

VITOLDO ANTONIO KOZLOWSKI JUNIOR

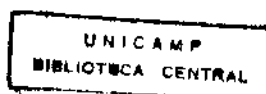
**EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES  
H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, SOBRE OS NÍVEIS DE Ca, P, Mg, Si,  
B e Sr, ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE  
EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUZIDO  
(ICP-AES), NO SORO DE RATOS  
PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADOS**

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

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba da UNICAMP, para obtenção  
do grau de Doutor em Ciências - Área de  
Farmacologia.

*Thales R. de Mattos*

**PIRACICABA  
1995**



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	K849e
V.	Ex.
TOMBO BC/	27036
PROC.	607196
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	66,11,00
DATA	20/03/96
N.º CPD	C.M.00085355-9

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOP-UNICAMP.

K849e Kozlowski Júnior, Vitoldo Antonio  
 Efeito de antagonistas de receptores H1 e H2, sobre os níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr através de espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES), no soro de ratos parcialmente hepatectomizados / Vitoldo Antonio Kozlowski Júnior. Piracicaba, S.P. : [s.n.], 1995.  
 96, f. : il.  
 Orientador : Thales Rocha de Mattos Filho  
 Tese (doutoramento) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.  
 I. Receptor de Substâncias Endógenas. 2. Testes funcionais hepáticos. 3. Espectroscopia atômica. I. Mattos Filho, Thales Rocha de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.  
 19.CDD - 612.640136

Índices para Catálogos Sistemáticos

Regeneração hepática 612.640136



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Mestrado, em sessão pública realizada em 12/12/95, considerou o candidato aprovado.

1. Thales Rocha de Mattos Filho

*Thales R. Mattos*

2. Eduardo Dias de Andrade

*Eduardo Dias de Andrade*

3. Jaime Aparecido Cury

*Jaime*

4. Maria Fernanda Georgina Giné Rosias

*Maria F. Rosias*

5. Minoru Sakate

*Minoru Sakate*

À Sra. **SOFIA KMITTA**  
(*in memoriam*)...

com respeito e admiração.

Para a **APARECIDA** e **VITOLDO NETO**,  
ofereço este fruto do meu trabalho como  
prova, também, do meu amor.

Aos meus Pais, **ALICE** e **VITOLDO**, que sempre me  
acompanharam e encorajaram, com muito amor, incentivo  
e compreensão, incontestáveis exemplos de dedicação e  
bons princípios,

...dedico este trabalho.

Ao **Prof. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO**, Mui Digno Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da FOP-UNICAMP e orientador desta tese, pelo incentivo, amizade e confiança demonstrados ao longo deste trabalho, o meu reconhecimento, respeito e gratidão.

**À Profa. Dra. MARIA FERNANDA GINÉ ROSIAS**, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo - CENA/USP, a minha especial admiração, pela sensibilidade e altruísmo científico demonstrado durante a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JOSÉ MARTINS FILHO, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo apoio ao ensino, pesquisa e extensão no meio universitário.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA (FOP-UNICAMP) através de seu digníssimo diretor, Prof. Dr. JOSÉ RANALI pela oportunidade, cordialidade e constante colaboração durante o meu convívio na pós-graduação.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa através do Prof. FERNANDO PILATTI, Coordenador do Programa Institucional de Capacitação Docente (PICD) pelo apoio e atenção que viabilizaram a realização deste trabalho.

Aos DOCENTES DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA, pela inestimável contribuição a minha formação científica.

Ao digníssimo vice-diretor da FOP-UNICAMP, Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida pela permissão no acompanhamento de inúmeras atividades no CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA E PATOLOGIA BUCODENTAL.

Ao Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY, mui digno Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas, pelo desprendimento e atenção durante minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. EDUARDO DIAS ANDRADE, pela amizade, incentivo e estímulo à minha carreira universitária.

Ao Prof. Dr. FLÁVIO RIBEIRO DOS SANTOS, por cujos exemplos, ingressei na carreira do magistério.

Ao Mestre pela ESALQ-USP, Área de Toxicologia, Sr. JOÃO CÉSAR FERST pela incalculável colaboração durante a realização deste experimento.



A toda equipe técnica da Química Analítica do CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA da UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - CENA/USP pelo cuidado, atenção e eficiência durante a fase laboratorial.

Ao cirurgião-dentista Sr. JOSÉ CARLOS DE JESUS TONIOLO, e Sra. ELIANE MELO FRANCO e ELOÁ JANNUZZI HERNANDES JORDÃO, farmacêuticas bioquímicas, pela eficiência, desprendimento e auxílio na realização da fase experimental deste trabalho.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DO ENSINO SUPERIOR (CAPES), pelo apoio a esta pesquisa.

Ao Sr. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO pela cordialidade e atenção dispensada na realização de serviços técnicos prestados.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo estímulo e colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. LUIS ANTONIO ESMERINO, biomédico, Prof. do Depto. de Ciências Farmacêuticas e Análises Clínicas da UNIMEP, pelo constante apoio e dignidade a mim demonstrados.

À Sra. MÁRCIA EURICH BELINSKY Assistente Administrativa da Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela disponibilidade e atenção a mim dispensada.

Ao Sr. MOYSÉS JOSÉ MARIA DA SILVA, pela colaboração no manuseio dos animais.

A Sras. MARIA ELISA DOS SANTOS e ANA MARIA COSSA DE ARRUDA, pela amizade e solicitude demonstrados.

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

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1. RESUMO	01
2. INTRODUÇÃO	03
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
4. PROPOSIÇÃO	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1 Animais	31
5.2 Técnica de Hepatectomia Parcial	31
5.3 Grupos experimentais	32
5.4 Administração das drogas	32
5.5 Colheita do sangue para dosagem dos elementos	32
5.6 Determinação dos níveis de cálcio, fósforo, magnésio, silício, boro e estrôncio no soro, através de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES)	33
5.6.1 Fundamentos do método ICP-AES	33
5.6.2 Equipamentos/condições de operação	33
5.6.3 Características do sistema	33
5.6.4 Reagentes e soluções padrão	34
5.6.5 Obtenção e preparo das amostras	34
5.6.6 Linhas espectrais e limites de detecção	35
5.6.7 Procedimento	37
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÕES	63
9. APÊNDICES	65
10. SUMMARY	80
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Transdução de sinal gerado por um agonista A (p.ex., histamina) via efeito fosfoinositídeo	9
Figura 2	Nível de AMPc determinado por radioimunoensaio...	14
Figura 3	Nível de GMPc determinado por radioimunoensaio...	15
Figura 4	Modelo da “colisão-acoplamento” de ativação da AC	18
Figura 5	Visão esquemática dos processos de ativação e desativação do sistema AC	19
Tabela 1	Algumas enzimas de fígado de rato...	23
Tabela 2	Concentrações (ug/ml) de alguns elementos químicos...	27
Figura 6	Gráfico do desvio padrão relativo ( $x-b$ ) versus concentração	36
Tabela 3	Recuperação dos elementos nos padrões	39
Tabela 4	Valores médios de Ca (ug/ml)...	40
Figura 7	Histograma de barras, mostrando valores de Ca...	40
Tabela 5	Valores médios de P (ug/ml)...	41
Figura 8	Histograma de barras, mostrando valores de P...	41
Tabela 6	Valores médios de Mg (ug/ml)...	42
Figura 9	Histograma de barras, mostrando valores de Mg...	42
Tabela 7	Valores médios de Si (ug/ml)...	43
Figura 10	Histograma de barras, mostrando valores de Si...	43
Tabela 8	Valores médios de B (ug/ml)...	44
Figura 11	Histograma de barras, mostrando valores de B...	44
Tabela 9	Valores médios de Sr (ug/ml)...	45
Figura 12	Histograma de barras, mostrando valores de Sr...	46
Tabela 10	Algumas alterações relacionadas com hipo- ou hipermagnessemia	52
Figura 13	Metabolismo da terfenadina	57

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ICP - AES	Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido
H	Histamina
AMPc	Adenosina mono-fosfato cíclico
Pi	Fosfatos inorgânicos
P-NMR	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
PME	Fosfomonoesters
PDE	Fosfodieters
ATP	Adenosina trifosfato
pHi	pH intracelular
GTP	Guanosina trifosfato
FIF2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
DG	1,2-diacilglicerol
IF3	Inositol 1,4,5-trifosfato
G/GTP	Sistema guanina-nucleotídeo
PKC	Proteína-quinase C
HMG-CoA	Enzima fosfo HMG coenzima A redutase fosfatase
R	Receptor
AF	Acido fosfatídico
PKG	Proteína-quinase G
Aaq	Acido araquidônico
GC	Guanilatociclase
I	Inositol
IF	Inositol-1-fosfato
FI	Fosfatidilinositol
FIF	Fosfatidilinositol-4-fosfato
IF2	Inositol-1,4-bifosfato

PE	Fosforiletanolamina
GPE	Glicerofosforiletanolamina
GPC	Glicerofosforilcolina
PG	Prostaglandina
TX	Tromboxana
Aq-	Araquidonato
TPTX	Tireoparatireoidectomia
TS	Enzima <i>Thymidylate synthetase</i>
TK	Enzima <i>Thymidine kinase</i>
CaM	Calmodulina
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
AC	Adenilatociclase ou adenilciclase
GDP	Guanosina difosfato
Me-ATP	Complexo metal-ATP
PKA	Proteína-quinase A
BNCT	Terapia de Tumores por Captura Neutrônica de Boro
ICP-MS	Espectroscopia de Massa com Plasma Induzido
PVPI	Polivinilpirrolidone Iodine
RSD	Desvio padrão relativo
D	Limite de detecção
ANOVA	Análise de Variância
<i>SD</i>	Desvio padrão
<i>SEM</i>	Erro padrão da média
<i>n</i>	Número de animais
<i>x</i>	Média
Hic	Receptores intracelulares para histamina
£	Abaixo do limite quantificável (0,020 ug/ml B)
§	Abaixo do limite quantificável (0,100 ug/ml Sr, Si)
<i>f</i>	Indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>

**1. RESUMO**

## 1. RESUMO

Ratos albinos machos foram utilizados para investigar os efeitos de antagonista específico de receptores H<sub>1</sub> periféricos, Terfenadina e receptores H<sub>2</sub>, Cimetidina sobre as concentrações dos elementos Ca, P, Mg, Si, B e Sr, através de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES), no soro destes animais durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial. Setenta e três ratos divididos em três grupos foram sacrificados respectivamente 6, 24 e 360 h após a técnica cirúrgica. Cada grupo contendo 4 subgrupos receberam doses de Terfenadina (2mg/kg/dia), Cimetidina (20mg/kg/dia), Terfenadina (2mg/kg/dia) + Cimetidina (20mg/kg/dia) e NaCl 0,9% (Controle), intraperitonealmente durante o tempo do experimento. Os resultados obtidos sugerem que os níveis de P, Mg e Sr não sofrem alterações no soro durante a regeneração hepática, com os níveis de Ca apresentando um significativo *turnover* nos grupos tratados e Si e especialmente, B tendo importantes alterações.

## **2. INTRODUÇÃO**



## 2. INTRODUÇÃO

A pesquisa voltada para a identificação do comportamento de fármacos *in vitro/in vivo* envolve substâncias que interferem com eventos fisiológicos e associados com doenças. No passado, esta pesquisa era limitada pelo conhecimento da etiologia molecular dos processos biológicos. Durante a última década, entretanto, o desenvolvimento de técnicas genéticas moleculares aliada a procedimentos complexos de doseamento de elementos/substâncias tem levado a identificação de muitas vias-chaves que regulam os processos normais biológicos e em alguns momentos tem procurado elucidar as vias celulares responsáveis pelas doenças. Em trabalho prévio, KOZLOWSKI JR & MATTOS F<sup>o</sup> (1995) avaliando o desempenho de antagonistas de receptores H1 e H2 da histamina sobre a regeneração hepática em fígado parcialmente hepatectomizado, constataram aumento da atividade da enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase, numa relação interessante com antagonista de receptor H1. Como a atividade das células na regeneração hepática é controlada por sinais externos/internos que estimulam ou inibem eventos intracelulares, mediados por mecanismos envolvendo ativação/incorporação de átomos neutros e ionizados nos processos moleculares, procurou-se avaliar os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, silício, boro e estrôncio através de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES), no soro de ratos parcialmente hepatectomizados submetidos a tratamento com antagonistas de receptores H1 e H2.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

Quando ocorre interação de fatores extracelulares com receptores de membrana na superfície da célula, sinais são transduzidos para região interna da membrana celular desencadeando respostas intracelulares que estimulam cascatas de interações moleculares adicionais envolvendo múltiplas vias intracelulares que disseminam o sinal através da célula. Estas complexas vias coordenam programas multifuncionais celulares que direcionam o comportamento celular (BRUGGE, 1993), de tal maneira que todo efeito produzido por uma substância química pode ser considerado como resultado de interações entre suas moléculas e as moléculas que constituem os tecidos, com as conseqüências dessas interações aparecendo como respostas a níveis de organização mais complexos (GIESBRECHT, 1988).

A constante revelação de novas e complexas inter-relações multifatoriais no estudo dos processos de reparação e regeneração bem como na atividade oncogênica do crescimento de células neoplásicas, não tem justificado satisfatoriamente a capacidade notavelmente alta de formação de histamina que está presente em muitos tecidos em rápido crescimento (Cf. SCHNEIDER et alii, 1993; KOZLOWSKI JR, 1991) ou no processo de reparo, tais como tecidos embrionários, fígado em regeneração, medula óssea, tecidos de feridas e de granulação e tumores malignos (DOUGLAS, 1987; BARTHOLEYNS & BOUCLIER, 1984).

A presença de histamina desempenhando efeito mitogênico foi observado por MARKS et alii (1986) que utilizando antagonistas e agonistas específicos para receptores histaminérgicos, demonstraram ser este efeito mediado por receptores H<sub>1</sub>; fato observado por TILLY et alii (1990) que confirmaram a capacidade da histamina de estimular a síntese de DNA e divisão celular, bem como promover uma resposta quimiotáctica para células malignas. Estas ações foram identificadas serem mediadas por receptores H<sub>1</sub> através da ativação da fosfolipase C, desencadeando a hidrólise de polifosfoinosítideos com conseqüente formação de vários segundo mensageiros com subsequente mobilização intracelular de íons cálcio.

Este experimento reiterou o trabalho de SAKUMA; GROSS; LEVI (1988) que demonstraram ativação de receptores H<sub>1</sub> sendo mediada pelo aumento do metabolismo fosfoinosítideo com produtos do inositol fosfato qualitativamente similares mas, quantitativamente mais elevados depois do tratamento com histamina. Esses produtos incluíam: inositol (1) fosfato, inositol (4) fosfato, inositol (1,4) difosfato, inositol (1,4,5) trifosfato. Além disso, comprovaram os resultados de TAYLOR; YOFFE; WOOLLEY (1983), que trabalhando com antagonistas de receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub> postularam que os receptores H<sub>2</sub>, quando ativados seriam os

responsáveis pelo aumento dos níveis de AMPcíclico intracelularmente, numa transdução farmacológica diferente da ativação de receptores H<sub>1</sub>.

Embora os conhecimentos sobre a bioquímica da resposta celular e a participação dos receptores histamínicos seja uma área muito abrangente e diversificada (KOZLOWSKI JR, 1991), atualmente admite-se que muitas células respondem a estímulo extracelular alterando a concentração do cálcio intracelular. Consequentemente, os níveis de cálcio tendem a ser controlados pela ação de outros mensageiros da transdução celular entre eles o sistema fosfoinosítideo (MATHEWS & VAN HOLDE, 1990), que pode ser ativado através do receptor H<sub>1</sub> com subsequente mobilização de Ca<sup>2+</sup> (NAKAHATA & HARDEN, 1987), gerando importantes alterações bioquímicas e interações com calmodulina.

O metabolismo inositídeo foi descoberto por Hokin & Hokin (Apud BERRIDGE & IRVINE, 1984) os quais apresentaram que a incorporação específica de <sup>32</sup>P em fosfolipídeos no pâncreas foi estimulada pela acetilcolina. SEYFRED & WELLS (1984) trabalhando com hepatócitos isolados de ratos e incubados com <sup>32</sup>Pi (fosfatos inorgânicos) durante tempos diferentes encontraram que membranas plasmáticas, núcleo, mitocôndria, lisossomas e microsomas apresentam taxas similares de incorporação de <sup>32</sup>P em fosfolipídeos como fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e ácido fosfático. Estes pesquisadores sugeriram que os fosfolipídeos destas organelas apresentam um rápido *turnover* com reposição de novos fosfolipídeos sintetizados no retículo endoplasmático e que a fração de membrana plasmática é capaz de incorporar <sup>32</sup>P em fosfatidilinositol 4-fosfato e fosfatidilinositol 4,5-bifosfato em taxas 5-10 e 25-50 vezes, respectivamente, mais rapidamente que qualquer das outras frações subcelulares. Estes pesquisadores confirmam ainda que embora a membrana plasmática seja o principal sítio de incorporação de <sup>32</sup>P através de fosfatidilinositol 4-fosfato e fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, uma significativa incorporação de <sup>32</sup>P em fosfatidilinositol 4-fosfato ocorre em outros sítios subcelulares, especialmente lisossomos.

Embora JOHNSON & ALBERT (1952) já tenham demonstrado um aumento com máxima incorporação de <sup>32</sup>P na fração fosfolipídica, durante regeneração hepática após hepatectomia parcial, coincidente com a máxima atividade mitótica, o desenvolvimento de novas técnicas analíticas tem permitido acompanhar com muito mais minuciosidade, detalhes sobre o comportamento do metabolismo fosfoinosítideo. Especificamente, a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (<sup>31</sup>P - NMR) tem fornecido preciosas informações sobre a concentração de compostos que contêm fósforo, tais como fosfomonoesters (PME), fosfatos inorgânicos (Pi), fosfodieters (PDE), ATP e também pH intracelular (pHi) os quais podem ser obtidos não invasivamente (CAMPBELL et alii, 1990; FARGHALI et alii, 1994).

