos hepatoprotetores de drogas bloqueadoras de canais de cálcio (NAUTA, 1991; DEAKIN *et al.*, 1991; STEIN *et al.*, 1993; SIPPEL *et al.*, 1993; SCHMITZ *et al.*, 1994; CHAVEZ-CARTAYA, 1994; KURITA *et al.*, 1994; ELLOUK-ARCHARD *et al.*, 1995; RATRA *et al.*, 1998; FARGHALI, 2000).

A AST é encontrada no citosol e mitocondria das células hepáticas, cardíacas, musculares esqueléticas, renais, apresentando maior atividade nos hepatócitos. A ALT é uma enzima citosólica com alta afinidade no tecido hepático e baixa atividade no coração, músculo esquelético, rins, pâncreas e baço. Os níveis plasmáticos de AST, geralmente são mais elevados do que os da ALT, em função da primeira ser encontrada simultaneamente, nos dois compartimentos biológicos, citosol e mitocondria (ZIMMERMAM,1974; KAPLAN, 1993; HENRY, 1995; ANDERSON & COCKAINE, 1995).

Analisando as tabelas 6 e 7 e as figuras 6 (A e B) e 7 (A e B), pode-se observar que a atividade enzimática da AST (figura 6 A) e ALT (figura 7 A) no tecido hepático aumenta drasticamente apenas no grupo hepatectomizado e tratado com verapamil por 10 dias após HP, em relação ao grupo controle. Isto pode ser explicado pelas alterações das funções hepáticas frente agressão tecidual provocadas pela HP, produzindo insuficiência hepática acentuada, o que pode repercutir sobre o sistema endócrino. Tal insuficiência, evidentemente, causará prejuízo ao metabolismo do verapamil, aumentando sua concentração sanguínea e reduzindo a excreção urinária, o que poderá aumentar a toxicidade.

Vinte dias após as cirurgias, pudemos observar uma acentuada diferença entre a atividade enzimática da AST nos grupos hepatectomizados e laparatomizados, em relação aos grupos C20 e V20, o que veio confirmar a existência de lesão hepática tanto de membrana citoplasmática como de organelas mitocondriais, locais de maior concentração da enzima.

Outrossim, analisando o comportamento da atividade enzimática da ALT, verifica-se que essa exibe comportamento bioquímico semelhante ao da AST vinte dias após HP, o que veio confirmar a ocorrência de lesão hepática sobre a membrana citoplasmática dos hepatócitos, visto que essa enzima se encontra exclusivamente no citosol.

O verapamil diminuiu drasticamente a atividade enzimática da AST e ALT no tecido hepático aos vinte dias após HP, retornando a níveis próximos aos do grupo controle aos 30 dias após HP, indicando recuperação funcional do parênquima hepático. Os

resultados sugerem, também que com as funções endócrinas tendendo para níveis normais, o crescimento gradual da massa hepática aumenta o metabolismo do verapamil, diminuindo seus efeitos tóxicos.

Os níveis enzimáticos da AST encontram-se mais elevados quando comparados aos da ALT, o que pode ser justificado pela presença da AST em dois compartimentos distintos, citosol e mitocôndria das células hepáticas.

Os dados representados nas figuras 6 B e 7 B, mostram as alterações nos níveis séricos da AST e ALT. Observa-se que tanto a atividade enzimática da AST como da ALT apresentam aumento significativo em todos os grupos estudados em 10 e 20 dias após HP, em relação aos respectivos grupos controle (C10 e C20), enquanto que 30 dias após HP, não houve diferença significativa entre os grupos estudados e o grupo C30.

No grupo hepatectomizado e tratado com verapamil aos 10 dias após HP, os níveis enzimáticos séricos das duas enzimas aumentam acentuadamente e diminuem gradualmente nos tempos 20 e 30 dias após HP, sendo essa diminuição estatisticamente significativa. O aumento ocorrido nos 10 primeiros dias após HP, pode ser explicado pela maior concentração sanguínea do verapamil, resultante da insuficiência hepática promovida pela secção do tecido, associada a menor massa hepática remanescente, aumentando assim a demanda enzimática.

Trinta dias após HP, podemos observar que a atividade da AST e ALT no soro dos ratos hepatectomizados (H), hepatectomizados tratados com verapamil (HV) e bem como os laparatomizados (L), permanecem semelhantes aos níveis séricos encontrados nos ratos do grupo tratado com verapamil (V), isso significa que tanto a atividade da AST como da ALT, embora com valores acima do limite controle (C30), não está afetada pelas cirurgias. Possivelmente nesse período a regeneração do tecido hepático, já se encontre quase completa, indicando interesse em se fazer um grupo com 40 dias para confirmar tal hipótese.

Nossos resultados são coerentes com os achados por NAUTA *et al.* (1991), STEIN *et al.* (1993), DIMOVA *et al.* (1995), YAKIMOFF *et al.* (2003), quando estudaram

os efeitos hepatoprotetores do verapamil na injúria celular induzida por diferentes mecanismos. NAUTA mostra que na injúria hepática induzida por isquemia e reperfusão, o verapamil, se administrado antes da isquemia, tem efeitos hepatoprotetores, pois mantém os níveis enzimáticos séricos da AST, ALT e ALP semelhantes aos do controle. Paralelamente, a análise histológica mostra diminuição da necrose centrolobular e a deposição de gorduras no tecido hepático. STEIN demonstra que em ratos sensibilizados por injúria hepática oxidativa pela depleção química de glutathion (GSH), o pré-tratamento com verapamil causa diminuição da atividade enzimática da ALT associada à queda de peroxidação lipídica, no fígado de ratos GSH depletado, enquanto que nos ratos normais, tal não ocorre. DIMOVA e seus colaboradores (1995), verificaram que o verapamil e outros BCC, administrados uma hora antes do acetaminofem – agente hepatotóxico – mantém os níveis enzimáticos séricos da AST iguais aos do controle. YAKIMOFF *et al.* (2003) pesquisaram os efeitos da radiação laser de baixa potência na regeneração do fígado de ratos hepatectomizados e tratados com verapamil e verificaram que no grupo hepatectomizado e tratado com verapamil houve diminuição da atividade enzimática da AST, ALT e GGT no fígado e no plasma, 14 dias após HP, em relação ao grupo hepatectomizado irradiado com laser e tratado com verapamil.

Nossos dados são também coerentes aos dados encontrados por KANASHIMA *et al.* (1983), ZIEVE *et al.* (1984), CASTRO *et al.* (2001), YAKIMOFF *et al.* (2003), quando demonstram aumento da atividade séricas das aminotransferases (AST e ALT), em ratos parcialmente hepatectomizados.