A bem da verdade, vários experimentos após a descoberta de Hokin & Hokin em 1953, vieram demonstrar que alterações metabólicas

de alguns fosfolípídeos de membrana num processo de renovação metabólica de fosfolípídeos contendo mioinositol podiam ser relacionados com a união de diversos agonistas aos seus respectivos receptores em diferentes tecidos num mecanismo multiregulador fundamental para a transdução farmacológica a partir da membrana quando ocorre o acoplamento agonista-receptor (OLIVEIRA F<sup>o</sup>; VALLE; MINETTI, 1988).

Consequentemente, quando a histamina interage com receptor H<sub>1</sub> (Fig. 1) estimula-se uma proteína G a se ligar a GTP (justamente como ocorre durante a ativação da adenilatociclase). Esta proteína G por sua vez ativa uma enzima fosfodiesterase ligada a membrana chamada fosfolipase C, a qual cliva um específico lipídeo de membrana da família fosfoinositídeo denominado fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (FIF<sub>2</sub>) produzindo *sn*-1,2-diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IF<sub>3</sub>). Embora o papel do segundo mensageiro inositol trifosfato seja principalmente estimular a liberação de cálcio dos reservatórios intracelulares no retículo endoplasmático, ele também pode aumentar o influxo transmembrana de íons cálcio (RENGASAMY & FEINBERG, 1988). Isto tem vários efeitos sobre o metabolismo intracelular, estando associado a importantes fenômenos fisiológicos relacionados ao acoplamento estímulo-resposta desencadeado por proteínas ligadas ao sistema guanina-nucleotídeo G/GTP (BLACKMORE et alii, 1985).

Desta maneira o reservatório imediato de Ca<sup>2+</sup> é *intracelular*, uma vez que pode ser mobilizado a partir do retículo endoplasmático para o citosol em questão de segundos após o estímulo. Somente após a sua liberação ocorre influxo de Ca<sup>2+</sup> a partir do compartimento extracelular procurando manter a resposta por tempo mais prolongado e reabastecendo o estoque previamente depletado do retículo endoplasmático (OLIVEIRA F<sup>o</sup>; VALLE; MINETTI, 1988). O aumento da concentração no citosol de cálcio contribui inclusive para o desempenho do papel do outro segundo mensageiro o diacilglicerol, que atua no processo de ativação da proteína-quinase C (PK-C) quando ligada a membrana. Esta enzima necessita para sua atividade *cálcio*, um *fosfolípídeo* (especialmente, fosfatidilserina) e DG (BAZZI & NELSESTUEN, 1990). O diacilglicerol é capaz de estimular a atividade enzimática aumentando a afinidade da PK-C por íons cálcio. A enzima fosforila específicos resíduos de serina e treonina em outras proteínas alvo que aparentemente estão muito envolvidas com secreção e proliferação celulares como receptor insulínico, receptor β-adrenérgico, sistema de transporte de glicose, citocromo P-450, HMG-CoA redutase, tirosina hidroxilase (MATHEWS & VAN HOLDE, 1990).

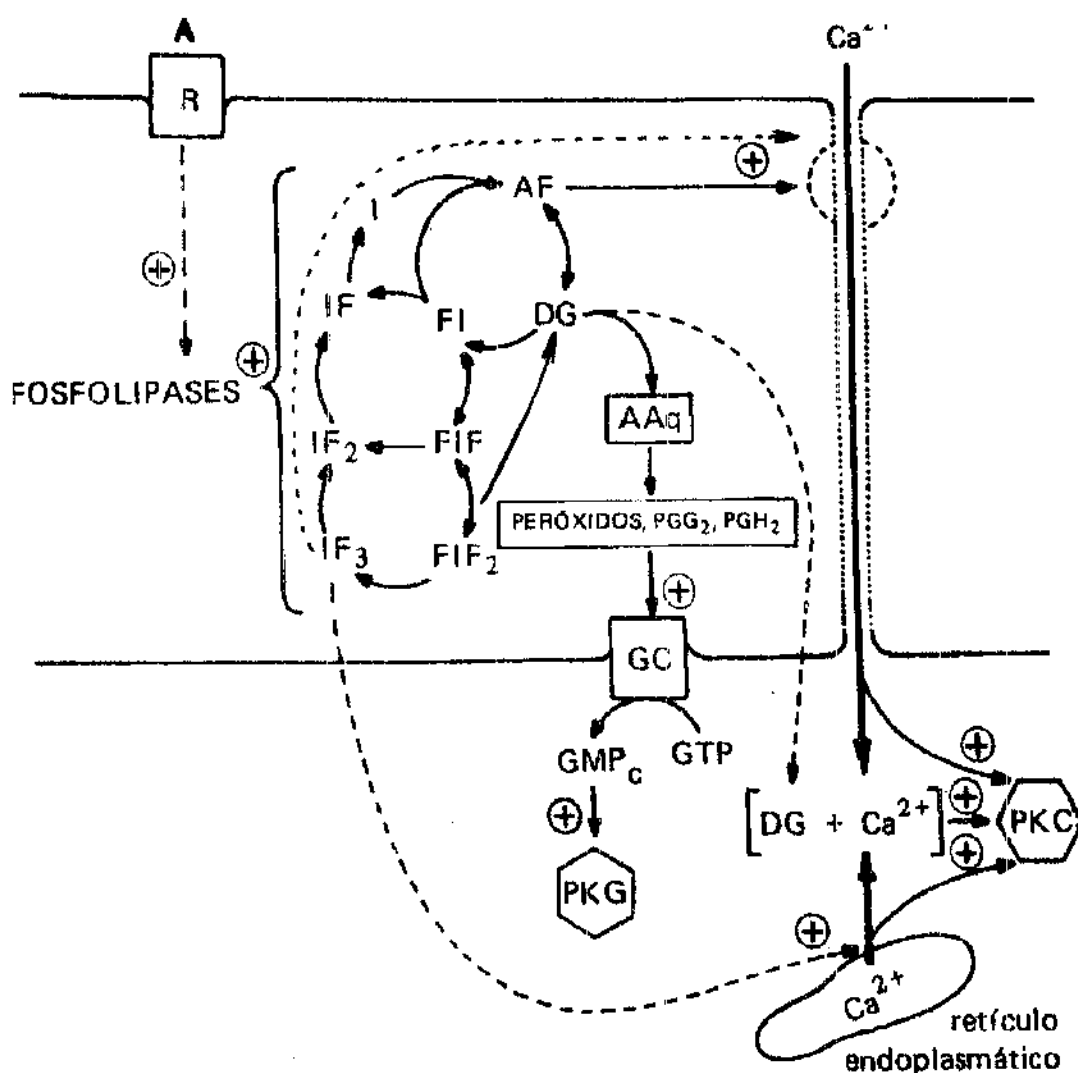


Fig. 1. Transdução de sinal gerado por um agonista A (p. ex., histamina) via efeito fosfoinositídeo. Após o acoplamento com o agonista, o receptor (R) ativa fosfolipases, as quais aceleram grandemente a renovação do ciclo fosfoinositídeo. O ácido fosfatídico (AF) parece ter ação ionófora de  $\text{Ca}^{2+}$ . O inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{IF}_3$ ) promove liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático. O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  tem a propriedade de ativar a proteína-quinase C (PKC). O diacilglicerol (DG), além de ativar a proteína-quinase G (PKG) - via geração de ácido araquidônico (AAq) e estimulação da guanilatociclase (GC) - pode, juntamente com o cálcio, estimular adicionalmente a PKC. No ciclo fosfoinositídeo, I = inositol; IF = inositol-1-fosfato; FI = fosfatidilinositol; FIF = fosfatidilinositol-4-fosfato;  $\text{IF}_2$  = inositol-1,4-bifosfato;  $\text{FIF}_2$  = fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (Mod. OLIVEIRA Fº; VALLE; MINETTI 1988).

A PK-C pode ser ativada por fármacos que estimulam a formação de tumores em modelos experimentais (COUTURIER; BAZGAR; CASTAGNA, 1984; MIYAKE et alii, 1984). Em adição a estes efeitos estas substâncias químicas também são capazes de promover crescimento e diferenciação em muitas células humanas de maneira complexa, estimulando certas linhagens de células e inibindo outras (COOPER; BRAUNWALD;

KUO, 1982). Interessantemente os ésteres de forbol (os quais apresentam estrutura química semelhante ao DG) ativam proteína-quinase C independentemente do diacilglicerol. Num encontro consistente com a hipótese que ativação da proteína-quinase C (dependente de íons cálcio) é parte do processo de controle normal de crescimento e diferenciação celular que apresenta-se perturbada na carcinogênese (COUTURIER; BAZGAR; CASTAGNA, 1984). A importância da proteína-quinase C na diferenciação celular pode ser demonstrada, por exemplo, pela observação que compostos que bloqueiam a atividade desta enzima inibem a habilidade de ésteres de forbol a induzir diferenciação de células leucêmicas tipo HL-60 humanas, cuja indução é acompanhada de alterações morfológicas e bioquímicas dentro do núcleo, incluindo inibição da síntese de DNA, aumento na síntese de genes específicos (*c-fos*; *c-fms*, *c-src*) e decréscimo de outros (*c-myc*; *c-myb*) (KRAFT; APPLING; BERKOW, 1987). Além disso, TAGUCHI et alii (1982) examinando o efeito da aplicação de éster de forbol sobre a atividade da histidina descarboxilase (a enzima-chave para produção de histamina), na derme de animais deficientes geneticamente em mastócitos/basófilos, encontraram que a enzima é significativamente ativada numa caracterização da produção de histamina a partir de células não-mastocitárias.

CHAMBON; MOULINOX; FONTAINE (1977 I) estudando a produção de histamina após hepatectomia parcial, constataram um rápido aumento no sangue e no fígado em regeneração; comprovado em uma série de outros estudos, mesmo na presença de inibidores enzimáticos (MOULINOX; FONTAINE; CHAMBON 1977; CHAMBON; MOULINOX; FONTAINE 1977 II).

Estas informações aliadas as observações de que cimetidina, um antagonista de receptor histamínico H<sub>2</sub>, teria efeito inibitório sobre a regeneração hepática (KANASHIMA et alii, 1983), confirmado também para ranitidina, outro antagonista H<sub>2</sub> (KANASHIMA; NAGASUE; SAKATO 1985), abriram uma discussão sobre o(s) papel (is) da histamina e dos antagonistas de receptores H<sub>2</sub>, durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial.

Os resultados obtidos por Kanashima foram contestados por LEE et alii (1986) que concluíram através de experimento muito bem delineado que os antagonistas de receptores H<sub>2</sub> não são capazes de inibir o fígado de ratos em regeneração após 2/3 de hepatectomia. Estes últimos resultados foram confirmados quase 10 (dez) anos depois por KOZLOWSKI JR & MATTOS F<sup>o</sup> (1995) que demonstraram o efeito reduzido senão inexistente, para cimetidina durante o curso da regeneração hepática. Entretanto, estes autores em contrapartida, levantaram outra questão agora direcionada sobre os efeitos do antagonista de receptor H<sub>1</sub>, terfenadina sobre a indução da enzima  $\gamma$ -glutamilttransferase. Como não existem relatos sobre a atividade de antagonistas de receptores H<sub>1</sub> durante a regeneração hepática, o centro da discussão retorna para o comportamento da histamina, uma vez que a sincronização da resposta na regeneração hepática depois da hepatectomia

parcial se constitui num processo restrito e regulado de crescimento celular controlado por fatores (entre eles a histamina) que são responsáveis pela determinação e manutenção da massa hepática no organismo intacto. A ativação destes mecanismos reguladores gera sinais que induzem os hepatócitos a entrarem no ciclo celular, progredindo para a síntese de DNA e replicação, mas somente suficientes para restaurar a massa do órgão.

As características da regeneração hepática depois da hepatectomia parcial em ratos são bem conhecidas e tem sido objeto de muitos estudos detalhados desde que HIGGINS & ANDERSON (1931) descreveram a técnica da resecção parcial com a remoção de 70% do fígado em modelo experimental. A síntese de DNA é bem sincronizada e não se inicia até 12 horas depois da operação, apresentando um pico as 24 horas com subsequente/simultâneo valor mais alto para o índice mitótico. O fígado regenerando duplica de peso entre 48 e 72 horas depois da operação e o crescimento cessa em aproximadamente 7 a 10 dias quando o órgão atinge o valor original do fígado intacto ( $\pm 10\%$ ) (FAUSTO & MEAD, 1989).

Recentemente, FARGHALI et alii (1994) monitorando a regeneração hepática após hepatectomia parcial, através de ressonância magnética nuclear ( $^{31}\text{P}$  - NMR), observaram redução do pH e do ATP intracelularmente, associado com um aumento no fosfato inorgânico e altos níveis de fosforiletanolamina (PE). Além disso, a espectroscopia  $^{31}\text{P}$  - NMR também demonstrou um aumento em fosfomonoesters e um declínio de fosfodieters (PDE) durante a regeneração hepática. Consequentemente, as mudanças observadas estão relacionadas ao *turnover* de fosfolipídeos de membrana com um aumento dos precursores (PE) e uma redução nos produtos da lise, como glicerofosforiletanolamina (GPE) e glicerofosforilcolina (GPC) durante rápido crescimento celular. Estes autores, confirmando os resultados obtidos por CAMPBELL et alii (1990), ressaltam ainda, que estas mudanças nos fosfolipídeos de membranas, refletem o processo anabólico que ocorre durante a regeneração hepática, com níveis de fosfomonoesters aumentados no fígado regenerando e tumores hepáticos (BUCKMAN; ERICKSON; ROSS; 1987), com produtos do catabolismo fosfolipídico (PDE) reduzidos em contrapartida, no fígado durante a regeneração hepática.

Como células proliferando também exibem altos níveis de atividade da PK-C envolvendo translocação intracelular do citosol para a membrana, funcionando como receptor para o controle de crescimento numa correlação direta inclusive com agentes promotores de carcinogênese (MIYAKE et alii, 1984; HOUWELING, VAARTJES, Van GOLDE, 1989), pesquisadores estudando o comportamento da PK-C na regeneração hepática (OKAMOTO et alii, 1988) observaram que a enzima é ativada e liga-se a membrana no fígado em regeneração numa considerável ativação desta enzima primordialmente e inversamente a síntese de DNA.

Como a PK-C ativada fosforila muitas proteínas intracelulares que regulam a proliferação celular, HOUWELING; VAARTJES; Van GOLDE (1989) também avaliaram a atividade da enzima ao tempo de 22h



após a cirurgia, quando a síntese de DNA é ótima no fígado hepatectomizado. Estes pesquisadores não detectaram diferença significativa entre a quantidade total de atividade da PK-C em hepatócitos isolados depois de hepatectomia parcial e controles; entretanto constataram naquele tempo uma modificação na distribuição subcelular da atividade enzimática com significativa ativação da fração celular particulada ligada a membrana. Como progressivamente e inversamente ao aumento da síntese de DNA os níveis de PK-C ligados a membrana diminuem, estas interessantes observações sugerem que de alguma maneira a medida que aumenta o índice mitótico ocorre inibição da PK-C ou talvez, diminuição na habilidade dos hepatócitos a responderem a enzima num processo de dessensibilização celular. Isto pode ser sugerido, uma vez que HOUWELING; VAARTJES; Van GOLDE (1989) fazem referências a outras pesquisas que demonstraram que além da PK-C promover a transição de hepatócitos da fase G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub> inicialmente depois da hepatectomia parcial, uma ação anti-proliferativa da enzima em fases pós G<sub>1</sub> tem sido documentadas em várias linhagens de células. Isto reitera o trabalho de COOPER; BRAUNWALD; KUO (1982) que observaram inibição do crescimento celular em células tratadas com éster de forbol e as pesquisas de HOUWELING; VAARTJES; Van GOLDE (1989) e TSUKAMOTO & KOJO (1987 I) que observaram dessensibilização e inibição da síntese de DNA em fígado parcialmente hepatectomizado quando tratados com ésteres de forbol.

O fato de muitos processos metabólicos conhecidos serem controlados pelo fluxo dinâmico de cálcio e pela fosforilação de proteínas específicas, fazem com que o sistema fosfoinosítídeo tenha grande versatilidade como mecanismo controlador inclusive na regulação hormonal do metabolismo hepático (WILLIAMSON et alii, 1985). A possibilidade da utilização do DG ou IF<sub>3</sub>, ou ambos como resultado de um único estímulo extracelular aumenta esta versatilidade, constituindo a exploração do controle de sistemas complexos em uma das mais ativas áreas da pesquisa contemporânea. Tanto isto é verdade que no tempo de 15 min da regeneração hepática ocorre aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  e TXB<sub>2</sub> no fígado hepatectomizado (HIYAMA et alii, 1981) sendo que a utilização de inibidores da produção de prostaglandinas e tromboxanas previne em grande proporção a atividade mitótica (RIXON & WHITFIELD, 1982). A complexidade desta observação é verificada quando observamos que o precursor da formação destes autacóides é o araquidonato (Aq-), que também pode ser mobilizado pela histamina através da ativação de receptores H<sub>1</sub> (RESINK et alii, 1987). Como ele existe na membrana plasmática e pode ser retirado, na forma de Aq-não esterificado, da posição 2 dos fosfolípidos contendo colina, etanolamina, serina ou inositol, por três maneiras:

1. pela ação de uma fosfolipase (fosfolipase A<sub>2</sub>);
2. por dupla ação enzimática (inicialmente uma enzima fosfodiesterase atua sobre o fosfatidilinositol gerando DG e posteriormente uma lipase atua sobre o diacilglicerol liberando Aq-);

3. por tríplex ação enzimática (no primeiro estágio, forma-se diacilglicerol; este é fosforilado originando ácido fosfatídico, o qual por sua vez sofre ação de uma fosfolipase A2 específica que gera Aq-); o estágio limitante de todo processo que se inicia com a liberação de Aq- e termina com a resposta final é a clivagem deste ácido graxo insaturado da posição 2 dos fosfolipídeos, uma vez que as enzimas fosfolipase A2, DG-lipase e fosfolipase A2 específica para ácido fosfatídico são todas  $Ca^{2+}$  dependentes (OLIVEIRA F<sup>o</sup>; VALLE; MINETTI, 1988).

Consequentemente, vários pesquisadores tem sugerido que a entrada de cálcio na célula hepática se constitui num evento essencial para a regeneração hepática. Por exemplo, NAKATA et alii (1987) reportaram que prolongada condição hipocalcêmica induzida por tireoparatireoidectomia (TPTX) provoca significativa inibição da atividade de *thymidylate synthetase*(TS) e *thymidine kinase*(TK), com concomitante decréscimo no fígado em regeneração do conteúdo de DNA. A diminuição da atividade da TK em ratos submetidos a TPTX, 72 h depois da hepatectomia parcial e TS 24 h, foi recuperada por suplementação de cálcio (independentemente do paratohormônio) demonstrando segundo os pesquisadores que atividade enzimática de TK e TS em fígado em regeneração é regulada por  $Ca^{2+}$ . Paralelamente, TSUKAMOTO & KOJO (1987 II) trabalhando com bloqueadores de canais de cálcio e inibidor de calmodulina também verificaram redução do DNA e diminuição na atividade enzimática da TK e TS, 24 h após hepatectomia parcial. Estes pesquisadores reforçaram a idéia de que pelo menos em parte a ação do cálcio pode ser mediada através de uma versátil proteína denominada de calmodulina, especialmente por que MacMANUS et alii (1981) demonstraram aumento dos níveis de calmodulina 6-14 h da regeneração hepática e que esta proteína causa proliferação de hepatócitos através da atividade de complexos Ca-calmodulina (JONES et alii, 1982).

Embora a descoberta da calmodulina (CaM), o mais significativo e universal modulador de  $Ca^{2+}$  intracelular, tenha permitido a revisão dos dados cinéticos das principais enzimas Ca-dependentes, é preciso salientar que esta proteína solúvel, termoestável, de menor peso molecular, embora apresente-se amplamente distribuída, tem concentração fisiológica baixa e não é fator limitante para toda e qualquer atividade a ela relacionada, fazendo parte de um processo integrado com outros mensageiros intracelulares (MIZUTA, 1988). Por exemplo, enquanto a calmodulina exerce importante papel na regulação dos processos de polimerização e despolimerização das tubulinas que formam os microtúbulos, numa coincidência do local de formação de microtúbulos com a concentração da proteína durante a mitose de uma célula,  $Mg^{2+}$  é requerido para a reunião dos microtúbulos e para estabilidade das tubulinas (CORREIA; BATY; WILLIAMS JR 1987); além disso a calmodulina é capaz de promover a formação de AMPc via adenilatociclase bem como a sua destruição por fosfodiesterase, com a diferença que a CaM pode ativar uma classe de fosfodiesterase com maior

afinidade pelo GMPc que pelo AMPc, assim, o fator determinante seria a proporção AMPc/GMPc intracelularmente (MIZUTA, 1988).

KOIDE et alii (1978) estudando a concentração tecidual e a distribuição imunocitoquímica do AMPc e GMPc durante a regeneração hepática verificaram que os níveis de AMPc sofrem aumento 12 h depois da hepatectomia parcial atingindo valores máximos as 14 h declinando progressivamente (Fig.2).

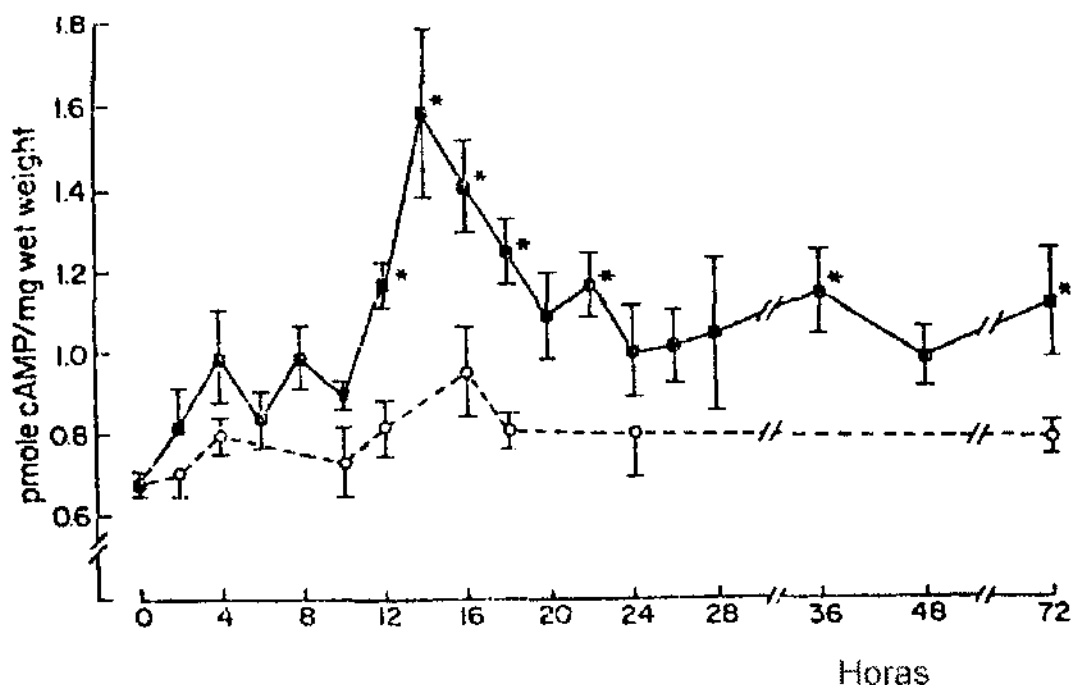


Fig. 2. Nível de AMPc determinado por radioimunoensaio em fígado de ratos (peso úmido/wet weight) submetidos a hepatectomia parcial ■—■ e ○—○controles. Asteriscos indicam valores significativamente elevados ( $p < 0.05$ ) dos controles (Segundo KOIDE et alii, 1978).

Segundo estes pesquisadores, a imunofluorescência específica para AMPc, pré-operatoriamente, foi localizada nos sinusóides hepáticos, com intensidade de AMPc aumentando paralelamente com os níveis teciduais mas sem alterar a localização intracelular. Em contrapartida ao AMPc, nenhuma mudança na concentração tecidual total de GMPc ocorreu durante a regeneração hepática (Fig.3), mas a localização intracelular do GMPc foi alterada. Pré-operatoriamente, GMPc foi observado no plasma, membranas nucleares e dentro do núcleo. Oito horas depois da hepatectomia parcial um aumento de GMPc na membrana plasmática foi observado seguindo-se as 12 h com aumento detectado por imunofluorescência nas membranas nucleares e nos elementos intranucleares. Estes pesquisadores estabeleceram também uma correlação direta entre GMPc e atividade total da guanilatociclase ensaiada em frações subcelulares determinando uma elevação de 44% as 8 h até um pico de 280% as 18 h. Quando atividade de guanilatociclase de altamente purificada preparações nucleares foi examinada, 62% ( $p < 0.01$ ) de aumento na atividade foi notada as 12 h com nenhum aumento sendo observado as 8 h. Consequentemente estes estudiosos demonstraram a importância da compartimentali-

zação dos nucleotídeos na regulação do crescimento especialmente porque embora os níveis de GMPc não sejam alterados a sua distribuição intracelular bem como da guanilatociclase são sequencialmente modificados, desempenhando conjuntamente AMPc e GMPc um importante papel na regulação da proliferação de hepatócitos.

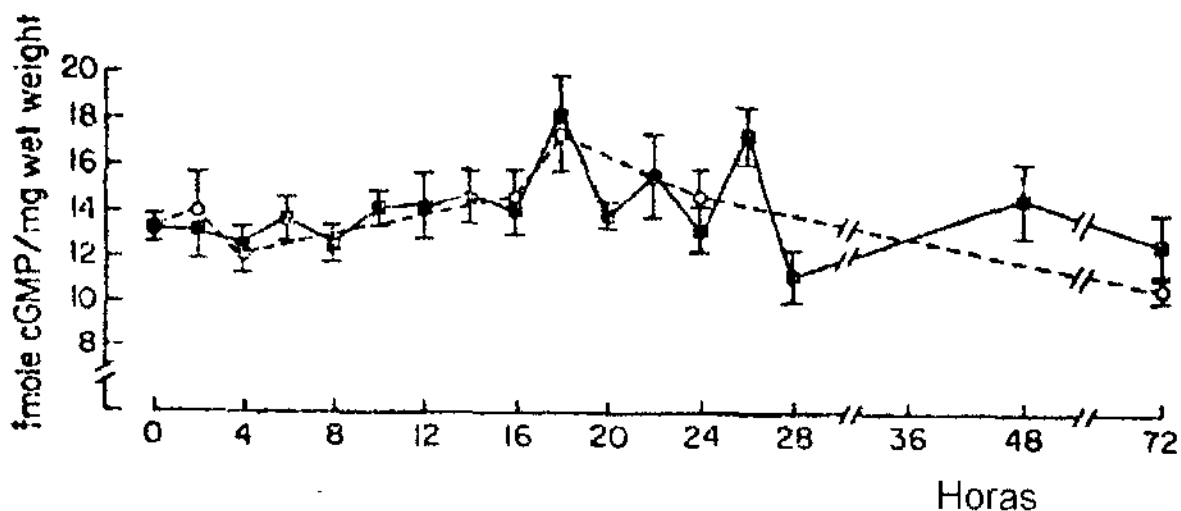


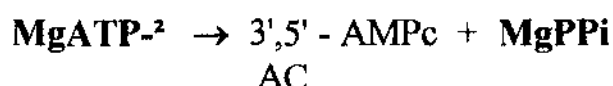
Fig. 3. Nível de GMPc determinado por radioimunoensaio em fígado de ratos (peso úmido/wet weight) submetidos a hepatectomia parcial ■—■ e ○—○controles (Segundo KOIDE et alii, 1978).

O nucleotídeo 3',5'-AMPc é um mediador termolábil que atua intracelularmente como segundo mensageiro ativando proteína-quinases que catalisam a transferência de grupamentos fosfato do ATP para resíduos específicos serina ou treonina de algumas proteínas da célula-alvo sendo formado pela atividade da adenilatociclase ou adenilciclase (AC), uma ATP-pirofosfatolise (EC 4.6.1.1), enzima associada a membrana que tem a capacidade de deslocar-se na bicamada lipídica e interagir com outras proteínas. A AC contém sítios ligantes de cátions (cálcio, estrôncio, etc), calmodulina (CaM) e etc, e a sua atividade pode ser aumentada por  $Mg^{2+}$  e inibida por concentrações elevadas de cátions ( $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ). Como ativação de receptores H2 está envolvida com aumento dos níveis de AMPc, a ativação da AC pelo complexo agonista-receptor envolve a difusão lateral da enzima até colisão com o complexo (*teoria da colisão para ativação da AC*) uma vez que a enzima é constituída fundamentalmente por dois componentes fisicamente separáveis: uma unidade reguladora denominada N e uma unidade catalítica conhecida como C. As figuras 4 e 5 mostram aspectos do modelo da "colisão-acoplamento" da ativação da AC, a partir de dados obtidos em membranas de hepatócitos.

Inicialmente o agonista altera a conformação do receptor, expondo um sítio para união com a proteína N (Fig.4.1), a difusão na bicamada leva o complexo A-R (agonista-receptor) a unir-se com N, e isto expõe um sítio para a união desta última com o nucleotídeo guanínico GTP (guanosina trifosfato). O GTP desloca o nucleotídeo guanínico inibidor da adenilciclase o GDP (guanosina difosfato); isto altera a conformação de N, fazendo com que

se dissocie do receptor ativado expondo um sítio para união com AC (Fig.4.2). A difusão na bicamada leva a proteína N a unir-se com a AC, ativando esta última pra produzir AMPc (Fig.4.3). A hidrólise do GTP pela proteína N acarreta retorno da conformação original de N; a Ac se dissocia e volta a estar inativa (Fig.4.4). A ativação da ciclase se repete ciclicamente, até que o agonista se dissocie e o receptor retorne à conformação de repouso (Fig.4.5).

Consequentemente, em repouso (sem agonista), o receptor, o componente regulatório N e a unidade catalítica C estão fisicamente separados (Fig.5.1). Durante a cinética da atividade da AC na presença de agonista, o complexo A-R ativa o componente N aumentando a afinidade deste pelo  $Mg^{2+}$ , desta maneira a ativação do nucleotídeo guanina decorrente da ativação do componente N é dependente e regulada por  $Mg^{2+}$ . Assim, o complexo A-R ao interagir com a subunidade  $\beta,\gamma$  do componente N aumenta a sua afinidade pelo  $Mg^{2+}$ , acarretando dissociação facilitada da subunidade  $\alpha$ . Esta por sua vez, troca GDP por GTP (propriedade GTPásica) e ativa o componente C (Fig.5.2). Embora não se conheçam em pormenores os componentes de C, é plausível que o contato com  $\alpha$  libere uma subunidade catalítica, ciclizante, previamente reprimida (Fig.5.3). Esta subunidade hipotética de C, agora ativada, converte um complexo metal-ATP (MeATP) no nucleotídeo cíclico AMPc. Os cátions  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  são estimulantes da atividade da AC, tanto que os complexos  $Mg-ATP^{-2}$  e  $Mn-ATP^{-2}$  podem ser substratos para a reação enzimática, com a AC catalizando a formação do AMPc e pirofosfato ( $Mg-PPi$ ) a partir do  $MgATP^{-2}$  segundo a reação



(VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI 1988).

No último esquema (Fig.5.4), mostra-se que a saída do agonista de seu sítio receptor reverte as afinidades entre os diversos componentes, fazendo com que o sistema reassuma sua posição de repouso. Embora no desenho o receptor esteja representado interagindo apenas com a subunidade  $\beta$ , as interações com  $\alpha$  ou mesmo com  $\gamma$  não são excluídas.

A expressão da atividade AC requer a presença de cátions divalentes e varia de tecido para tecido. No cérebro, por exemplo, o cálcio é fundamentalmente estimulatório e o tratamento com EGTA (quelante) inibe a atividade da AC que pode ser subsequentemente restaurada por reposição de  $Ca^{2+}$  ou adição de  $Sr^{2+}$  (VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI 1988). Na realidade é necessária a presença de  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  para a AC isolada exibir atividade máxima. O  $Mg^{2+}$  é o cátion fisiológico, não obstante sob certas condições experimentais a AC se ative em presença de  $Mn^{2+}$  apenas. A concentração de  $Mg^{2+}$  necessária para a AC exibir atividade máxima é de 5 mM em presença de 1 mM de ATP, exercendo o complexo  $Mg^{2+} - ATP$  papel

regulador sobre a enzima. O  $\text{Ca}^{2+}$  não substitui os cátions  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , e pode inibir, por competição, a enzima em presença de  $\text{Mg}^{2+}$  com redução da  $V_{\text{máx}}$ . A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  que determina inibição máxima é da ordem de 10 mM na presença de concentrações milimolares de  $\text{Mg}^{2+}$ . É importante ressaltar entretanto que esta concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é muito superior à concentração fisiológica, e por conseguinte a inibição por excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  tem pequeno significado fisiológico. Entretanto, levando em consideração as peculiaridades próprias para cada tecido a AC tanto pode ser ativada como inibida frente a concentrações de cálcio/calmodulina (CaM) dependente e o influxo de cálcio mediado por agonistas podem ativar a AC e elevar o nível de AMPc intracelular. O cálcio elevado no citosol pode também ativar a fosfodiesterase dependente de CaM, a qual ao hidrolisar o AMPc, reverte seu nível à condição basal, regulando o nível de AMPc, através de modelo complexo e coordenado.

Como vimos na p.14 além do AMPc a 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc) também participa no processo de regeneração hepática após hepatectomia parcial. A atividade da guanilatociclase (EC 4.6.1.2) ou GTP-pirofosfatolise (GC) responsável pela formação do GMPc, pode ser detectada tanto na fração solúvel quanto na fração particulada de diversos tecidos. Segundo VALLE; OLIVEIRA F°; MINETTI (1988) a localização topográfica celular da GC é de grande importância, uma vez que as características da atividade na fração particulada diferem daquela encontrada na fração solúvel, com respeito a cinética com o complexo  $\text{Me}^{2+}$  - substrato, peso molecular aparente, antigenicidade, sensibilidade a metal ativador, inibição por metal livre, presença de sítio ativado por metal, inibição ou ativação por nucleotídeos e outros fármacos etc, caracterizando desta maneira a existência de formas distintas de GC. Após o nascimento, de modo geral, a atividade enzimática solúvel aumenta e a particulada diminui, até estabelecer-se o padrão do animal adulto. Contrariamente, aumenta a atividade particulada e diminui a solúvel no hepatoma e no fígado fetal em regeneração. KOIDE et alii (1978) demonstraram que no tempo de 12 horas após hepatectomia parcial em ratos, a atividade da fração solúvel da guanilatociclase permanece igual ou até se reduz, enquanto que a atividade da fração particulada aumenta sensivelmente (cf. p.14).