Frente aos resultados obtidos, podemos considerar que o fígado remanescente manteve o parênquima hepático funcional e sistema enzimático constantemente ativo, trabalhando de maneira acelerada no processo de repor a estrutura e funções danificadas na HP. O tempo de 20 dias é crítico para o desenvolvimento do processo de crescimento tecidual e regeneração celular, pois nessa fase todas as enzimas analisadas apresentam atividade alterada, o que nos leva a supor uma maior proliferação celular dos hepatócitos.

Nessa fase também, os efeitos do verapamil sobre a atividade das enzimas no fígado em regeneração mostraram-se mais expressivos.

A atividade da maioria das enzimas encontra-se alteradas aos 30 dias após as cirurgias, em relação aos grupos controle. Embora essas alterações não representem sempre diferença estatística, é prudente que façamos análises enzimáticas em nível basal e aos 40 dias após as cirurgias, no intuito de detectar se o sistema enzimático, nessa fase, opera em níveis basais, confirmando assim completa regeneração tecidual.

NASH (1983) relata que pacientes com distúrbios cardiovasculares que receberam tratamento clínico com verapamil na dose de 120mg por 3 vezes ao dia por via oral, após três semanas de tratamento apresentaram aumento nos níveis séricos da AST, ALTe ALP associados a náuseas e constipação intestinal, sugerindo dano hepático induzido pelo verapamil, alertando quanto ao uso em portadores de disfunção hepática.

HOFER *et al.* (1993) relataram um índice significativo de mortalidade causado por superdosagem de verapamil, envolvendo adultos e crianças. Para trinta casos de intoxicação, dos quais oito tiveram êxito letal, as pacientes apresentaram hipotensão, alteração da consciência, bradicardia, hiperglicemia e outras alterações. As doses de verapamil que causaram intoxicação variaram de 0,48 a 9,3g. Foi demonstrado por TRIGGLE & SWAMY, (1992), que a ação seletiva dos bloqueadores dos canais de cálcio depende de vários fatores, dentre eles o estado patológico do tecido; pacientes com disfunção hepática ou renal que fazem uso de doses terapêuticas são passíveis de superdosagem, com intoxicação decorrente, exigindo cuidados.

Para nós, a preocupação desses autores frente ao uso do verapamil em pacientes com disfunção hepática não foi evidenciada durante o presente experimento, pois os ratos não apresentaram efeitos colaterais associados ao verapamil, quando receberam a droga por tempo prolongado na dose de 24mg/rato/dia, a qual correspondeu a aproximadamente, 12 vezes àquelas usadas no homem. Ao contrário, o verapamil sempre mostrou efeitos favoráveis à recuperação do fígado, tanto em nível funcional como estrutural, durante todo o tempo do experimento. Tal nos leva a considerar a dose do verapamil e o tempo de tratamento, adequados para o estudo.

Nossos resultados sugerem efeitos protetores do verapamil, pois tanto a síntese de proteínas como as alterações enzimáticas mostraram, sempre, favoráveis à recuperação

funcional do fígado, em concordância com a análise histológica, demonstrando que no fígado dos ratos do grupo tratado com verapamil, o edema intracelular mostrou intensidade diminuída, em relação ao grupo hepatectomizado e não tratado.

6.2 – **Análise histológica complementar**

Na observação histológica do tecido hepático foram avaliadas manifestações histopatológicas tais como: esteatose hepática, necrose tecidual e edema intracelular.

No nosso trabalho foi evidenciado a presença de edema intracelular, não sendo encontradas outras alterações teciduais.

Tem sido referido na literatura que a depleção de ATP é o principal fator responsável pelo edema intracelular, sendo que tal depleção produz distúrbio na regulação do volume celular pela membrana citoplasmática. A falta de energia devido à diminuição da concentração de ATP mitocondrial, causada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio associado ao aumento da atividade das ATPases, faz com que o sódio se acumule intracelularmente reduzindo a atividade da bomba de $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, juntamente com os íons Cl^- ; concorrendo com este fenômeno há difusão de K^+ para o meio extracelular. O ganho osmótico de água, crescimento celular e dilatação do retículo endoplasmático eleva a pressão colóide osmótica do hepatócito, levando ao edema intracelular (KAPLAN, 1993; ZIMMERMAM & LEWS, 1995; COTRAN *et al.* 1996; ARAÚJO & MATTOS-FILHO, 1998).

Quando o fígado se encontra numa situação patológica onde predomina o edema intracelular (tumefação), como foi observado em nosso trabalho, os hepatócitos apresentam um formato globuloso, citoplasma grandemente vacuolizado com grandes espaços claros e núcleo central. Os capilares sinusóides entre as fileiras de hepatócitos, aparentam estarem comprimidos e congestos.

As observações histológicas dos fígados dos ratos dos grupos laparatomizados (L), hepatectomizados (H) e hepatectomizados tratados com verapamil (HV) apresentaram grande variabilidade dos aspectos morfológicos dos elementos teciduais analisados.

No grupo de ratos que sofreu apenas laparotomia (L), os fragmentos analisados dos fígados, mostraram histologicamente edema intracelular leve com capilares levemente congestos, aos 10 dias após a cirurgia. Aos 20 dias os hepatócitos e os capilares sinusóides apresentaram aspectos normais. Aos 30 dias os hepatócitos apresentaram levemente tumefactos e os capilares sinusóides, aspectos normais. O fígado dos ratos do grupo hepatectomizado (H) mostrou hepatócitos com severa tumefação aos 10 dias após hepatectomia parcial (H10), moderada aos 20 dias (H20) e leve aos 30 dias após (H30). Os hepatócitos apresentaram globulosos, citoplasma vacuolizado com grandes espaços claros e núcleo central. Os capilares sinusóides hepáticos apresentaram-se muito congestos em todos os períodos experimentais. Tal fato não ocorreu com os ratos do grupo hepatectomizado tratados com verapamil (HV), quando o grau de tumefação dos hepatócitos mostrou-se moderado aos 10 dias após hepatectomia parcial com aspecto leve aos 20 e 30 dias após. Os capilares sinusóides entre as fileiras de hepatócitos apresentaram-se pouco congestos e alguns com aspectos normais aos 10 dias após HP. Aos 20 e 30 dias após HP, a maioria dos capilares sinusóides mostraram aspectos normais.