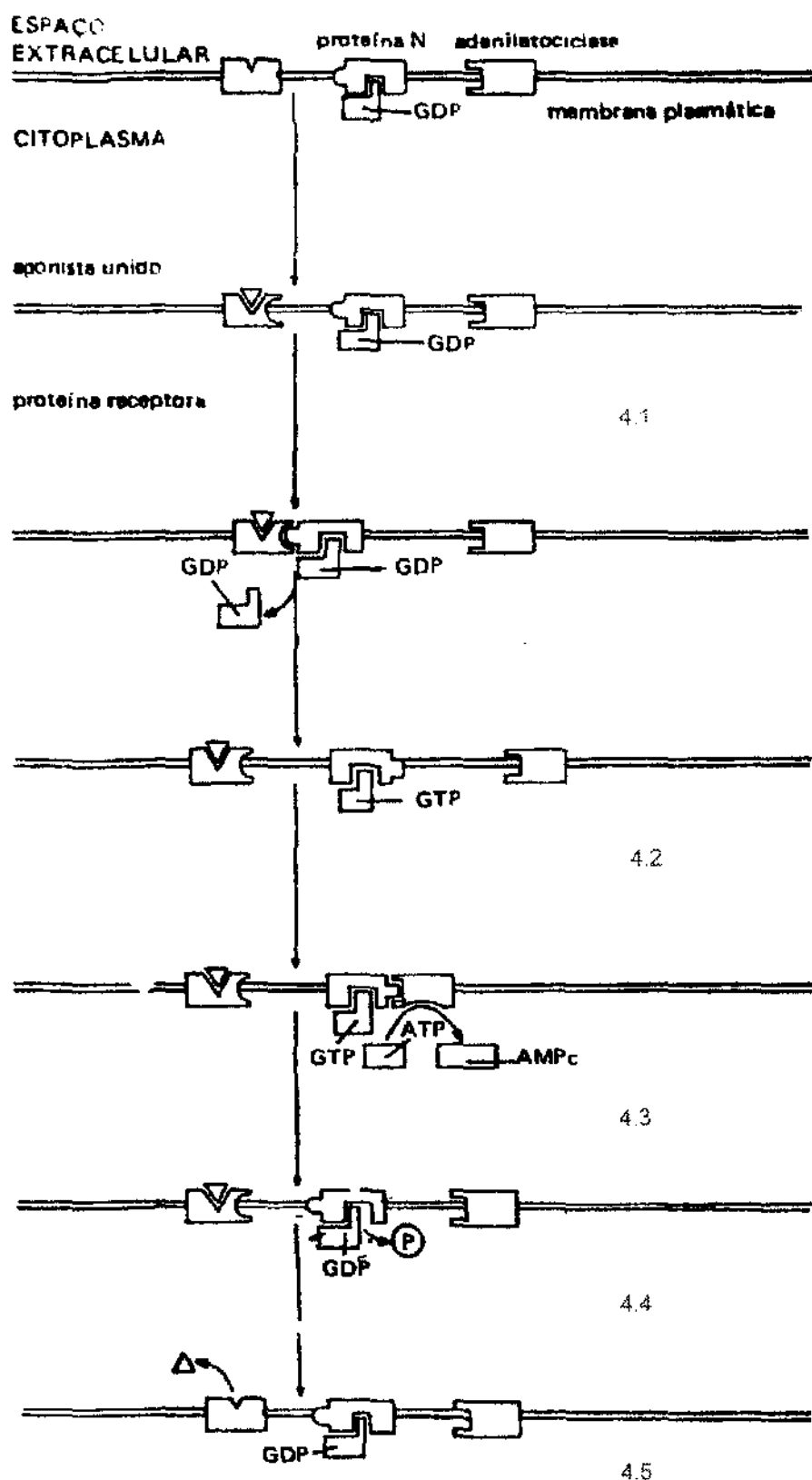


Fig. 4. Modelo da "colisão-acoplamento" da ativação da AC. Apesar deste modelo apresentar proteínas receptoras, moléculas de AC (unidade C) e proteínas N difundindo-se todas independentemente na membrana plasmática e interagindo apenas após união do agonista (H) ao receptor, é também possível que a ciclase e o componente N estejam permanentemente associados (Mod. VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI 1988).

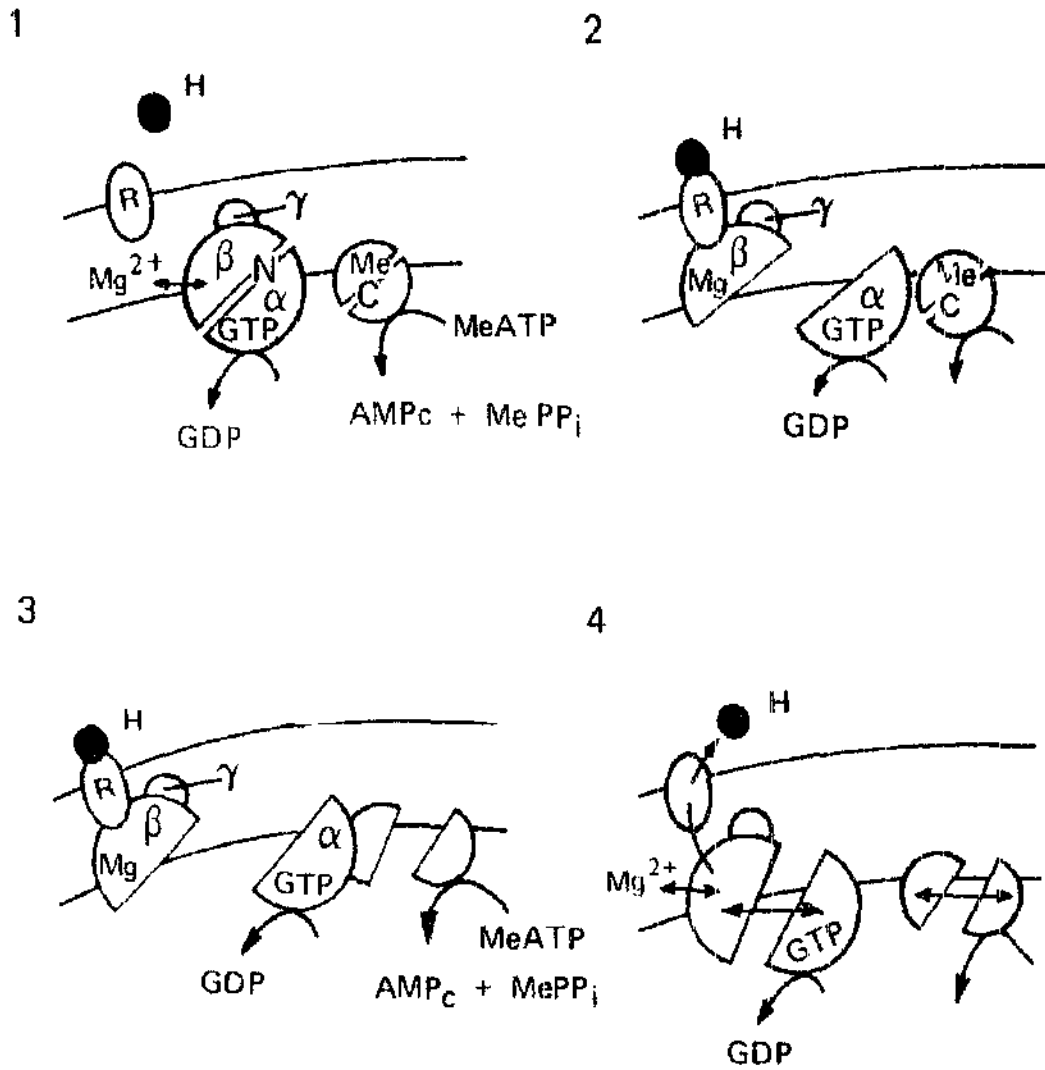
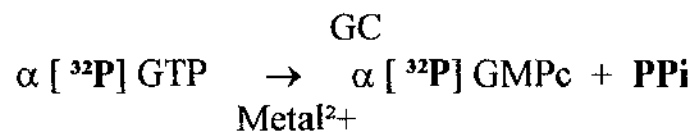


Fig. 5. Visão esquemática dos processos de ativação e desativação do sistema AC (VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI 1988).

A GC, como outras enzimas que utilizam ATP, exige cátion divalente na forma de complexo  $\text{Metal}^{2+} - \text{GTP}$  para sua atividade. O  $\text{Mn}^{2+}$  mostra-se aparentemente mais adequado que o  $\text{Mg}^{2+}$  para o ensaio da enzima *in vitro*, de diversos tecidos. Nas frações particuladas, a GC exige excesso de  $\text{Metal}^{2+}$  para manifestar sua atividade. Em geral, a necessidade é igual ou maior que a das formas solúveis. A importância de  $\text{Mn}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  como ativadores pode ser entendida na conversão do GTP em GMPc segundo a seguinte reação:



(VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI 1988).



Enzimas que contem um sítio ativador para metal apresentam cinética complexa, devido à competição iônica pelo sítio ligante. A necessidade de  $Mn^{2+}$  em concentrações maiores que as fisiológicas faz com que se descarte este cátion como o metal fisiologicamente necessário à atividade enzimática; não obstante, o  $Ca^{2+}$  e o  $Mg^{2+}$  suportam apenas parcialmente a enzima, ou seja, as atividade enzimática na presença destes cátions nunca chega àquela obtida em presença de concentrações ótimas de  $Mn^{2+}$ . Segundo VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI (1988) a guanilatociclase solúvel também forma AMPcíclico a partir de ATP. Esta reação ocorre praticamente apenas na presença de  $Mn^{2+}$  e de fármaco estimulante, portanto, em condições não-fisiológicas. Atualmente, considera-se que o  $Mg^{2+}$  em concentrações milimolares, por si próprio altera as características da enzima, tornando-a parcialmente ativa. Desta forma, é o  $Mg^{2+}$  (e não o  $Mn^{2+}$ ) o cátion divalente utilizado pela GC *in vivo*. Entretanto, em muitas células a elevação do teor de GMPc por intermédio de fármacos que atuam através de receptores não ocorre na ausência de  $Ca^{2+}$  o que sugere que a atividade da GC é cálcio e calmodulina dependente. A ineficácia de muitos fármacos que atuam através de receptores de membrana em estimular a GC após ruptura celular enquanto há geração de GMPc em preparações de células íntegras, indica que eles atuam por mecanismos indiretos com o cálcio desempenhando importante função mas, ainda não compreendida para a expressão da GC. O envolvimento deste cátion com a resposta farmacológica e elevação do GMPc é observado em vários modelos experimentais e frente a diferentes agonistas, como histamina através de receptores H1 (cf. VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI 1988). Como resposta ao efeito fosfoinositídeo desencadeado pela ativação do receptor, a mobilização de  $Ca^{2+}$  está invariavelmente envolvida, com ácido araquidônico atuando como regulador dos níveis intracelulares do nucleotídeo cíclico (cf. Fig.1).

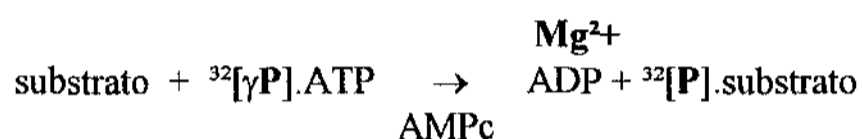
O ácido araquidônico (AAq) isoladamente, seus derivados endoperóxidos (PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>) e tromboxanas (TX) estimulam a GC de plaquetas, células do baço, útero, fígado, coração, músculo liso etc, enquanto as prostaglandinas E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> são ineficazes. O efeito exercido pelo AAq se manifesta pelo aumento de  $V_{máx}$  sem interferência na necessidade do complexo GTP- $Me^{2+}$  pela enzima, indicando interação não cooperativa entre molécula de ácido graxo e sítio catalítico. A maior estimulação pelo AAq ocorre em condições que se assemelham às fisiológicas, isto é, presença de  $Mg^{2+}$  e baixa concentração de GTP. A ativação por ácidos graxos não mostra características de especificidade, mas a ação de vários fármacos que elevam a GMPc intracelular está correlacionada a participação de ácidos graxos como ativadores da GC, num envolvimento direto de fosfolípídeos através do efeito fosfoinositídeo.

Consequentemente, a ação integrada de diversos segundos mensageiros como AMPc, diacilglicerol, GMPc produzidos pela ativação de receptores histamínicos acaba gerando numa correlação complexa em diferentes locais e momentos, a ativação de proteína-quinases nucleotídeo-

dependentes que promovem reações de fosforilação e desfosforilação regulando inter/multidisciplinarmente diversos processos celulares.

Em função do estado de fosforilação de uma proteína estar na dependência da atividade destas quinases de proteínas, denominadas *fosfoproteína-fosfatases*, dotadas de função dual (capacidade de incorporar ou retirar radicais fosfato de substratos protéicos), estas proteína-quinases (E.C. 2.7.1.37) podem ser classificadas de acordo com as moléculas com as quais interagem ou de acordo com os segundos mensageiros que as ativam. Desta maneira, a proteína-quinase dependente de AMPc se denomina *proteína-quinase A (PKA)*; a dependente de GMPc é a *proteína-quinase G (PKG)*, e aquela ativada por diacilglicerol, originado do metabolismo fosfoinositídico da membrana plasmática é denominada *proteína-quinase C (PKC)*.

A atividade PKA determina fosforilação de um substrato em presença de  $Mg^{2+}$ , AMPc e ATP segundo a seguinte reação



com a fosforilação ocorrendo em resíduos treonina e serina de polipeptídeos de grande importância no mecanismo de regulação celular. A fosforilação de componentes da membrana mediada por PKA leva, entre outros eventos, a transporte de precursores metabólicos, despolarização, aumento de permeabilidade a água e controle do crescimento/diferenciação celular. Segundo HADDEN et alii (1972) o AMPc poderia inclusive apresentar um papel antimitótico em vários tipos celulares, sugerindo que o decréscimo de sua concentração poderia iniciar ou permitir a divisão celular. O fato interessante é que no momento que diminui a concentração do AMPc no fígado em regeneração, o índice mitótico aumenta demonstrando que o sistema da adenilatociclase controlando os níveis intracelulares de AMPc tem papel fundamental no processo da regeneração hepática (LEONI, SPAGNUOLO, PANZALI, 1978; RIXON & WHITFIELD, 1985).

Já a atividade da PKG é menor que a da PKA e não se tem certeza completa se todas as reações de fosforilação mediadas por PKG ocorrem *in vitro/in vivo*. Frações particuladas de vários músculos lisos respondem ao GMPc e 8Br-GMPc com grande incorporação de  ${}^{32}P$  em proteínas com pesos moleculares variáveis desde 75.000 até 250.000 indicando fosforilação protéica ativa. A ativação da proteína-quinase G participa tanto do antagonismo como da redução do  $[Ca^{2+}]_i$  com atividade enzimática sendo estimulada principalmente pelo  $Mg^{2+}$  e  $Co^{2+}$ . Em hepatomas os níveis de PKG e do seu fator modulador são muito mais elevados do que no tecido hepático normal. Ambos são também mais elevados do que a atividade PKA e seu fator inibidor, mostrando que o GMPc e sua proteína moduladora podem ser importantes em neoplasias (VALLE; OLIVEIRA F<sup>o</sup>; MINETTI, 1988) funcionando como um importante efetor intracelular de ação mitogênica

(HADDEN et alii, 1972). Isto corrobora o trabalho de PALEMENT et alii (1991) que verificaram aumento da fusão de membranas dependentes de proteínas ligadas a GTP, num reflexo de mudanças nas propriedades das membranas durante a proliferação celular tanto em hepatocarcinogênese quanto na regeneração hepática após hepatectomia parcial.

Já a PKC (cf. p.11) participa de maneira ativa na regeneração hepática demonstrando-se que o DG aumenta sensivelmente a afinidade da PKC por  $Ca^{2+}$  provocando sua ativação. O DG está praticamente ausente da membrana celular em condições normais de repouso. Entretanto, quando há sinal externo ocorre uma produção transiente de DG a partir de fosfolípídeos de inositol. Análises cinéticas indicam que pequenas quantidades de DG acarretam aumento extraordinário da constante de afinidade aparente da PKC pelo  $Ca^{2+}$  e conseqüente ativação da enzima, independente de haver ou não variação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ .

Destarte as diferenças existentes entre as proteína-quinases, sabe-se atualmente que as diferentes vias de fosforilação podem concorrer em um equilíbrio delicado e complexo para ativação de diversificados oncogenes que participam no controle do crescimento/diferenciação celular (SZABÓ JR et alii, 1991), inclusive num processo restrito como fígado em regeneração onde a expressão de protooncogenes é específica, sequencial e transiente (FAUSTO & MEAD, 1989), com dados confirmados por HABER et alii (1993) que analisando a expressão de vários genes potencialmente capazes de induzir a regeneração hepática verificaram que apenas um pequeno número é seletivamente ativado, num processo relacionado com mobilização, ativação e metabolismo do sistema fosfoinositídeo (BERRIDGE & IRVINE, 1984), numa relação também levantada e confirmada por BIERI (1993) de ativação de PKC e aumento da transcrição celular de protooncogenes.

Entretanto, além das proteína-quinases com suas respectivas reações de fosforilação, uma série de outras enzimas dentro de seus sistemas tem sido implicadas na regulação do metabolismo fisiológico e patológico, bem como da transdução intracelular (Tabela 1). A existência destes sistemas operando harmonicamente e respondendo ou estando correlacionados ao fosfato inorgânico (Pi), implicam na presença de P sendo necessária para o pleno desempenho de muitas funções celulares (Cf. revisão BEVINGTON et alii, 1992).