Paralelamente observou-se aumento da síntese de proteínas e dos níveis séricos da ALP aos 20 e 30 dias após hepatectomia parcial no grupo tratado com verapamil em relação aos grupos (H) e (L), situação essa que pode estar relacionada com crescimento de tecido. Nesse período constata-se também uma diminuição da atividade enzimática da GGT, AST e ALT no tecido hepático e no soro.

Frente aos resultados obtidos, podemos inferir que o verapamil, na dose de 24mg/rato/dia, aumenta a síntese de proteínas e altera o sistema enzimático, diminuindo a atividade das enzimas marcadoras de dano hepatocelular e o grau de intensidade do edema intracelular, sugerindo efeitos hepatoprotetores quando o fígado é lesado pela remoção de 2/3 de tecido do órgão

Como foi demonstrado na literatura consultada que a homeostase do cálcio tem função central no desenvolvimento de lesões hepáticas e/ou regeneração do tecido, é válido analisar o conteúdo de cálcio no sangue e no tecido hepático em regeneração de ratos parcialmente hepatectomizados e bem como identificar o cálcio, histologicamente, através da reação com o Fura-2. Tal trabalho já se encontra em andamento em nossos laboratórios.

7- CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que o verapamil, no esquema experimental proposto, contribui de maneira positiva, na regeneração do fígado de ratos , após HP com retirada de dois terços do órgão, uma vez que nos grupos tratados:

a) aumentou a síntese de proteínas e a atividade enzimática da colinesterase e da fosfatase alcalina , mostrando situação favorável à recuperação funcional do órgão e ao crescimento do tecido hepático;

b) diminuiu a atividade enzimática da GGT, AST e ALT, indicando recuperação funcional do parênquima hepático;

c) diminuiu o grau de intensidade do edema intracelular nos hepatócitos, após hepatectomia parcial de 2/3 de tecido hepático, sugerindo efeito hepatoprotetor.

d) Embora o sistema enzimático tenha se mostrado comprometido pelo estresse cirúrgico, o verapamil não induziu sinais de intoxicação ou causou morte em nenhum dos grupos estudados, durante todo o experimento.

e) A dose de verapamil usada neste estudo, mostrou ser destituída de efeitos hemodinâmicos nocivos aos animais, levando-nos a considerá-la adequada para o estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERNETHY, D.R.; GUTKOWSKA, J.; LAMBERT, M.D. Amilodipine in elderly hypertensive patients : Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Cardiol. Pharmacol.* 12(suppl.7): S67-S71, 1988.
- AIRES, M.M. Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1991, 795p
- AMORIM, J.B.O. *Efeitos da Isradipina (LOMIR). Agente Inibidor de ca-nais de cálcio no processo de reparo em feridas de extração dental: Estudo histológico em ratos.* Dissertação . Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP, 1995.
- ANDERSON, P.; BONDERSSON,U.; FAIRE,U. Pharmacokinetics of verapamil in patients with hipertension. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31: 155-163, 1986.
- ANDERSON, S.C. & COCKAINE, S. Química Clínica. 1. ed. Mexico: Interamericana mc Graw-Hill, 1995, pp. 251-321.
- ANDERSON, W.R.; ZIEVE, L.; LINDBLAD, S. Ultrastructural study of hepatic regeneration following one-lobe, two-lobe, and subtotal hepatectomy in the rat.*Exp.Pathol.* 38: 61-72, 1990.
- ARAÚJO, C.E.P. *Efeito de um antifúngico derivado imidazólico – Cetoconazol_ sobre o perfil enzimático da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase no soro de ratos parcialmente hepatectomizados.* Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, 1992 .
- ARAÚJO, C.E.P. *Análise preliminar do efeito de algumas espécies do gênero solanum em lesões hepáticas induzidas in vivo pelo CCL 4, em ratos.*Dissertação de doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, 1998.

- AR' RAJAB, A.; AHRÉN, B.; BENGMARK, S. Improved liver preservation for transplantation due to calcium channel blockade. *Transplantation*. 51 (5) 965-67, 1991.
- BELIAEVA, I. D. Effect of repeated partial hepatectomy on cell division in regenerating rat liver. *Biull. Eksp. Bil. Med.*, 1977.
- BELLOMO, G.; NICOTERA, P.; ORRIENIUS, S. Alterations in intracellular calcium compartmentation following inhibition of calcium efflux from isolated hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 144: 19-23, 1984.
- BERGMAYER, H. U. *Methods of enzymatic Analysis*. Eds. Bergmeyer, H. U.; Graal, M. & Bergmeyer J. , Vol III, *Enzymes 1: Oxidoreductases Transferases*. Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 343-450. 1983.
- BEUBLER, E. Pharmakotherapie des Kopfschmerzes unter besonderer Berücksichtigung der Migräne. *Wien. Med. Wochenschr.* 144 : 435-440, 1994..
- BODE, P.H. *et al.* Spontaneous calcium oscillations in clonal endocrine pancreatic glucagon-secreting cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 435-440, 1994.
- BOLTON, T.B. Mechanisms of action of transmitter and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718, 1979.
- BOWERS, W. Jr; DAUM, P; BLAHA, M.; STEVENS, C.; CASTRO, I.; LEAV, I. Calcium antagonists and heat-induced hepatic injury. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 53: 235-242, 1987.

- BREBNOR, L. D.; BALINSKI, J. B. Changes in activity of urea cycle enzymes in early stage of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Life Sci.* **32**: 1391-1400, 1983.
- BROIN, E.; URATA, K.; GIROUX, R.L.; LEPAGE, R. HUET, P.M. Effect of calcium antagonist on rat liver during extended cold preservation- reperfusion. *Transplantation.* **63**:1547-1554, 1997.
- BUCHER, N. L. R. Regeneration of mammalian liver. *Int. Rev. Cytol.* **15**: 245-300, 1963.
- CAO, Y.; CHATTON, J.Y. Involvement of calmodulin in the activation of store-operated Ca⁺⁺ entry in rat hepatocytes. *FEBS Letters.* **424**: 33-36, 1998.
- CAROFOLI, E. Intracellular calcium homeostais. *Ann. Ver. Biochem.* **56**: 395-433, 1987.
- CASINI, F.A .; FARBER, L. J. Dependence of the carbon-tetrachloride-induced death of cultured hepatocytes on the extracellular calcium concentration. *Am. J. Pathol.* **105**: 138-148, 1981.
- CASTRO, O.; JÚNIOR, S.; ZUCOLATO, S.; MENEGAZZO, L. A. G.; GRANATO, R.G.; MARCASSA, L.G.; BAGNATO, V.S. Laser enhancement in hepatic regeneration for partially hepatectomized rats. *Lasers Surg. Medic.* **29**: 73-77, 2001.
- CHAGNAC, A. *et al.* Effect of verapamil on bone resorption and formation in uremic rats. *Miner.Elect.Metabol.* **15**: 291-294, 1989.
- CHAVEZ-CARTAYA, R.E.;DeSOLA, P.G.; RAMIREZ-ROMERO, P.; CALNE, S.R.Y.; JAMESON, V.N. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: The role of Nimodipine. *J. Surg. Res.* **60**: 199-206, 1996.

- CHEUNG, J.Y.; BONVENTRE, J.V.; MALIS, D.C.; LEAF, A. Calcium and injury ischemic. *The New Engl. J. Medic.* 314: 1670-1676, 1986.
- CHIJIWA, K.; KOZAKI, N.; NAITO, T.; OKAMOTO, S.; KUROKI, H.; YAMASHITA, H.; TANAKA, M.. Hepatic bile acid synthesis and DNA synthetic rate after partial hepatectomy. *British J. Sugery.* 83: 482-485, 1996.
- COGNARD, C.; LADZUNKI, M.; ROMEY, G. Different types of Ca⁺² channel in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 517-521, 1986.
- COLEMAN, C.M.; STROJE, R.C. *Clin. Chim. Acta.* 13: 401, 1966.
- COLUCCI, W.S. Usefulness of calcium antagonists for congestive heart failure. *Am. J. Cardiol., New York.* 59: 52B-58B, 1987.
- COMBETTES, L.; DARGEMONT, C.; MAUGER, J.M.; CLARET, M. Measurement of unidirectional calcium ion fluxes in liver. *Methods in enzymology.* 192: 495-501, 1990.
- CONI, P.; SIMBULA, G.; DE PRATI, C. A.; MENEGAZZI, M.; SUZUKI, H.; SARMA, S. R. D.; LEDDA-COLUMBANO, M. G.; COLUMBANO, A. differences in the steady-state levels of *c-fos*, *c-jun* and *c-myc* messenger RNA during mitogen-induced liver growth and compensatory regeneration. *Hepatol.* 17 (6): 1109-1116, 1993.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. *Patologia estrutural e Funcional.* 5. ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, 1996. p. 1-31.
- CRENESSE, D.; HUGUES, M.; FERRE, C.; POIREE, J.C.; BENOLIEL, J.; DOLISI, C.; GUGENHEIN, J. Inhibition of calcium influx during hypoxia/reoxygenation in primary cultured rat hepatocytes. *Pharmacology.* 58:160-170, 1999.

- DAHLOF, B.; SWEDEN, G. Hemodynamic response, safety and efficacy of isradipine in the treatment of essential hypertension. *Am. J. Med.* 86: 19-26, 1989.
- DATTA, K.H., MOCINTSPE, I., ZAIDI, M. Intracellular calcium in the control function. Voltage - insensitivity and lack of effect of nifedipine, Bayk 8644 and diltiazem. *Bioch.Biophys.Res.Commun.*, 167:183-88, 1990.
- DAWSON, A. .P.. Regulation of intracellular Ca⁺⁺. *Essays Biochemistry.* 25:1-37, 1990.
- DEAKIN, C. D.; GOVE, C. D.; FAGAN, E. A.; TREDGER, J. M.; WILLIAMS, R. Delayed calcium channel blockade with diltiazem reduces paracetamol hepatotoxicity in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 10: 119-123, 1991.
- DEAKIN, C.D.; ELIZABETH,A .; WILLIAMS,F.; WILLIAMS, R. Cytoprotective effects of calcium channel blockers mechanisms and potential applications in hepatocellular injury. *J. Hepatol.* 12: 251-255, 1991.
- De LEVE, L.D & KAPLOWITZ, N. Mecanismos da hepatopatia medicamentosa. *Clínicas de Gastroenterologia da América do Norte, Rio de Janeiro.* 4: 795-818, 1975.
- DESIDERIO, M.A .; LUGARO, G.; GALASSO, D.; COLOMBO, M,P. Effect of adrenergic and Ca⁺⁺ antagonists on increased ornithine decarboxylase expression in regeneration rat liver. *Bioch. Pharmacol.* 40(7): 1605-1613, 1990.
- DIETZ, A .; RUBINSTEIN, H.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variant propionylthiocholine (nitrobenzoic acid) procedure. *Clin. Chem.* 19: 1309, 1973.

- DIMOVA, S.; KOLEVA, M.; RANGELOVA, D.; STOYTCHEV, T. Effect of nifedipine, diltiazem and trifluoperazine on acetaminophen toxicity in mice. *Arch. Toxicol.* 70: 112-118, 1995.
- DREWES, G.; SPIEGEL, H.U.; HERMSDORF, T.; DETTMER, D.; RITCHER, V.; HAUSS, J. Cytoprotective effects of a stable prostacyclin analog and a calcium channel blocker: A study on isolated rat hepatocytes. *Transplantation Proceedings*. 27 (5): 2799, 1995.
- DROBITCH, K.C.; McLELLAN, A. R.; RENTON, W.K. Amlodipine inhibits rat microsomal cytochrome P450-mediated drug biotransformation. *J. Pharmac. Sci.* 86 (12):1501-1503, 1997.
- ECHIZEN, H.; EICHELBAUM, M. Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem. *Clin. Pharmacokinet* 11: 425-449, 1986.
- ELLOUK-ACHARD, S.; MAWEL, E.; THIBAUT, N.; DUTERTRE-CATELLA, H.; THEVIENIN, M.; CLAUDE, J. R. Protective effect of nifedipine against cytotoxicity and intracellular calcium alterations induced by acetaminophen in rat hepatocyte cultures. *Drug Chemical Toxicol.* 18(2&3): 105-117, 1995.
- ENE, M.D.; ROBERTS, C.J. Pharmacokinetics of nifedipine after oral administration in chronic liver disease. *J. Clin. Pharmacol.* 27: 1001-1004, 1987.
- E.RWIN, L.; NAUKAN, J.R.; SASTRY, R.V.B. Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochemical Pharmacol.* 35 (4): 697-705, 1986.
- FARBER, L.J. The role of calcium in cell death. *Life Scienc.* 29: 1289-1295, 1981.