Tabela 1. Algumas enzimas de fígado de rato cujas atividades biológicas respondem a concentrações fisiológicas de Pi (Mod. BEVINGTON et alii, 1992).

Processo Biológico	Enzima	No. E.C.	[Pi] <sup>1/2</sup> mM	Ativação/ Inibição
Glicólise Anaeróbica	6-fosfofruto-2-quinase	2.7.1.105	0,2	A
	Frutose 2,6-bifosfatase	3.1.3.46	1	A
	Ketose 1-fosfato aldolase	4.1.2.7	0 e 1	I
Metabolismo Mitocondrial	GTP-dependente acyl-CoA sintetase	6.2.1.10	0 e 5	I
Turnover Fosfoprotein.	Fosfo HMG CoA redutase fosfatase	3.1.3.16	3-10	I
Metabolismo Glicogênio	Glicogênio sintetase $\alpha$	2.4.1.11	~1	A
Metabolismo Glutamina	Pi-ativada glutaminase	3.5.1.2	2,8	A
	Glutamina sintetase	6.3.1.2	8	I
Metabolismo Purino-nucleotídeo	5'-nucleotidase citosólica	3.1.3.5	0 e 5	I

No momento que consideramos a existência de elementos químicos que são abundantes na superfície terrestre mas que não são utilizados pelos sistemas e estruturas biológicas de maneira extensa, ao contrário do que ocorre com **Ca**, **P** e **Mg**, nos deparamos com uma questão diametralmente oposta onde o elemento químico silício ocupa uma posição de destaque, uma vez que apresentando-se na forma de quartzo (**SiO<sub>2</sub>**) como um dos elementos mais prevalentes da crosta terrestre e obviamente não sendo um elemento traço geológico, paradoxalmente é um elemento utilizado em pequenas quantidades em muitas complexas formas de vida. A similaridade da ligação química **Si-Si** a ligação **C-C** sugere desta forma a interessante possibilidade de existir vida baseada em **Si** fora do ambiente terrestre. As similaridades químicas entre a coordenação de complexos de fósforo e **Si**, bem como o fato de organossilicatos serem altamente reativos com proteínas e ésteres fosfatados sugerem que durante a evolução terrestre **Si** pode ter sido uma importante alternativa para o papel estrutural do cálcio. Tanto isto é verdade, que mesmo atualmente muitas formas de vida inferiores utilizam **Si** em sua estrutura (CHAUSMER & WALLACH, 1990). Na realidade com o avanço e aprimoramento das metodologias técnicas de doseamento, hoje sabemos que o silício se constitui em um elemento de fundamental importância também em animais superiores, onde está presente no tecido conjuntivo e particularmente

no cabelo, pele, músculo e esqueleto (ADLER; ETZION; BERLYNE; 1986). No tecido conjuntivo, o elemento é constituinte essencial de mucopolissacarídeos ácidos, especialmente condroitin-sulfatos, keratan-sulfatos, dermatan-sulfatos, poliurônicos como ácido hialurônico etc, conferindo resistência e estabilidade estrutural através de ligações covalentes, possivelmente como silanoatos entre polissacarídeos e proteínas (CHAUSMER & WALLACH, 1990; MATHEWS & VAN HOLDE, 1990).

Embora grande parcela dos estudos sejam direcionados para avaliação da toxicidade ocupacional do elemento e de seus compostos químicos (FREEDMAN & SHARKEY JR, 1972; KANTA & CHMELAR, 1989), o papel do Si como elemento essencial ao crescimento e desenvolvimento tem sido demonstrado por SCHWARZ & MILNE (1972).

Quase que simultaneamente CARLISLE (1972) estudando a participação do Si no metabolismo normal de aves observou inibição do crescimento em animais alimentados com dieta deficiente neste elemento, com este efeito sendo corrigido com uma correta suplementação na dieta.

Além disso, estudos citados por CHAUSMER & WALLACH (1990) demonstram que Si desempenha papel específico nos sítios de mineralização em áreas ativas de crescimento ósseo, estabelecendo uma relação paralela entre mudanças nos níveis de cálcio e silício durante formação e crescimento ósseo. Com lesões na deficiência sendo mediada por defeitos na síntese de colágeno, compatível com alterações na formação da matriz óssea, similarmente observada em outras anormalidades das glicosaminoglicanas.

Segundo aqueles autores, este efeito do silício na formação da matriz, tendo um papel-chave no processo de ossificação é também suportado pelo encontro deste elemento em mitocôndria de osteoblasto em quantidades aproximadamente iguais as de cálcio e magnésio. ADLER; ETZION; BERLYNE (1986) também reportaram a presença de silício em mitocôndrias oriundas de amostras de fígado, rins e baço num contexto funcional não compreendido, o que reforça o encontro de MEHARD & VOLCANI (1975) que observaram um eficiente *uptake* de  $^{31}\text{S}$  no núcleo, microssomos mas especialmente mitocôndria de hepatócitos.

Considerando estas observações que sugerem um papel essencial do silício no processo metabólico fisiológico de crescimento e desenvolvimento, aliado a relatos que suportam alterações em estados patológicos particularmente relacionados a pacientes com insuficiência renal, degenerações neoplásicas, bem como doenças neurológicas como Doença de Alzheimer (ROBERTS & WILLIAMS, 1990; HUANG, 1994), justifica-se o estudo do comportamento do silício durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial, uma vez que não encontramos na literatura informação referente a este objeto de estudo.

Da mesma maneira como vem ocorrendo com silício, o aumento da diversidade na utilização de boro, especialmente nas formas de ácido bórico e borato de sódio, na indústria nuclear, têxtil, alimentícia e eletrônica, na agricultura e na produção de metais, na medicina e na indústria

de cosméticos, fazem-no um dos elementos mais pesquisados em todo o mundo, inclusive do ponto de vista de risco ocupacional (KUMAMARU et alii, 1986; CABALLERO et alii, 1987; KU et alii, 1991). No plano da medicina com a descoberta que moléculas de **B** podem se incorporar seletivamente em células neoplásicas (KOMURA; NAKAI; SHIRO 1987; SHELLY et alii, 1992; PAPASPYROU et alii, 1994), deslumbrou-se uma série de pesquisas tentando compreender o seu papel especialmente no crescimento e desenvolvimento celular. Isto acabou gerando inclusive, uma nova técnica terapêutica não invasiva, denominada Terapia de Tumores por Captura-Neutrônica de Boro (*Boron Neutron-Capture Therapy - BNCT*).

Segundo PAPASPYROU et alii (1994) nesta técnica o isótopo estável de boro ( $^{10}\text{B}$ ) ligado a determinadas moléculas carreadoras pode se incorporar seletivamente em tumores. A subsequente irradiação do tumor com nêutrons, desencadeia uma reação nuclear do tipo  $^{10}\text{B}(n,\alpha)^7\text{Li}$ . As partículas ( $\alpha, ^7\text{Li}$ ) resultantes desta reação são capazes de destruir as células neoplásicas por causa do pequeno raio de ação aproximadamente  $10\mu\text{m}$  para as partículas  $\alpha$  e  $5\mu\text{m}$  para  $^7\text{Li}$ , respectivamente, produzindo pouco dano ao tecido normal, adjacente a área neoplásica.

Embora tenha-se conseguido muitos avanços no estudo e análise de **B** (SCHREMMER & NOONAN, 1987), este elemento continua despertando muito interesse em função de que pequenas quantidades são capazes de promover importantes efeitos nas mais diferentes aplicações básicas, técnicas, biológicas e industriais. O rendimento inversamente proporcional de determinadas espécies vegetais observado por GESTRING & SOLTANPOUR (1987) frente ao aumento de **B** em solos preparados, aliada a observação de TEMPLETON; PAUDYN; BAINES (1989) que encontraram uma concentração basal de boro =  $2,486 \pm 0,086 \mu\text{g/g}$  em fígado normal de rato Wistar, além de vários trabalhos citados por KU et alii (1991) que relatam retardo de crescimento, inibição da espermatogênese, inclusive com perda total da fertilidade consequente a exposição crônica ao boro, sugere que este elemento pode estar envolvido no processo de crescimento e desenvolvimento, embora não existam relatos na literatura do comportamento do boro na regeneração hepática após hepatectomia parcial.

Como foi visto na p. 15 o elemento estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) pode ligar-se a adenilciclase tal como ocorre com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Isto se verifica em função do estrôncio ser um cátion semelhante ao cálcio no caráter básico e na valência química, além de possuir raio iônico, atômico e covalente bastante próximos:

	Ca	Sr
Raio iônico (Å)	0.99	1.13
Raio atômico (Å)	1.97	2.15
Raio covalente (Å)	1.74	1.91
Valência química	2	2
Caráter ácido-básico	básico	básico

Segundo BLUMENTHAL (1990) o cátion pode inclusive ser incorporado na estrutura da hidroxiapatita em muito maior extensão que cátions com raio iônico menor que o do cálcio, como sódio, lítio, magnésio etc. Desta maneira, a possibilidade da substituição do cálcio pelo estrôncio (RAEBURN & RODGER, 1987; MOLLESON, 1990) vem sendo objeto de muitos estudos desde a possibilidade do seu uso como tratamento na osteoporose até do ponto de vista toxicológico na deposição e prolongada retenção de  $^{90}\text{Sr}$  radioativo no tecido ósseo depois de exposições nucleares (WALLACH & CHAUSMER, 1990).

KOSSAKOWSKI (1987) estudando a retenção e descontaminação de radioisótopos em coelhos constatou depois da contaminação com  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{144}\text{Ce}$ ,  $^{131}\text{I}$  e  $^{90}\text{Sr}$  que o estrôncio radioativo foi o elemento que pior respondeu ao processo de descontaminação em amostras de sangue, fígado, cérebro, rins, músculos, coração, pulmões, estômago, intestino, tireóide e osso, apresentando deposição e retenção significativa.

Muitos pesquisadores citados por WALLACH & CHAUSMER (1990) tem demonstrado que Sr pode inibir o crescimento, provocando decréscimo de componentes orgânicos e inorgânicos e especialmente dificultando o processo de formação e mineralização do tecido ósseo. Entretanto, estes mesmos pesquisadores apresentam outros dados experimentais que sugerem que estes efeitos estão na dependência dos níveis de exposição ambiental, desta maneira, Sr em baixas concentrações além de não apresentar efeitos adversos poderia promover paradoxalmente aumento na formação óssea. Na realidade, a exposição tóxica se manifesta clinicamente na presença do aumento de osso imaturo, cemento e matriz dentinária que não se calcificam, num padrão de alteração patológica comparável a hipomineralização, semelhante a quadro de deficiência de vitamina D (GRAVINA; CABRINI; CARRANZA JR; 1970). Fato confirmado pelas observações de EL SOLH & ROUSSELET (1981) que reforçam a idéia que o metabolismo do cálcio pode ser prejudicado, uma vez que eles encontraram Sr causando hipocalcemia e dificultando a 1-hidroxilação da 25-hidroxi-vitamina D para 1,25-hidroxi-vitamina D. Como ÉTHIER et alii (1990) e ÉTHIER; GOUPIL; GASCON-BARRÉ (1991) demonstraram o papel relevante da vitamina D no processo de regeneração hepática, o trabalho de RAEBURN & RODGER (1987) reforça a necessidade de estudos sobre o comportamento e níveis de estrôncio em diferentes condições biológicas. Estes pesquisadores verificaram que  $\text{Sr}^{2+}$  pode substituir  $\text{Ca}^{2+}$  em interessante trabalho experimental com cobaias, mantendo resposta contrátil para KCL, mas não respondendo ao ionóforo de cálcio A23187 ou agentes atuando via interação fármaco-receptor. Consequentemente, estes autores sugeriram que existem respostas mediadas por baixa afinidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e que podem sofrer interferência do estrôncio e respostas a outros agentes suportadas por alta afinidade a  $\text{Ca}^{2+}$ , e que não seriam influenciadas pela presença do cátion divalente  $\text{Sr}^{2+}$ .

A presença de muitos elementos desempenhando simultaneamente, importantes funções celulares, com hepatócitos possuindo sistemas especialmente desenvolvidos para o fluxo de íons divalentes (CROFTS & BARRITT, 1990), com eventos iônicos iniciando (LEFFERT & KOCH, 1980), promovendo e ativando sistemas intracelulares complexos durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial (WHITFIELD et alii, 1980), fazem da técnica de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES) um recurso valioso para rápida e sensível análise multi-elementar em amostras biológicas, especialmente em volume muito reduzido de amostra, necessário para o acompanhamento e controle das condições experimentais que normalmente são muito dinâmicas, uma vez que a determinação simultânea otimiza a informação final de cada amostra quando comparada em conjunto. Além disso, a possibilidade de maior precisão e exatidão dos resultados obtidos em comparação com outras metodologias é confirmado por SHIRAISHI et alii (1987) que compararam os níveis de metais alcalinos-terrosos obtidos simultaneamente com Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES), com Espectrometria de Absorção Atômica e Complexometria, em amostras biológicas oriundas de ossos fetais.

Entretanto, LEBLONDEL; MAURAS; ALLAIN (1986) relatando que as diferentes condições experimentais preconizadas por diferentes autores, concernentes a escolha dos elementos, espécies, tecidos e métodos de análise, não convergem para uma visão geral da distribuição dos elementos, especialmente no rato, apresentaram importantes informações sobre as concentrações normais de 14 elementos no sangue total, plasma e alguns tecidos no rato, através do ICP-AES (Tabela 2).

Em 1989, TEMPLETON; PAUDYN; BAINES; utilizando ICP-MS, ampliaram para mais de 30 elementos a análise proveniente de amostras de soro e fígado de rato, algumas sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ ) de alguns elementos químicos em rato Wistar ( $\bar{x} \pm SD$ )

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
<b>Sangue<sup>1</sup></b>	59,35 $\pm 2,565$	395,2 $\pm 26,94$	37,96 $\pm 2,455$	—	—	0,015 $\pm 0,002$
<b>Plasma<sup>1</sup></b>	101,7 $\pm 3,887$	132,8 $\pm 11,08$	18,30 $\pm 1,628$	—	—	0,024 $\pm 0,005$
<b>Soro<sup>2</sup></b>	87,37 $\pm 9,218$	115,2 $\pm 4,955$	29,89 $\pm 2,916$	—	0,273 $\pm 0,206$	0,086 $\pm 0,028$

<sup>1</sup> Mod. LEBLONDEL; MAURAS; ALLAIN (1986)

<sup>2</sup> Mod. TEMPLETON; PAUDYN; BAINES (1989)



#### **4. PROPOSIÇÃO**

#### 4. PROPOSIÇÃO

Face as considerações expostas, pretende-se investigar os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, silício, boro e estrôncio, através de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES), no soro de ratos parcialmente hepatectomizados, nos períodos de 6, 24 e 360 horas após a cirurgia, submetendo animais a tratamento com os seguintes antagonistas de receptores histamínicos:

1. Terfenadina (Antagonista específico de receptores H1 periféricos)
2. Cimetidina (Antagonista específico de receptores H2)
3. Terfenadina + Cimetidina

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizados 73 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando entre 150 e 230 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, e que receberam ração especial para animais de laboratório marca Produtor n. 49 (Anderson Clayton S.A.) e água "*ad libitum*".

### 5.2 Técnica de Hepatectomia Parcial

Foi utilizada a técnica de hepatectomia parcial de HIGGINS & ANDERSON (1931), descrita por MATTOS FILHO (1976), que obedeceu aos seguintes procedimentos: após anestesia com éter etílico, procedeu-se a depilação da região abdominal, ao longo da linha mediana, com antissepsia da mesma através da aplicação de PVPI (Polivinilpirrolidone Iodine) teor de iodo a 10% (Povidine Tópico - Darrow Laboratórios S.A.). Após incisão ventral mediana de 3 a 4 cm, a partir do apêndice xifóide do esterno, efetuou-se, através de compressão da região abdominal, a extrusão dos lóbulos hepáticos mediano e lateral esquerdo, expondo-os, desta maneira, para manobras posteriores, permanecendo na cavidade abdominal os lóbulos lateral direito e pequeno caudado. Em seguida, promoveu-se a ligadura dos lóbulos mediano e lateral esquerdo, com fio de algodão, procedendo-se à secção dos ligamentos suspensores com posterior extirpação dos mesmos. Após realizar a sutura com fio de algodão, da musculatura em primeiro plano e da pele em segundo plano, submeteu-se a região novamente à antissepsia. Todas as cirurgias foram realizadas entre 9:00 h e 15:00 h, dentro de um período de luz aproximado de 12:00 h: das 6:00 às 18:00 h. Cada procedimento cirúrgico de hepatectomia parcial foi realizado num tempo médio de 20 minutos.

### 5.3 Grupos experimentais

Os 73 animais foram divididos em três grupos e sacrificados 6, 24 e 360 horas após a hepatectomia parcial. Cada grupo foi dividido em 4 sub-grupos que receberam as drogas abaixo discriminadas com suas respectivas dosagens.

<b>I - terfenadina<sup>1</sup></b>	<b>2 mg/kg/dia</b>
<b>II - cimetidina</b>	<b>20 mg/kg/dia</b>
<b>III - terfenadina + cimetidina</b>	<b>2 mg/kg/dia e 20 mg/kg/dia</b>
<b>IV - solução de NaCl 0,9%</b>	<b>3 ml/kg</b>

### 5.4 Administração das drogas

As drogas foram administradas intraperitonealmente (i.p.) durante todo o experimento. Foram feitas 4 aplicações diárias, uma a cada 6 horas, acompanhando-se semanalmente o peso dos animais. A primeira dose foi dada 10 minutos antes de se realizar a hepatectomia parcial e a última dose 10 minutos antes do sacrifício.