- FARGHALI, E.; KMONICKOVA, H.; LOTKOVA, H.; MARTINEK, J. Evaluation of calcium channel blockers as potential hepatoprotective agents in oxidative stress injury of perfused hepatocytes. *Physio. Res.* 49: 261-268, 2000.
- FINUCCI, G.F.; PADRINI, R.; PIOVAN, D *et al.* Verapamil pharmacokinetics and liver function in patients with cirrhosis. *Int. J. Pharmacol. Res.* 7: 123-126, 1988.
- FLECKENSTEIN, A.; KARMMERMEIER, H.; DÖRING, H. J.; FREUND, H. J. . Zum wirkungs mechanismus nenartiger koronardilatoren mit gleichzeitig sauertoff - einsparenden Myokard-Effekten, Premylamin und Iproveratil. 2. Teie. *Z. Kreislaufforschg.*, 56: 839-53, 1967.
- FOX, J.; GREEN, T.D. Directs effects calcium channel blockers an duodenal calcium transport in vivo. *Eur. J. pharm.* 129: 159-164, 1986.
- GAFFIN, L.S. Simplified calcium transport and storage pathways. *Thermol. Biology.* 24: 251-264, 1999.
- GARAY, G. L.; ANNESLEY, M.; BURNETTE, M. Prevention of experimental liver injury in rats by nicardipine. a calcium entry blocke. *Syntex res.*. Abstract of papers p. 1319, 1984.
- GARY, P.G. Cholinesterase determination. *Clin. Chem.* 17: 1145, 1971.
- GARZINO-DEMO, P.; CARBONE, M.; CARROZZO, M.; BROCCOLETTI, R.; GANDOLFO, S. An increase in gingival volume induced by drugs (phenytoin, cyclosporine and calcium antagonists). A review of the literature. *Minerva Stomatol.* 47: 387-398, 1998.

- GASPBARRINI, A. ; BORLE, B.A. ; THIEL, D.H.V. Ca⁺⁺ antagonists do not protect isolated perfused rat hepatocytes from anoxic injury. *Biochimica Biophys. Acta* 1177: 1-7,1992.
- GREEN, K.; CHEEKS, L.; HULL, D.S. Effects of calcium channel blockers on rabbit corneal endothelial function. *Curr. Eye. Res.* 13: 401-408,1994.
- GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.G. The pharmacological basis of therapeutics. 9 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2003, 1905.
- GORNAL, A.G.; BARDAWELL, C. J.; DAVID, M.M. determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.*. baltimore, 177: 751-766, 1949.
- GRISHAM, J.W. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H. *Cancer Res.* 22: 842-849, 1962.
- GRYGORCZYK, C.; GRYGORCZYK, R.; FERRIER, J. Osteoblastic cells have L. type calcium channels. *Bone Miner.* 7: 137-148, 1989.
- HABER, B. A. ; MOHN, K.; L.; DIAMOND, R. H.; TAUB, R. Induction pattern of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 91: 1319-26, 1993.
- HAGIYA, M., FRANCAVILLA, A., POLIMENO, L., IHARA, I., SAKAI, H., SEKI, T., SHIMONISHI, M., PORTER, K. A., STARZL, T. E. cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ARL) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8142-146, 1994.

- HANDLER, C.E. Comparison of isradipine in chronic stable angina. *Int. J. Cardiol.* 18: 15-26, 1988.
- HARPER, H.A. Manual de química fisiológica. 7.ed. São Paulo. Atheneu, 1994.
- HENRY, R. J.; CANNON, D. C.; WINKELMAN, J. W. *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, 2nd. Ed. Harper & Row, New York, 1974.
- HENRY, J.B. Diagnosticos Clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 18. ed. São Paulo: Manole LTDA. 1995. p. 261-324.
- HIGASHITSUJI, H.; SHIGEKI, A.; FURUTANI, M. *et al.* Expression of cytokine genes during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J. Surg. Res.* **58**: 267-274,1995.
- HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M.. Experimental pathology of the liver. 1. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**: 186-202, 1931.
- HOFER, C.; SMITH,J.K.; TENHOLDER, M. F. Verapamil intoxication: A literature review of overdose and discussion of therapeutic options. *Am. J. Med.* 95: 431-437, 1993.
- HUGHES, P.B.; MILTON, S.E.; BARRITT, J.G.; AULD, M..A .Studies with verapamil and nifedipine provide evidence for the the presence in the cell plasma membrane of two types of Ca⁺⁺ inflow transporter which are dissimilar to potential operated Ca⁺⁺ channels. *Biochemical Pharmacol.* 35: 3045-3052, 1986.

- JAISWAL, B.V.; SOSTRY, R.; LANDON, E.J. Changes in microsomal membrane microviscosity and phospholipid methyltransferase during rat liver regeneration. *Pharmacology*. 24: 355-365, 1982.
- JONES, R.D.; GORSKI, J.C.; HAMMAN, M.A. ; MAYEW, S.B.; RIDER, S.; HALL, D.S. Diltazem inhibition of cytochrome P-450 3A activity is due to metabolite intermediate complex formation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 290(3): 116-125, 1999.
- JUNGERMANN, K.; KATZ, N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.* 69(8): 709-764, 1989.
- KAHN, D.; HIRKMAN, R.; TERBLANCHE, J. Von SOMOGGI, S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs – the response to different resection sizes. *J. Surg. Res.* 45: 176-180, 1988.
- KALANT, H., ROSCHLAU, W.H.E. *Principios de Farmacologia Médica*. 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1991, p. 302-304.
- KANAYAMA, Y.; YAMAGUCHI, M. Enhancement of nuclear Ca⁺⁺-ATPase activity in regenerating rat liver: involvement of nuclear DNA increase. *Mol. Cell. Biochemistry*. 146: 179-186, 1995.
- KANASHIMA, R. *Et al.* Inhibitory effect of Cimetidine in liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats. *Am. Surg.* 46: 293-298, 1983.
- KAPLAN, M. M. *Laboratory Test Diseases of the liver*. Ed. By Schiff, L. & Schiff, E.R. 7ed. Philadelphia Lippincott Company, 1993. p. 108-783.

- KATO, K.; MATSUDA, M.; KUSANO, M. ONODERA, K.; KATO, J.; KASAI, S. HODGSON, W. J. The immunostimulant OK-432 enhances liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *Hepatology*, 19: 1241-1244, 1994.
- KATZUNG, B.G. *Farmacologia Básica & Clínica*. 5ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994, p. 128-131.
- KAWASHIMA, H.; AKIMOTO, K.; JAREONKITMONGKOL, S.; SHIRASAKA, N.; SHIMIZU, S. Nicardipine and nifedipine inhibit fatty acid desaturases in rat liver microsomes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(10): 1672-1676, 1996..
- KEDDERIS, L.G. Biochemical basis of hepatocelular injury. *Toxicol. Pathol.* 24(1): 77-83, 1996.
- KOLEVA, M.; STOYTCHEV, T. Effect of nifedipine, verapamil and diltiazem on drug-metabolizing enzyme systems after single administration in rats *Med. Toxicol.* 44 (3): 109-111,1991.
- KROEMER, H.K.; GAUTIER, J.C.; BEAUNE, P.; HENDERSON, C.; WOLF, C.R.; EICHEBAUN, M. Identification of P-450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. *Arch. Pharmacol.* 348: 332-337, 1993.
- KURITA, K.; TANABE, G.; AIKOU, T.; SHIMAZU, H. Ischemic liver cell damage and calcium accumulation in rats. *J. Hepatol.* 18: 196-204, 1993.
- KURITA, K.; TANABE, G.; AIKOU, T.; SHIMAZU, H. Inhibition of intrahepatic Ca⁺⁺ by diltiazem in rats with liver ischemia. *J. Hepatol.* 21; 567-71, 1994.
- LARAGH, J.H. Calcium metabolism and calcium channel blockers for understanding and treating hipertension. *The Am. J. Med.* 77(suppl. 6B): 1-23,1984.

- LEMASTERS, J.J.; DIGUISEPPI, J.; NIEMINEN, A. .L.; HERMAN, B. Blebbing, free Ca⁺⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature*. 325: 378-81.
- LIANG, D. THURMAN, R.G. Protective effects of the calcium antagonists diltiazem and TA 3090 against hepatic injury due to hypoxia. *Biochemical Pharmacol.*44 (11): 207-211, 1992.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, H. J.; FARR, A. L.; RANDALL, J. R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 263-276, 1951.
- MACINTOSH, E.; GAUTHIER, T.; PETTIGREW, M. N.; MINUK, Y.G. Hepatic fibrosis as a predictor of regenerative activity partial hepatectomy in the rat. *Hepatology*. 17 (2): 307-309, 1993.
- MATSUDA, S. Protective effects of calcium antagonist (nitrendipine) on calcium ionophore A23187-induced liver cell injury. *Med. Dent. Univ.* 28: 35-44, 1991.
- MATTOS FILHO, T. R.; BASTOS-RAMOS, W. P. Influência da hepatectomia parcial no tempo de sono pelo metohexital (Brietal) em ratos. *Ciência e Cultura*, 575, 1977.
- MATTOS FILHO, T. R. *Influência da hepatectomia parcial sobre o tempo de sono causado pelo metohexital (Brietal), em ratos*. Tese. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, 1984.
- MATSUDA, S. Protective effects of calcium antagonists (nitrendipine) on calcium ionophore A 23187-induced liver cell injury. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 38: 35-44, 1991.

- MAUGER, J.P. & CLARET, M. Calcium channels in hepatocytes. *J. Hepatol.* 7: 278-282, 1988.
- McGOWAN, J.; ATRYZEK,V.; FAUSTO, N. Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. *Biochem. J.* 180: 25-35, 1978.
- McINNES, G.T. Clinical Pharmacokinetics of verapamil. *Br. J. Clin. Pract.* 42: 3-8, 1988.
- MICHALOPOULOS, K. G. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.* 4: 176-187, 1990.
- MICHEL,D. A .; WHITING, L. Cellular action of nicardipine. *Am. J. Cardiol.* 64: 3H-7H, 1989.
- MIYAZAWA, K.; TSOBOUCHI, H; NAKA, D. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 967, 1989.
- MORROW, M. Verapamil enhances antitumor activity increasing myloid toxicity. 101 (1): 63-68, 1987.
- MOSER, M. Calcium entry blockers for systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 59: 115-121, 1987.
- MURRAY, M.; BUTLER, M. Enhanced inhibition of microsomal cytochrome P450 3 A 2 in rat liver during diltiazem biotransformation. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 279 (3): 1447-52, 1996.
- NAKAMURA, T.; NISHIZAWA, T.; HAGIYA, M. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 442, 1989.

- NAKAMURA, T.; ARAKAI, R.; ICHIHARA, A. Interleukin – 1 beta is a potent growth inhibitor of rat hepatocytes in primary culture. *Exp. Cell Res.* 179: 488, 1988.
- NASH, T. D.; FEER, D. T. Hepatic injury possibly induced by verapamil. *JAMA.* 249 (3): 395-396, 1983.
- NAUTA, J. R.; TSIMOYANNIS, E.; URIBE, M.; WALSH, D. B.; MILLER, D. BUTTERFIELD, A. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia- reperfusion-induced liver injury. *Ann. Surg* 213 (2): 137-142, 1991.
- NAYLER, W.G. *et al*, Fundamental mechanisms of action of calcium antagonists in myocardial ischemia. *Am.J.Cardiol.*, 59:75B-83-B, 1987.
- NETLAND, P.A. Color doppler ultrasound analysis of ocular circulation after tropical channel blocker. *Am. J. Ophthalm.* 119: 94-700, 1995.
- NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. The role of Ca^{++} in cell killing. *Chem. Res. Toxicol.* 3: 484-494, 1990.
- _____ Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.* 32: 449-70, 1992.
- NISHIKAWA, Y.; UKIDA, M.; MATSUDA, R.; OMORI, N.; TSUJI, T. Ca^{++} influx initiates death of hepatocytes injured by activation of complement. *Liver.* 14; 200-305, 1994.

- NOOTER, K.; OASTRUM, R.; DEURLOO, J. Effects of verapamil on the pharmacokinetics of daunimicin in the rat. *Cancer. Chemother. Pharm.* 20: 176-178, 1987.
- NOWYCKY, M.C.; FOX, P.A., TSIEN, W.R. Three types neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature.* 316: 440-443, 1985.
- NYSKA, M. Gingival hyperplasia induced by calcium channel blockers, mode action. *Medic. hypotesis.* 43: 115-118, 1994.
- OMURA, M.; YAMAGUCHI, M. Enhanced of neutral phosphatase activity in the cytosol and nuclei of regenerating rat liver: Role of endogenous regucalcin. *J. Cel. Biochemistry.* 73: 332-341, 1999.
- OPIE, L.H. Calcium channel antagonists. Part III: Use and comparative efficacy in hypertension and supraventricular arrhythmias. Minor indications. *Cardiovasc. Drugs. Ther.* 1: 625-656, 1988.
- ORRENIUS, S.; McCONKEY, J. D.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{++} in toxic cell killing. *TIPS.* 10; 281-285, 1989.
- PENTO, J.T.; JONHSON, M.E. the influence of verapamil on calcium transport and uptake in segments of rat intestine. *Pharmacology.* 27; 343-349, 1983.
- PERNU, H. E.; OIKARINEN, K.; HIETANEN, J.; KNUUTTILA, M. Verapamil-induced gingival overgrowth: a clinical, histologic, and biochemic approach. *J. Oral Pathol. Med.* 18: 422-425, 1989.