### 5.5 Colheita do sangue para dosagem dos elementos

O sangue para dosagem de cálcio, fósforo, magnésio, boro, silício e estrôncio era colhido por rompimento do plexo braquial (CURY, 1984). O método consiste numa incisão cutânea da região anterior torácica, e afastamento da pele formando uma bolsa lateral, que recebe o sangue oriundo da hemorragia. A colheita do sangue arterial e venoso misturados, e diretamente, não interfere na qualidade da amostra, uma vez que SEKAS & COOK (1979) compararam esta condição em experimentos controlados com punção cardíaca, não encontrando nenhuma diferença significativa em 12 (doze) componentes séricos.

---

<sup>1</sup> I - Teldane® - Merrel Lepetit™  
 II - Tagamet® - Smithkline & Cia.  
 IV - Esse volume foi padronizado por ser equivalente àquele empregado nos demais sub-grupos.

## 5.6 Determinação dos níveis de cálcio, fósforo, magnésio, silício, boro e estrôncio no soro, através de Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES)

### 5.6.1 Fundamentos do método ICP-AES

No processo indutivo do ICP os elétrons recebem energia do campo magnético gerado por uma espiral energizada por uma fonte geradora de alta radiofrequência. Conseqüentemente, excitam e ionizam um átomo quando ocorre uma colisão. O átomo excitado e/ou ionizado decai para o estado fundamental emitindo uma radiação ou fóton. Como a intensidade da radiação emitida em uma linha espectral é proporcional ao número de átomos excitados no correspondente nível de energia, pode-se construir uma curva de calibração plotando intensidades para concentrações conhecidas do elemento a ser avaliado e conseqüentemente a sensibilidade pode ser definida pela inclinação da curva resposta vs. concentração (GINÉ, 1990).

### 5.6.2 Equipamento/condições de operação

A determinação foi efetuada em **Plasma Atomcomp Jarrell-Ash - Mod. 975** (Division of Fisher Scientific Company) no Depto. de Química Analítica do *Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA* - Campus "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo/USP equipado com:

5.6.2.1 Gerador de radiofrequência marca Plasmatherm de 27.12 MHz/ potência incidente de 1 kW/ potência refletida de 5 W

5.6.2.2 Fluxo de gás argônio 18 l/min

5.6.2.3 Fluxo de gás argônio auxiliar 0.5 l/min

5.6.2.4 Fluxo de gás argônio no nebulizador 0.5 l/min

5.6.2.5 Nebulizador concêntrico Meinhard tipo 2c

5.6.2.6 Tochas artesanais de vidro

5.6.2.7 Policromador com 38 canais analíticos montado pela Jarrell-Ash (os sinais foram integrados por 10 s)

5.6.2.8 Software e hardware originais/modificados pela Anacom Científica/ computador IBMXT/ impressora Grafic-100

### 5.6.3 Características do sistema

Para iniciar o processo de formação do plasma, uma espiral de Tesla (circuito primário c\ cristal pizoelétrico - quartzo) fornece os primeiros elétrons. Estes elétrons livres são acelerados pelo campo magnético produzido pelo gerador de radiofrequência e rapidamente alcançam a energia necessária para ionizar o argônio produzindo mais elétrons e iniciando um processo em cascata. Quando a energia liberada pelo plasma é igual a energia cedida pela fonte de radiofrequência se estabelece um equilíbrio permitindo que o plasma apresente-se numa configuração toroidal e caracterizada por uma secção circular onde promove-se a introdução da amostra (GINÉ, 1990).

### 5.6.4 Reagentes e soluções padrão

Foram utilizados sais e metais de alta pureza da Johnson Mathey Company (J. M.C.) e soluções padrões ultra-puras - Titrisol<sup>®</sup>, E.Merck - Darmstadt.

### 5.6.5 Obtenção e preparo das amostras

O sangue foi colhido sem anticoagulante com conta-gotas, na bolsa lateral da região torácica anterior dos animais, conforme técnica já descrita, e deixado em repouso em estufa a 37°C durante 20 a 30 minutos. Após a formação do coágulo, colocou-se os tubos no refrigerador a 4°C, deixando-os durante 12 horas, a fim de favorecer a fixação ao coágulo de crio ou autoglutininas, bem como permitir o seu retraimento (OLIVEIRA LIMA, A. et alii, 1985). Transcorrido esse tempo, centrifugou-se os tubos a 3.000 rpm (Porta-centrifuge Tomy mod. IC-15AN, Tomy Seiko Co., LTD, Tokyo, Japan), durante 10 (dez) minutos e depois de sedimentado o coágulo pipetou-se o sobrenadante. Um volume de soro de até 5.0 ml, isento de hemólise foi conseguido. Os soros foram mantidos a -5°C e no momento da análise procedeu-se uma diluição de 25(vinte e cinco) vezes tomando-se 1ml do soro e completando-se para 25ml de água destilada e deionizada (1:25) em balão volumétrico, num processo de diluição direta uma vez que não é necessária a digestão de amostras de soro e urina (HUANG, 1994). Embora o método de diluição empregado na preparação das amostras possa introduzir uma deterioração dos limites de detecção, uma acurada determinação de muitos elementos é ainda possível (VANHOE; DAMS; VERSIECK; 1994) com a vantagem de minimizar a contaminação da amostra pela manipulação extensiva bem como a perda de elementos por volatilização, adsorção, precipitação etc., especialmente em métodos baseados na destruição do material orgânico presente em fluidos biológicos como o soro.

### 5.6.6 Linhas espectrais e limites de detecção

O espectro de emissão contém todas as radiações emitidas pelo argônio e dos elementos da amostra. Como a intensidade é proporcional ao número de átomos ela está correlacionada a estabilidade da fonte de energia e a quantidade de energia suficiente para atender (excitar) todos os átomos, desta maneira as linhas espectrais correspondentes ao átomo neutro excitado está sempre indicado pelo número I e as do átomo ionizado como II. As leituras dos elementos foram realizadas simultaneamente em ampla faixa linear de concentrações através de espectrômetro simultâneo nos seguintes comprimentos de onda:

Linha espectral	Comprimento de onda/ Ångström
Ca II <sup>2</sup>	3179
P I	2149
Mg II	2790.7
Si I	2881
B I	2496
Sr II	4215
Ti II <sup>3</sup>	3349

As temperaturas altas do plasma (6.000 a 10.000°K), proporcionam uma energia aproximada de 16 eV, suficiente para obter um alto grau de ionização (Apêndice 1). A emissão dos átomos ionizados excitados permitem a obtenção de limites de detecção melhores que com absorção atômica, para a maioria dos elementos (GINÉ, 1990). Para isto estabelece-se a função de calibração  $x/b$  versus concentração onde  $x$  é o sinal total e  $b$  é o *blank* procurando checar a variabilidade linear dinâmica do instrumento. Assim, o gráfico do desvio padrão relativo RSD ( $x - b$ ) versus  $\log x/b$  o qual é diretamente relacionado a concentração permite computar a variabilidade analítica e o limite de detecção (Fig.6).

<sup>2</sup> I linhas de emissão do átomo excitado  
II linhas de emissão do íon excitado

<sup>3</sup> Foi utilizado como padrão interno



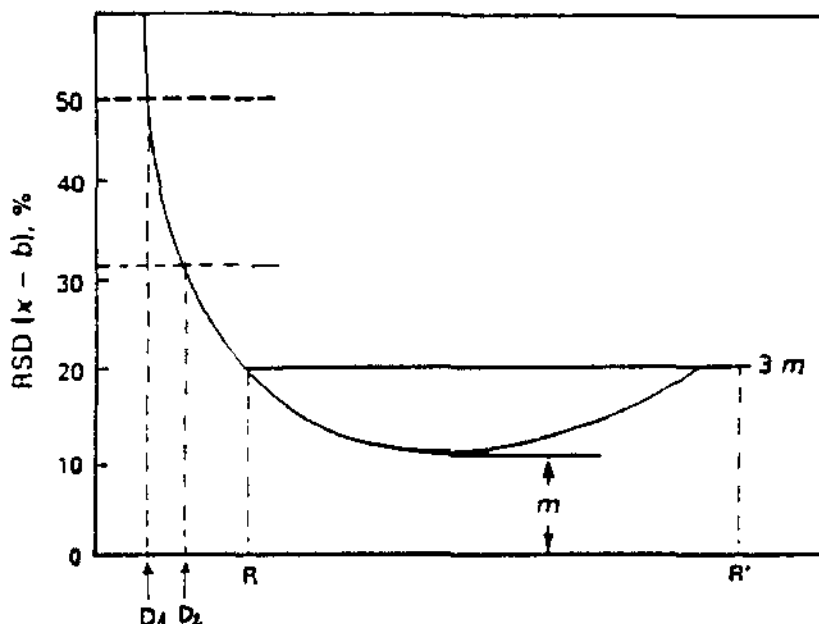


Fig.6 Gráfico do desvio padrão relativo ( $x - b$ ) versus concentração ( $\log x/b$ )

Consequentemente, segundo o REPORT BY THE ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (1986) o limite de detecção ( $D_1$ ) é o ponto no qual o RSD de  $x/b = 50\%$  e a variabilidade analítica  $R' - R$  é a região na qual a função tem valores pelo menos, tres vezes o valor mínimo  $m$ , assim a melhor performance do equipamento é atingida com o valor mais baixo de  $D$  e  $m$ , e um grande valor de  $R' - R$ . Recentemente, a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) promoveu uma alteração para um valor mais fidedigno. Desta maneira, atualmente o limite de detecção ( $D_2$ ) corresponde a concentração do elemento que produz um sinal em intensidade de emissão tres vezes maior que o desvio padrão calculado com as intensidades de fundo (GINÉ, 1990), num ponto no qual o RSD de  $x/b = 33\%$ . Os limites de quantificação foram determinados experimentalmente através do processamento de soluções diluídas sucessivamente, até se conseguir resultados com desvio máximo de 5 %, e que para os elementos quantificados foi determinado como:

Elemento	$\mu\text{g/ml}$
Ca	0.100
P	0.100
Mg	0.100
Si	0.100
B	0.020
Sr	0.100

### 5.6.7 Procedimento

As dosagens foram feitas logo após a preparação das amostras e sistematizadas para obtenção de médias de 3 (três) repetições para cada amostra (em triplicata). A sequência de determinação foi randomizada entre os grupos e intercaladas com leituras dos padrões. Após o registro das leituras determinava-se a concentração dos elementos na amostra conforme a fórmula abaixo:

$$\text{CpE} / \text{CpEa} \times \text{Fd} \times \text{CaE} = \text{Cf}$$

onde **CpE** = concentração padrão do elemento  
**CpEa** = concentração padrão do elemento avaliado  
**Fd** = fator de diluição = 25  
**CaE** = concentração do elemento avaliado na amostra  
**Cf** = concentração final do elemento na amostra

Os resultados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (VIEIRA,S. 1985).

## **6. RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

A determinação de baixas concentrações no soro implica necessariamente na utilização de padrões e amostras livres de contaminação, bem como na manutenção de condições uniformes durante a avaliação dos elementos nas amostras. A Tabela 3 apresenta os níveis dos elementos nos padrões e as médias ( $\bar{x}$ )  $\pm$  *SD* (Desvio padrão) obtidas nas condições sumarizadas em Materiais e Métodos para 492 determinações controle conforme Apêndice 2.

Tabela 3. Recuperação dos elementos nos padrões

Elemento	n (x3)	calculado ( $\mu\text{g/ml}$ )	encontrado $\bar{x} \pm SD$	recuperação %
Ca	29	10,00	10,19 $\pm$ 0,325	101,9
P	27	10,00	9,964 $\pm$ 0,278	99,64
Mg	29	10,00	9,995 $\pm$ 0,302	99,95
Si	23	10,00	9,855 $\pm$ 0,258	98,55
B	29	1,000	0,997 $\pm$ 0,038	99,70
Sr	27	10,00	9,884 $\pm$ 0,167	98,84

A recuperação ótima dos elementos nos padrões, aliada a determinação de titânio (Ti), utilizado como padrão interno para corrigir eventuais efeitos da matriz e instabilidade de sinal, não permitiram constatar interferências durante a realização das dosagens, comprovadas através da leitura de brancos constituídos de H<sub>2</sub>O utilizada na diluição das amostras e no preparo dos padrões.

Os dados das Tabelas 4 a 9 foram calculados e sumarizados em *n* (número de animais);  $\bar{x}$  (média)  $\pm$  *SEM* (erro padrão da média) a partir dos resultados obtidos, que podem ser encontrados nos Apêndices 3 a 14.

A análise estatística mostrou que os níveis de cálcio (Tabela 4), fósforo (Tabela 5) e magnésio (Tabela 6) não foram estatisticamente diferentes entre os grupos controles 6, 24 e 360h, demonstrando que durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial não ocorrem alterações significativas nos níveis destes elementos no soro dos animais. Da mesma forma os animais que sofreram tratamento com antagonistas de receptores histamínicos de maneira individual ou associada também não apresentaram mudança significativa nas médias dos níveis de fósforo e magnésio nos tempos de 6, 24 e 360 h segundo ANOVA (Fig. 8 e 9).

Tabela 4. Valores médios de Ca ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	6 h		24 h		360 h	
	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
<b>Controle</b> (NaCl 0,9%)	(7)	78,25 $\pm$ 3,529	(6)	70,13 $\pm$ 6,119	(4)	73,54 $\pm$ 6,107
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia)	(6)	78,78 $\pm$ 3,390	(6)	59,13 $\pm$ 10,08 *	(5)	88,04 $\pm$ 7,395
<b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	77,58 $\pm$ 3,643	(7)	72,26 $\pm$ 4,716 **	(6)	89,38 $\pm$ 3,122
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia) + <b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	76,18 $\pm$ 3,473	(6)	69,49 $\pm$ 4,573 **	(6)	83,90 $\pm$ 9,344

\*  $p < 0.05$  vs. Terfenadina 360 h

\*\*  $p < 0.05$  vs. Cimetidina 360 h

A determinação dos níveis de cálcio no soro as 24 h após hepatectomia parcial reflete uma discreta diminuição das médias dos níveis deste elemento nos grupos submetidos a tratamento. Este decaimento da concentração do cálcio as 24 h da regeneração hepática, embora não tenha sido estatisticamente diferente entre os grupos controle e tratados naquele tempo (Tabela 4), ela foi significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) vs os grupos experimentais de tratamento 360 h (Fig. 7), com a média da concentração de cálcio no grupo tratado com Terfenadina + Cimetidina 360 h sendo mais alta que no grupo 24 h e não apresentando, paralelamente, diferença estatisticamente significativa do valor encontrado para os animais submetidos a tratamento com Terfenadina ou Cimetidina isoladamente as 360 h.

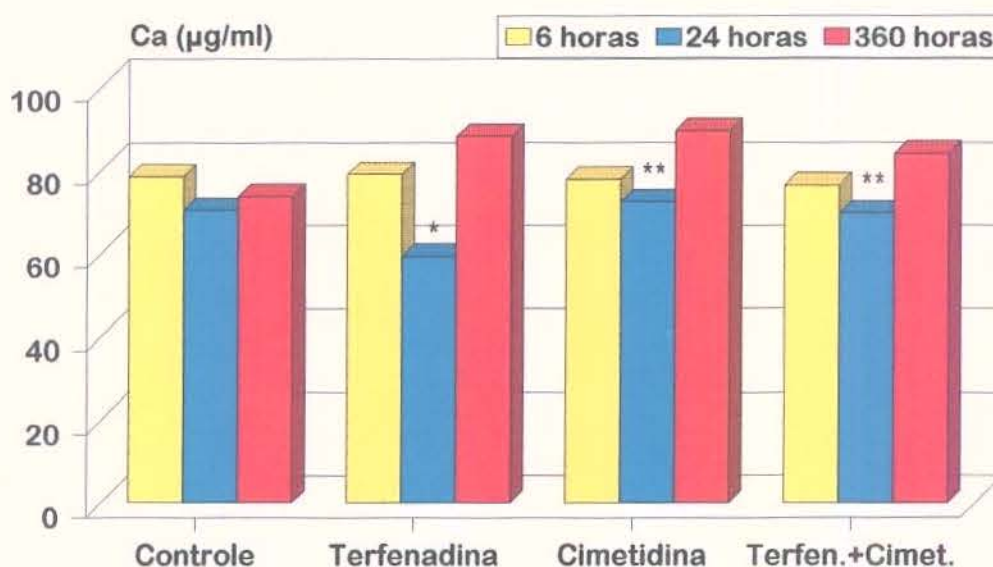


Fig.7 Histograma de barras, mostrando valores de Ca ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Tabela 5. Valores médios de P ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	6 h		24 h		360 h	
	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
<b>Controle</b> (NaCl 0,9%)	(7)	198,4 $\pm$ 28,87	(6)	199,0 $\pm$ 21,49	(4)	188,9 $\pm$ 13,63
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia)	(6)	178,1 $\pm$ 26,25	(6)	181,6 $\pm$ 35,33	(5)	192,6 $\pm$ 43,54
<b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	192,8 $\pm$ 37,59	(7)	173,1 $\pm$ 30,01	(6)	189,2 $\pm$ 19,89
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia) + <b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	199,8 $\pm$ 21,82	(6)	181,5 $\pm$ 25,68	(6)	216,5 $\pm$ 12,78