- POGGLIOLI, J.; MAUGER, J. P.; GUESDON, F.; CLARET, M. A regulatory calcium-binding site for calcium channel in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chemistry*. 260 (6): 289-294, 1985.
- RADDINO, R. *et al.* Effects of calcium entry blockers not connected with calcium channels inhibition. *Gen. Pharmacol.* v 18. p. 431-36, 1987.
- RANG, H.P., DALE, M.M. *Farmacologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1993, p. 211-214.
- RATRA, G.S.; MORGAN, W.A.; POWELL, C.J.; WRIGHT, M.C. Metaprilene hepatotoxicity is associated with oxidative stress, mitochondrial dysfunction and is prevented by the Ca⁺⁺ channel blockers verapamil. *Toxicology*. 130: 79-93, 1998.
- RECHNAGEL, R.O.; GLENDE, JR.E.A. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. An example of lethal cleavage. *CRC. Crit. Rev. Toxicol.* 2: 263-267, 1973.
- REITMAN, S & FRANKEL, S. A colorimetric Method for the determination of serum Glutamic Pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Path.* 28: 56-63, 1957.
- RENTON, W. K. Inhibition of hepatic microsomal drug metabolism by the calcium channel blockers diltiazem and verapamil. *Biochemical Pharmacol.* 34 (14): 549-553, 1985.
- RIBEIRO, W.; MUSCARÁ, N. M. Características farmacocinética de antagonistas de canais de cálcio, inibidores da ECA e antagonistas de angiotensina II em humanos. *Ver. Bras. Hipert.* 8 (1): 114-124, 2001.
- RICHMAN, R. A.; CLAUS, T. H.; PILKIS, S. J. Humoral stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 73: 589- , 1976.

- RINK, J. T. Receptor-mediated calcium entry. *FEBS*. 268 (2): 381-385, 1990.
- RITCHIE, K.C., MAERCKLEIN, B.P., FITZEPETRICK, A.L. Direct effect of calcium channel antagonists on osteoclast function: alterations in bone resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology*. 135: 996-1003, 1994.
- RODRIGUES, L.E.A. Enzimologia Clínica. Rio de Janeiro. Revinter Ltda. 2001,157.
- ROSE, S.; PIZANIS, A .; SILOMON, M. Altered hepatocellular Ca⁺⁺ regulation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Hepatology*. 25 (2): 379-383, 1996.
- ROTH-EICHORN, S.; EBERHEIN, A .; BODE, HP.; GRESSNER, M. A . Transformation-dependent calcium influx by voltage-operated calcium channels in stellate cells of rat liver. *J.Hepatology*. 30: 612-630, 1999.
- ROY, A. V. *Clin. Chem*. 16: 431-1970.
- SAMNEGARD, E., SJÖDÉN, G. Verapamil induces increased bone volume and osteopenia in female rats but has the opposite effect in male rats. *Calcif. Tissue Int*. 50: 524-526, 1992.
- SANK, A .; SHIMA, T.; REICH, R.; MARTIN, G. R. Increased calcium levels alter cellular and molecular events in wound healing. *Surgery* 106: 1141-1148, 1989.
- SCHANNE, A . X. F.; KANE, B. A .; YOUNG, E. E.; FARBER, L.J. Calcium dependence of toxic cell death: A final common pathway. *Science*. 206:700-702, 1979.

- SCHIESSEL, C.; FORSTHOVE, C.; KEPPLER, D. Calcium uptake during the transition from reversible to irreversible liver injury induced by d-galactosamine in vivo. *Hepatology*. 4 (5): 558-561, 1984.
- SCHMITZ, G.; LEPPER, H.; ESTLER, C. J. Failure of calcium antagonist agent to prevent hepatotoxicity by diclofenac. *Pharmacol. Toxicol.* 77: 32-35, 1995.
- SCHRAM, M.; TOWART, R. Modulation of calcium channel function by drugs. *Life Sci.* 37: 1843-1860, 1985.
- SCHULTZE, B.; OEHLERT, W. Autoradiographic investigation of H³-thymidine into cells of rat and mouse. *Science*, 131: 731-738, 1961.
- SESIN, J.; TAMARGO, J. Farmacocinética clínica de los antagonistas del calcio. *Medicina*. 57: 451-462, 1997.
- SIES, H.; GRAF, P.; ESTRELA, MJ. Hepatic calcium efflux during cytochrome P-450-dependent drug oxidations at the endoplasmic reticulum in intact liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78: 3358-61, 1981.
- SJODÉN, G.; ROSENOVIST, M.; KRIEGOLM, E. & HAGLUND, K. Calcium absorption and excretion in patients treated with verapamil. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24: 367-371, 1987.
- SANK, A.; SHIMA, T.; REICH, R.; MARTIN, G.R. Increased calcium levels alter cellular and molecular events in wound healing. *Surgery*. 106: 1141-1148, 1989.
- SIMECKOVA, A. *et al.* The effect of verapamil and calcium ionophore A 23187 on the calcium and phosphorus content of bone. *Physiol. Biochem.*, 36:149-152, 1987.

- SIPPEL, H.; STAUFFERT, I.; ESTLER, C. J. Protective effect of various calcium antagonists an experimentally induced calcium overload in isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacol.* 46 (11): 1937-1944, 1993.
- SNYDER, S., REYNOLDS, J.I. Calcium antagonists drugs. *N. Eng. J. Med.* 313: 995:1001, 1985.
- STEER, J. C. Liver regeneration. *FASEP J.* 9: 1396-400, 1995.
- STEIN, J. H.; OOSTHUIZEN, M. J.; HINDER, A. R.; LAMPRECHTS, H. Effects of verapamil on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Surg.* 165: 96-00, 1993.
- STORTEIN, L. *et al.* Anthypertensive effect of verapamil in relation to plasma concentration of verapamil and its metabolic norverapamil. *Cur. Therap. Res. Trenton.* 29: 112-119, 1981.
- STRIGGOW, F.; BOHNENSACK, R. Verapamil and diltiazem inhibt receptor-operated calcium channel and intracellular calcium oscillations in rat hepatocytes. *FEBS.* 318 (3): 341-344, 1993,
- STRYER, L. Bioquímica. 3° ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992, p. 753-776.
- TAYLOR, M. W.; VAN DE POL, E.; HELDEN, V.; REINHART, H.P.; BYGRAVE, L. F. Effect of depolarizing concentrations of potassium on calcium uptake and matabolism in rat liver. *FESBS.* 183: 70-74, 1985.
- THOMAS, E. C.; REED, J. D. Current status of calcium in hepatocelular injury. *Hepatol.* 10 (3): 375-384, 1989.

- TRIGGLE, D.J., SWAMY, V.C. Pharmacology of agents that effect calcium: agonistas e antagonistas. *Chest*, 78: 174-179, 1980.
- TSIEN, R.W. *et al.* Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc. Gen. Physiol. Rev.* 41:167-187, 1987.
- TSOKOS-KUHN, O. J. Evidence in vivo for elevation of intracellular free Ca⁺⁺ in the liver after Diquat, acetaminophen, and CCl₄. *Biochemical Pharmacol.* 38 (18): 3061-3065, 1989.
- TSUKAMOTO, I.; NAKATA, R.; KOJO, S. Effect of ageing on rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30 (4): 773-778, 1993.
- TSUKAMOTO, I.; WAKABAYASHI, M.; TAKEBAYASHI, K.; NOMURA, S. Control of thymidini kinase during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochimica. Biof. Acta.* 1290: 267-272, 1996.
- UEHARA, Y. New dihydropiridine calcium channel antagonist Pranidipine attenuates hypertensive renal injury in dahl sat-sensitive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 23: 970-979, 1994.
- UBEAUD, G.; CHAUVET-MONGES, A . M.; TILLEMENT, J. P.; CREVAT, A . Calcium anti-ionophoretic effect of some calcium channel blockers in rat liver mitochondria. *J. Pharmaceutical Scienc.* 83 (2): 165-168, 1992.
- VILELA-GOULART, M.G. *Ação do verapamil, bloqueador dos canais de cálcio, sobre o desenvolvimento do germe dentário de ratos e sua correlação com os níveis séricos de cálcio.* Dissertação. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, 1996.

VILELA-GOULART, M. G.; BASTOS-RAMOS, W. P.; ROCHA, R. F.; SALGADO, M. A.; RANALI, J. Effects of calcium blocker verapamil on bone and dental germ, in rats. *Archs. Veter. Sci.* 4 (1): 35-40, 1999.

YAKIMOFF, A. Efeito da radiação laser de baixa potência (785) sobre a regeneração hepática de ratos parcialmente hepatectomizados tratados com bloqueador dos canais de cálcio (verapamil). Dissertação. Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, 2003.

YAMAGUCHI, M.; KANAYAMA, Y. Enhanced expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in regenerating rat liver. *J. Cell. Biochemistry.* 57: 185-190, 1995.

YAMAGUCHI, M.; UEOKA, S. Inhibitory effect of calcium-binding protein regucalcin on ribonucleic acid synthesis in isolated rat liver nuclei. *Mol. Cell. Biochem.* 173: 169-175, 1997.

YAMAGUCHI, M.; KATSUMATA, T. Enhancement of protein Kinase activity in the cytosol of regenerating rat liver: regulatory role of endogenous. *J. mol. Med.* 3 (5): 505-10, 1999.

YAMAMOTO, H.; MURAWAKI, Y.; KAWASAKI, H. Hepatic collagen synthesis and degradation during liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatol.* 21 (1): 155-60, 1995.

YAMAZAKI, K.; LARUSSO, F. N. The liver intracellular digestion: how liver cells eat! *Hepatol.* 10 (5): 877-886, 1989.

YEDINAK, K.C. Use of calcium channel antagonists for cardiovascular disease. *Am. Pharm.* 33: 49-64, 1993.

WEINBREIN & FITSCHEN, W. the influence of sodium fluoroacetate on the regeneration of the rat liver. *Br. J. Exp. Pathol.* 40: 107-112, 1959.

WEINER, A.D. Calcium channels blockers. *Med. Clin. N. Am.* 72: 83-111, 1988.

WEINSTEIN, B.D.; HEIDER, G.J. Anthiatherogenic properties of calcium antagonists. *Sm. J. Cardiol.* 59: 163B-172B, 1987.

WEISS, K. *et al.* Kalzium antagonistein: antiaterosklerotische wirking durch beeinflussing des prostaglandin systemy wien. *Klin. Wschr.* 100: 718-720, 1988.

WESTGARD, J.O.; BARRY, P.L.; HUNT, M.R. *Clin. Chem.* 27: 493-501, 1981.

WROBEL, J.; MICHALSKA, L. The effects of verapamil on intestinal calcium transport. *Eur. J. Pharm.* 45: 385-387, 1977.

ZANCHETTI, A. Role of calcium antagonists in systemic hypertension. *Am. J. Cardiol.* 59: 130-136, 1987.

ZANGAR, C. R.; OKITA, R. J.; Effect of calcium channel antagonists nifedipine and nicardipine on rat cytochrome P-450 2B and 3 A forms. *J. Parmacol. Exp. Therap.* 290 (3): 1436-1441, 1999.

ZARNEGAR, R.; MICHAELOPOULOS, G. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. *Cancer Res.* 49: 3314, 1989.

ZARNEGAR, R.; DeFRANCES, M. C.; KOST, D. P.; LINDROOS, P.; MICHALOPOULOS, G. K. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in

regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177: 559-565, 1991.

ZIEVE, L.; ANDERSON, W. R.; LINDBLAD, S. Effect of ageing on rat liver regeneration after 80% to 90% resection of the normal rat liver. Comparison with two-lobe and one-lobe hepatectomy. *J. Lab. Clin. Med.* 105: 331-336, 1985.

ZIMMERMAM, H.S. Serum enzyme measurement in experimental hepatotoxicity. *Israel. J. Med. Sci.* 10 (4): 328-332, 1974.

ZIVNY, P.; SIMEK, J. Effect of parenteral administration of energy substrates in different postoperation phases on the initiation and development of the liver regeneration in rats submitted to partial hepatectomy. *Physiol. Bohemoslov.* 38: 251-258, 1989.

ZSOTÉR, T. T.; CHURCH, J. Calcium antagonists pharmacodynamic effects and mechanism of action. *Drugs.* 25: 93-112, 1983.