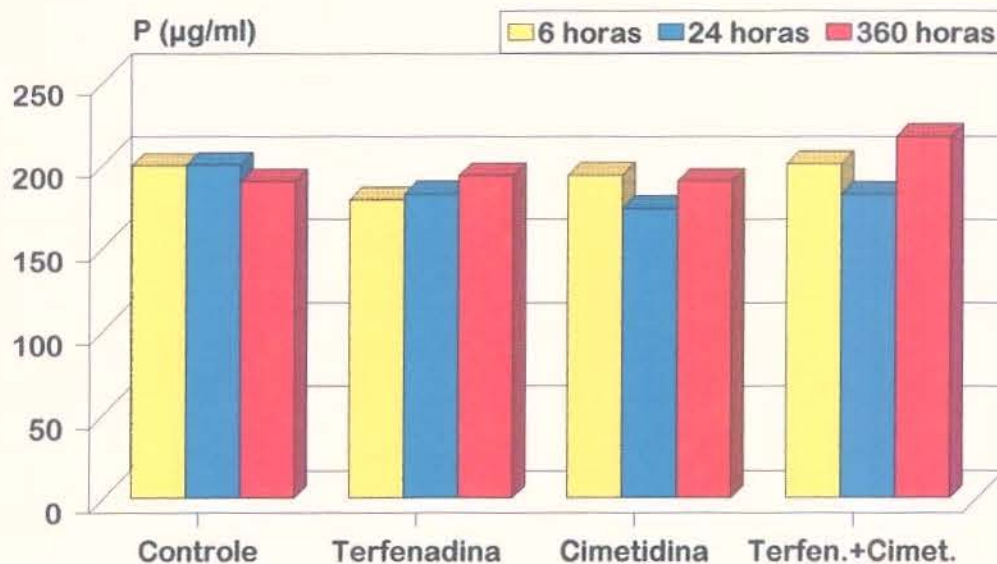


Fig. 8 Histograma de barras, mostrando valores de P ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Tabela 6. Valores médios de Mg ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	6 h		24 h		360 h	
	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
<b>Controle</b> (NaCl 0,9%)	(7)	$28,65 \pm 2,064$	(6)	$32,18 \pm 3,951$	(4)	$28,48 \pm 4,087$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia)	(6)	$32,70 \pm 5,217$	(6)	$26,76 \pm 5,033$	(5)	$30,67 \pm 4,400$
<b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	$30,15 \pm 1,609$	(7)	$27,24 \pm 2,668$	(6)	$33,60 \pm 2,100$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia) + <b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	$29,90 \pm 1,989$	(6)	$28,04 \pm 3,141$	(6)	$32,39 \pm 3,207$

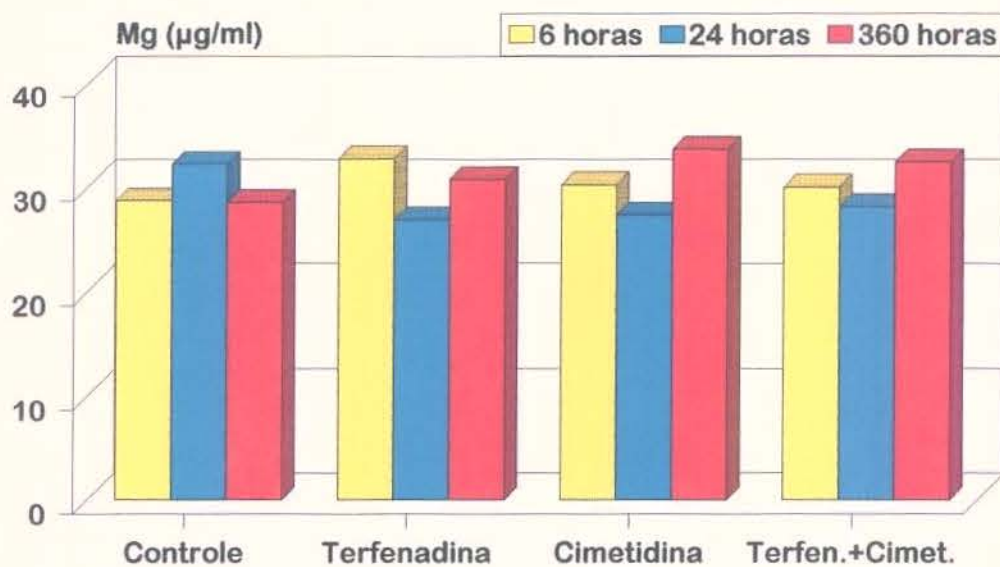


Fig. 9 Histograma de barras, mostrando valores de Mg ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Tabela 7. Valores médios de Si ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	6 h		24 h		360 h	
	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
<b>Controle</b> (NaCl 0,9%)	(6)	$5,435 \pm 1,820$	(3)	$10,92 \pm 3,293$	(4)	$13,76 \pm 4,030$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia)	(6)	$14,88 \pm 7,400$	(3)	$16,39 \pm 8,545$	(4)	$6,804 \pm 2,224$
<b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(6)	$12,79 \pm 4,541$	(7)	$9,471 \pm 3,705$	(4)	$6,989 \pm 1,445$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia) + <b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(4)	$11,55 \pm 4,164$	(4)	$9,522 \pm 5,614$	(4)	$7,626 \pm 1,786$

Embora os níveis de silício sugiram um aumento da concentração deste elemento no soro dos animais controle durante a regeneração hepática após 24 h permanecendo elevados no espaço de tempo de 360 h, os valores encontrados não foram estatisticamente diferentes (Tabela 7). Entretanto, quando os animais foram submetidos a tratamento com terfenadina, cimetidina ou terfenadina + cimetidina foi observado uma inversão em relação aos valores encontrados nos grupos controles demonstrando uma tendência de aumento de concentração ao tempo de 6 h persistindo por 24 h com decaimento dos níveis a 360 h, embora os valores obtidos nos grupos de tratamento não tenham sido significativamente diferentes dos grupos controles segundo ANOVA e teste T de Tukey ao nível de significância de 5 % (Fig.10).

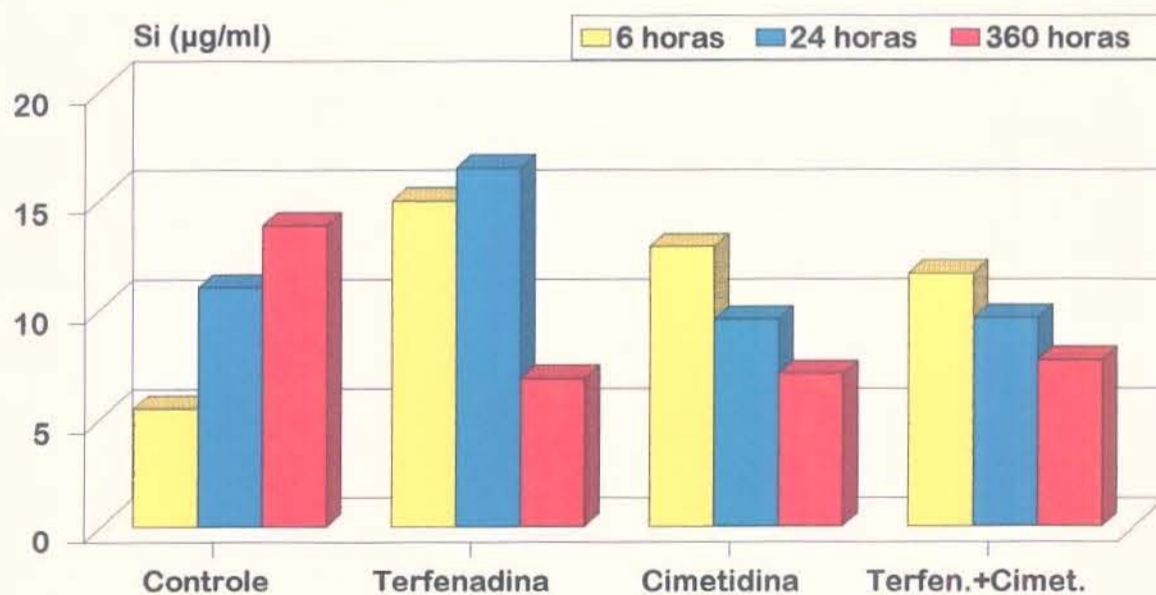


Fig. 10 Histograma de barras, mostrando valores de Si ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.



Tabela 8. Valores médios de B ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	6 h		24 h		360 h	
	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	(n)	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
<b>Controle</b> (NaCl 0,9%)	(7)	$0,663 \pm 0,122$	(5)	$0,263 \pm 0,097$ *	(4)	$0,164 \pm 0,051$ *
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia)	(6)	$0,287 \pm 0,077$ *	(6)	$0,185 \pm 0,046$	(5)	$0,342 \pm 0,132$
<b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	$0,446 \pm 0,074$	(6)	$0,233 \pm 0,111$	(6)	$0,315 \pm 0,082$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia) + <b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	$0,320 \pm 0,054$ *	(6)	$0,168 \pm 0,047$	(6)	$0,825 \pm 0,192$ **

\*  $p < 0.05$  vs. Controle 6 h

\*\*  $p < 0.05$  vs. Controle 360 h

vs. Terfenadina + Cimetidina 6 h

vs. Terfenadina + Cimetidina 24 h

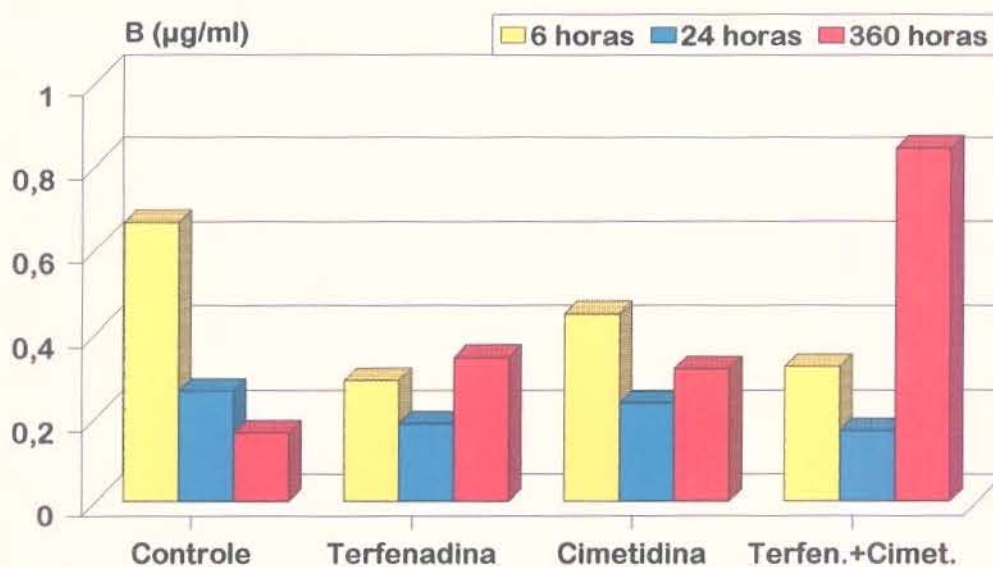


Fig. 11 Histograma de barras, mostrando valores de B ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Em contrapartida, a média dos níveis de boro foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) ao tempo de 6 h em relação a 24 e 360 h nos grupos controles e em relação as médias dos grupos submetidos a tratamento com terfenadina e terfenadina + cimetidina no tempo de 6 h (Tabela 8). Durante este tempo a concentração de boro não foi em média significativamente diferente do grupo de animais submetidos a cimetidina. Para o grupo de animais submetidos a terfenadina + cimetidina ao tempo de 360 h, o valor do elemento boro foi em média significativamente maior do que do grupo controle, não sendo significativamente diferente dos grupos tratados com terfenadina e cimetidina isoladamente. Entretanto, a média de concentração de boro no grupo terfenadina + cimetidina não foi estatisticamente diferente do valor encontrado para o grupo controle as 6 h mas significativamente maior ( $p < 0.05$ ) que os valores encontrados para o grupo tratado com terfenadina + cimetidina no espaço de tempo de 6 e 24 horas (Fig.11). A média dos níveis de boro as 24 horas não foram estatisticamente diferentes entre os 4 sub-grupos conforme ANOVA.

Embora os valores médios (Tabela 9) encontrados para estrôncio sejam relativos a dados obtidos em sua totalidade em condições abaixo do limite quantificável ( $0,100 \mu\text{g/ml}$ ) os resultados avaliados sob ANOVA e teste T de Tukey com nível de significância de 5 % demonstraram não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos/sub-grupos de 6, 24 e 360 h (Fig. 12).

Tabela 9. Valores médios de Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	6 h		24 h		360 h	
	(n)	$\bar{x} \pm SEM$	(n)	$\bar{x} \pm SEM$	(n)	$\bar{x} \pm SEM$
<b>Controle</b> (NaCl 0,9%)	(7)	$0,198 \pm 0,019$	(6)	$0,168 \pm 0,019$	(4)	$0,160 \pm 0,020$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia)	(6)	$0,199 \pm 0,020$	(6)	$0,158 \pm 0,022$	(5)	$0,189 \pm 0,010$
<b>Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	$0,202 \pm 0,014$	(7)	$0,180 \pm 0,017$	(6)	$0,242 \pm 0,020$
<b>Terfenadina</b> (2mg/kg/dia) <b>+ Cimetidina</b> (20mg/kg/dia)	(7)	$0,183 \pm 0,014$	(5)	$0,199 \pm 0,011$	(6)	$0,205 \pm 0,028$

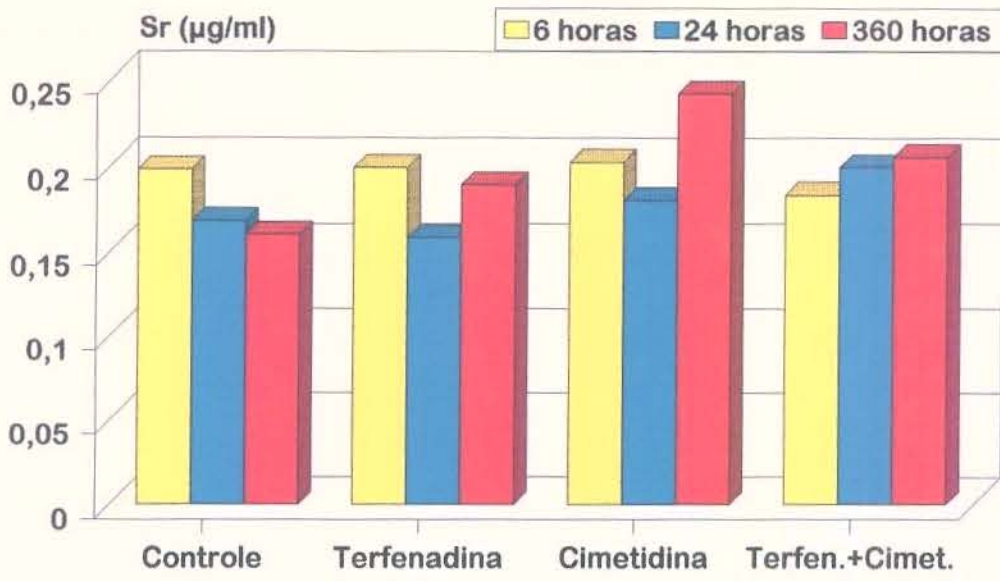


Fig. 12 Histograma de barras, mostrando valores de Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

## **7. DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

As alterações moleculares verificadas durante a regeneração hepática, promovendo e permitindo a interação de inúmeros fatores com receptores e sistemas na membrana, abordadas com propriedade no trabalho de KOSHLUKOVA et alii (1992), acabam gerando cascatas de vias intracelulares que regulam uma infinidade de atividades como metabolismo fosfolipídico e do ácido araquidônico, fosforilação de proteínas, mobilização e transporte de cálcio, regulação da transcrição celular, etc. Estes eventos induzem mudanças intrínsecas na atividade das células desde mobilidade e adesividade até síntese de DNA, com desequilíbrios nestes eventos estando associados com uma variedade de doenças (BRUGGE, 1993).

Consequentemente, a exposição crônica/sub-aguda do fígado em regeneração a antagonistas de receptores histamínicos pode perfeitamente estar concorrendo para a ocorrência de mudanças intrínsecas na atividade celular, a começar pelo fato do extenso procedimento cirúrgico realizado, antecedendo e proporcionando a entrada do fígado remanescente num processo de intensa regeneração, estar associado a decréscimo no fluxo biliar, o que caracterizaria um quadro de colestase intrahepática (MEIER-ABT, 1990). Entretanto, pelo trabalho de SRIVASTAVA et alii (1982), sabe-se que durante a regeneração hepática ocorre um aumento nos níveis de glutathiona, promovendo um mecanismo de proteção num eficiente processo de destoxificação. Além disso, UESUGI; BOGNACKI; LEVINE (1976) observaram que depois da hepatectomia parcial o fluxo biliar e a secreção de sais biliares é significativamente aumentada, o que foi comprovado por FUKANO et alii (1985), que acrescentaram que fosfolipídeos também são mais secretados na bile (e menos colesterol) que no fígado normal, com alterações desaparecendo depois de sete dias. PÉREZ-BARRIOCANAL; ESTELLER; GALLEGO (1987) também estudando o comportamento do sistema biliar, além de confirmar os dados obtidos pelos outros autores, verificaram a existência de uma significativa relação entre a secreção de ácidos biliares como importante fator determinante na secreção de cálcio na bile depois de hepatectomia parcial em ratos. Assim, em função do fracionamento das dosagens (4x/dia), além de concentrações baixas não excedendo níveis terapêuticos para os fármacos utilizados (McTAVISH; GOA; FERRILL 1990; BROGDEN et alii, 1978; ESTELLE; SIMONS; J.SIMONS 1991), sugerem que os resultados obtidos podem estar refletindo alterações de mecanismos celulares próprios da proliferação celular, envolvidos durante a regeneração hepática.

Isto também se fundamenta nas excepcionais características do ICP-AES para atomização e ionização da amostra injetada que elimina uma série de interferências relatadas em outros métodos. Mesmo

assim, VANHOE; DAMS; VERSIECK (1994) apresentaram que elementos mais pesados podem sofrer maior interferência do NaCl em amostras biológicas, que elementos mais leves. Estes pesquisadores demonstraram que ocorre um aumento da supressão de sinal de 33% do  $^7\text{Li}$  para 56% no  $^{238}\text{U}$ , na presença de 4mg/ml de NaCl.

Embora exista no soro uma série de proteínas, além de sais facilmente ionizáveis como Na, K, Cl, o soro apresenta uma quantidade de sal equivalente a 9 mg/ml de NaCl ou 0,9%, o que poderia provocar alguma interferência, mas que provavelmente em função do processo de atomização e ionização, da diluição realizada em matriz  $\text{H}_2\text{O}$ , aliada a alta especificidade e seletividade, dos comprimentos de onda para os elementos determinados não deve ter ocorrido.

ZIVNÝ; SIMEK; PALICKA (1989) estudando os efeitos de soluções salinas administradas parenteralmente em diferentes fases pós-operatórias da regeneração hepática encontraram que especialmente a infusão de NaCl 0,9% durante a sétima e décima-segunda hora após hepatectomia parcial pode provocar inibição na síntese de DNA. Como estes autores administraram solução fisiológica de salina na dose de 3,3 ml/kg/h durante espaços de tempos definidos, provavelmente não ocorreram interferências em nossos grupos controles, em virtude da administração de NaCl 0,9% ter sido efetuada i.p. na dose de 3 ml/kg/6h e mesmo porque, em função do delineamento experimental, não foi efetuada administração entre a sétima e décima-segunda hora.

Além destes detalhes é importante frisar que Ca, P, Mg estão presentes em concentrações bem acima dos limites de detecção em muitos tecidos e fluidos, sendo determinados eficientemente por uma variedade de técnicas, e não apresentando problemas especiais para o ICP (TEMPLETON; PAUDYN; BAINES; 1989). Assim, o fato de não ter ocorrido modificação significativa no soro, dos níveis de Ca na presença de um evento capaz de alterar fisiologicamente e bioquimicamente o organismo como um todo, indica que embora o cálcio seja fundamental durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial, ele é rapidamente mobilizado intracelularmente, num regulado equilíbrio compartimental via Ca-calmodulina com o meio extracelular, de tal maneira que não se observam modificações significativas nos níveis de cálcio no soro de ratos parcialmente hepatectomizados (AL-OTHMAN, 1986; NAKATA et alii, 1987; ÉTHIER et alii, 1990), conforme o encontrado neste experimento (Tabela 4).

Como está bem estabelecido que  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina (CaM) estão envolvidos na regulação da proliferação de células de fígado de rato (PUJADES et alii, 1990) e a síntese de DNA acompanhada da divisão celular podem ocorrer mesmo em deficiência de cálcio, mediante um processo na superfície da célula capaz de ativar complexos de Ca-calmodulina, os quais ativam muitas enzimas e medeiam muitos processos celulares cálcio-dependentes (JONES et alii, 1982), caracteriza-se um processo de mobilização e utilização bastante dinâmico para o elemento. Tanto isto é verdade, que

quando os hepatócitos estão proliferativamente ativados *in vivo* pela hepatectomia parcial, os níveis citosólicos de CaM estão aumentados entre 6 e 14 horas depois da cirurgia (MacMANUS et alii, 1981).

Depois de uma transiente acumulação no citosol CaM é translocada para dentro do núcleo onde está associada com a matriz nuclear, apresentando valores máximos as 24 h depois da cirurgia, quando a síntese de DNA é também máxima, numa relação de CaM nuclear com a replicação do DNA (SERRATOSA et alii, 1988). Isto foi confirmado por PUJADES et alii (1990) que observaram decréscimo de calmodulina na membrana plasmática de hepatócitos 24 h depois da hepatectomia parcial, com aumento da CaM nuclear ao mesmo tempo, sugerindo que calmodulina dissociada da membrana plasmática, depois da hepatectomia parcial poderia subsequentemente ser translocada para dentro do núcleo, passando pelo aumento da concentração no citosol reportado por MacMANUS et alii (1981).

Mais evidência para a importância do cálcio mediada pelas ações da calmodulina e complexos Ca-calmodulina foi anexada a uma série de outros experimentos, pela habilidade de purificada anti-calmodulina IgG, prevenir a síntese de DNA, mesmo em culturas com níveis baixos de cálcio, fato também verificado quando se utilizou  $\text{La}^{3+}$ , o qual tem a capacidade de interromper o fluxo transmembrana de cálcio (JONES et alii, 1982). Assim, o envolvimento da calmodulina na síntese de DNA e expressão de genes (SERRATOSA et alii, 1988), bem como em neoplasias (WEI; MORRIS; HICKIE; 1982), sugere que o metabolismo de calmodulina também está alterado na transformação oncogênica (MacMANUS et alii, 1981), o que reforça os encontros sobre o papel do cálcio, mediando a síntese de DNA e a proliferação celular através de concentrações muito baixas que são moduladas por calmodulina via complexos Ca-calmodulina.

Além destes mecanismos, uma vez que KAO et alii (1990) comprovaram que a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  pode regular estágios específicos da mitose, os níveis de AMPc e ativação do sistema fosfoinositídeo também concorrem para o restabelecimento do fígado parcialmente hepatectomizado. Como nos grupos de animais submetidos aos antagonistas de receptores histamínicos foi verificado um incremento no *turnover* do cálcio (Fig. 7), isto significa que embora os receptores histamínicos possam estar envolvidos e por conseguinte a histamina desempenhe algum papel, uma vez que os níveis no sangue e no fígado do autacóide, estão aumentados as 24 h da regeneração hepática, exatamente quando ocorre a máxima atividade mitótica (CHAMBON; MOULINOX; FONTAINE 1977), pelo menos nas fases iniciais da regeneração hepática, em relação ao processo de mobilização de cálcio, outros mecanismos devem estar concorrendo paralelamente sendo mediados por uma série de outras substâncias como hepatopietinas (MICHALOPOULOS et alii, 1991) hormônios, fatores de crescimento (MICHALOPOULOS, 1992; STRÖMBLAD & ANDERSSON, 1993) etc. Inclusive, FERRERO et alii (1994) recentemente, demonstraram que ativação de específico gene de

crescimento (gas-6) é desencadeada pela interação de catecolaminas com subsequente mobilização de cálcio, via interação com receptores adrenérgicos no fígado em regeneração. Sendo que posteriormente a expressão máxima as 16 h deste gene é mediada pela interação de cálcio com calmodulina, independentemente das catecolaminas.

WEI; MORRIS; HICKIE (1982) tentando correlacionar os níveis de calmodulina, cálcio e magnésio em hepatomas e fígado em regeneração constataram um aumento significativo estatisticamente para calmodulina em hepatomas, acompanhado de importante incremento nos níveis de cálcio e magnésio. Durante a regeneração hepática, estes autores constataram ainda um pequeno mas significativo aumento de magnésio no fígado, 24 h após hepatectomia parcial. Como o magnésio é um cátion fisiologicamente mobilizado em vários sistemas bio-moleculares, os encontros de vários autores (RUBIN, 1975; CORREIA; BATY; WILLIAMS JR 1987; SZELENYI, 1991) sugerem que o magnésio desempenha um importante papel também na regulação do metabolismo e do crescimento celular, mas que entretanto, como cálcio e fósforo, não sofre alterações significativas no soro conforme foi constatado neste experimento (Fig. 9).

Na realidade os resultados obtidos confirmam o trabalho de AL-OTHMAN et alii (1986) que trabalhando com ratos parcialmente hepatectomizados, e avaliando os níveis de zinco, cobre, magnésio e cálcio nos tempos de 24, 48, 96, 168 e 336 h da regeneração hepática, constataram que os níveis de cálcio e magnésio, não sofrem alterações significativas no plasma.

Segundo SZELENYI (1991) 45% do Mg é encontrado intracelularmente, sendo um cátion essencial para a ativação de muitos sistemas enzimáticos (alguns dos quais vistos na Revisão da Literatura), desempenhando significativa função na transmissão neuromuscular, excitabilidade muscular, integridade mitocondrial, fosforilação oxidativa, síntese protéica, estabilidade nucléica, permeabilidade de membrana etc.

Apesar destas considerações e a Tabela 10 listar alguns estados patológicos nos quais Mg sofre alterações no soro, a dificuldade da interpretação reside inicialmente no fato de que considerando um decréscimo nos níveis de Mg no soro, isto poderia estar relacionado ao curso de uma patogenia ou seria apenas uma consequência.

De qualquer maneira os casos de hipermagnessemia podem ocorrer mais frequentemente em doenças renais, enquanto, os casos de hipomagnessemia seriam uma condição mais comum, apesar de entretanto, não estar definida uma relação clara entre os níveis intracelulares e soro, de maneira semelhante como acontece com cálcio e fósforo, em função da grande capacidade de mobilização compartimental destes elementos.



Tabela 10. Algumas alterações relacionadas com hipo- ou hipermagnessemia (SZELENYI, 1991).

Hipomagnessemia	Hipermagnessemia
Depois de perda extrema de fluido gastrointestinal	Doença de Addison
Pancreatite aguda	Uremia aguda
Terapia com drogas (antibióticos como gentamicina, carbenicilina)	Uremia crônica
Alcoolismo ( <i>Delirium tremens</i> , Cirrose pós-alcoólica)	
Mal absorção gastrointestinal	
Colite ulcerosa	
Kwashiorkor	
Coma diabético	
Hiperparatireoidismo	
Hipertireoidismo	
Hiperaldosteronismo	
Arteriosclerose	
Enfarto cardíaco e cardiomiopatias	
Doenças osteolíticas malignas	

Como a análise estatística demonstrou que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos tratados e controles (Tabela 6), estes resultados sugerem que antagonistas de receptores histamínicos utilizados neste experimento, não interferem com o equilíbrio compartimental que se promove com efeito ao  $Mg^{2+}$  durante a regeneração hepática, embora se saiba que o cátion participe ativamente de vários sistemas enzimáticos (VALLARI & PIETRUSZKO, 1984), sua deficiência promova inibição da erupção dental, com conseqüente redução do número de mitoses nos tecidos apicais (KIELY & DOMM, 1977), o elemento seja sequestrado por carcinosarcoma, depletando o hospedeiro até que a perda de magnésio tenha sido repostada (CUMMINGS; WILLMOTT; CALMAN 1984) e principalmente, trabalhando com  $Ca^{2+}$  na incorporação e aumento da síntese de

polifosfoinositídeos através de quinases dependentes de  $Mg^{2+}$  (HEGEWALD et alii, 1987).

Apesar das alterações do metabolismo do fosfato inorgânico (Pi) também poderem ser divididas em hiper- ou hipofosfatemia, tal como com  $Mg^{2+}$ , KEMP & BEVINGTON (1992) agrupam-nas basicamente em dois tipos:

a. Tipo I - onde ocorre uma mudança na quantidade total de fosfato dentro do organismo em função de uma alteração na absorção e/ou excreção;

b. Tipo II - na qual há uma redistribuição patológica do fosfato dentro do corpo, especialmente entre o fluido intra e extracelular.

Com isto, a maior dificuldade no estudo do Pi em células e conseqüentemente de suas alterações patológicas, é que ele pode ser rapidamente mobilizado e/ou metabolizado incorporando-se através de diferentes compostos fosfo-orgânicos, tais como nucleotídeos, ácidos nucléicos, fosfocreatina, intermediários glicolíticos, fosfolipídeos etc. Desta maneira, grande quantidade de P também pode ser liberada para o fluido extracelular a partir destes compostos quando submetidos a hidrólise. Assim, os organismos vivos em condições normais, limitam grandes mudanças que porventura possam ocorrer, controlando os níveis de P em patamares estáveis dentro e entre os compartimentos. Entretanto, em determinadas condições como isquemia do miocárdio (MATHUR & CASE, 1973), ou outras condições isquêmicas que apresentem morte celular (MAY & BERENSON, 1983), podem ser suficientes para aumentar a concentração de Pi no plasma (ANDERSEN et alii, 1989), inclusive depois de quimioterapia para condições malignas (BOLES et alii, 1984).

Entretanto, depois da hepatectomia parcial as alterações que ocorrem no soro, diferem daquelas que ocorrem durante necrose celular (KOZLOWSKI JR & MATTOS F<sup>o</sup>, 1995), assim enquanto se observa aumento do Pi intracelular durante a regeneração hepática através de  $^{31}P$ -NMR (CAMPBELL et alii, 1990; FARGHALI et alii, 1994), os níveis de fósforo no soro de ratos parcialmente hepatectomizados não aumentam (SEKAS & COOK, 1979), muito menos os níveis circulantes de Pi (ÉTHIER et alii, 1990).

SEKAS & COOK (1979) acompanhando os níveis de fósforo no soro, nos períodos de 6, 12, 24, 36, 48, 168 e 336 h da regeneração hepática, constataram inclusive, um significativo decréscimo 12 h após a cirurgia, precedendo a máxima atividade mitótica. Segundo estes autores, nos demais tempos não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratado e controle. Conseqüentemente, os resultados obtidos (Tabela 5) experimentalmente confirmam que durante a regeneração hepática nos tempos de 6, 24 e 360 h não existem diferenças estatisticamente significantes no soro (Fig. 8), sendo que isto provavelmente ocorre devido ao rápido *turnover* do fósforo, mantendo em eficiente equilíbrio, níveis constantes de Pi. Estes níveis sugerem ainda, que não ocorrem interferências de antagonistas de receptores histamínicos, embora o sistema e o metabolismo fosfoinositídeo estejam

desempenhando suas complexas funções para o restabelecimento do fígado que foi parcialmente removido.

De qualquer maneira, KEMP & BEVINGTON (1992) em importante artigo de revisão comentam que muito da fisiologia e da fisiopatologia do metabolismo celular do fosfato e por conseguinte do fósforo, não é ainda compreendido. Com isto, os níveis no plasma de Pi se constituem ainda em parâmetro difícil de ser interpretado, em face da aparente habilidade das células em regular o Pi celular, na presença de alterações no plasma, bem como, quando as alterações dentro ou fora das células são a causa das oscilações no plasma, porque as mudanças no Pi intracelular estão na dependência da espécie de mecanismo que desencadeou a alteração.

Enquanto elementos como Ca, P, Mg apresentam-se em quantidades bem acima dos limites de detecção de vários métodos, a microanálise de silício em amostras biológicas tem sido reportada como sendo particularmente constituída de escassas metodologias (HOLDEN; LITTLEJOHN; FELL; 1992) e de difícil reprodutibilidade, especialmente em função da possibilidade de contaminação por sílica e ác. polisílico, oriundos da manipulação da amostra em materiais de vidro (CHAUSMER & WALLACH, 1990) e do contato com poeira do ar (McGAVACK; LESLIE; TANG KAO; 1962). Consequentemente, não pode ser descartada no presente trabalho a possibilidade de ter ocorrido contaminação de alguma espécie, durante obtenção e preparo das amostras. Isto poderia justificar a maior variabilidade encontrada em alguns grupos (Tabela 7) o que impediria a obtenção do nível de significância preconizado para análise estatística, destarte os resultados sugerirem um aumento na concentração de silício no soro (Fig. 10) que poderia estar correlacionada com atividade e síntese da nova matriz extracelular (MARTINEZ-HERNANDEZ; DELGADO; AMENTA; 1991), bem como no aumento quantitativo mitocondrial verificado durante o transcurso do processo da regeneração hepática (MURRAY; STRECKER; SILZ; 1981).

Na realidade a interpretação torna-se bastante complexa uma vez que muitas variáveis (provavelmente algumas ainda desconhecidas) podem interferir com a concentração do silício no soro. Tanto isto é verdade que realizamos o experimento totalmente casualizado com ratos machos nas mesmas condições experimentais, uma vez que CHAUSMER & WALLACH (1990) fazem referência a variabilidade provocada na concentração do soro pelo sexo, idade, castração, adrenalectomia e tireoidectomia, numa relação provavelmente com regulação hormonal, difícil de explicar e num campo totalmente aberto a pesquisa.

Outras variáveis como os efeitos de altas concentrações de sódio, potássio, cálcio e magnésio sobre o sinal do silício em amostras biológicas, tem sido amplamente estudados em várias metodologias (ROBERTS & WILLIAMS, 1990; HOLDEN; LITTLEJOHN; FELL; 1992) demonstrando que a determinação de elementos classificados como refratários, tais como silício, não sofre interferência, podendo inclusive ser incrementada com vantagens se adicionado cálcio e magnésio nos padrões e amostras de

soluções. Além disso, a utilização da Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Induzido (ICP-AES) implica em submeter a amostra a temperaturas de 6.000 a 10.000 °K o que elimina a possibilidade de outras interferências que são verificadas em outros métodos. Por exemplo, HUANG (1994) relata que fosfatos de cálcio podem se ligar ao silício formando polímeros de fosforossilicato que são preferencialmente estáveis em altas temperaturas como 1.400 °C e que não se dissociam completamente resultando numa supressão do sinal do silício.

Segundo ADLER; ETZION; BERLYNE (1986) a forma na qual silício está presente no plasma sanguíneo é preferencialmente  $\text{Si(OH)}_4$ , embora admita-se a possibilidade que outros compostos tais como aluminossilicatos possam estar presentes. Estes pesquisadores, utilizando método de precipitação de proteínas com ácido tricloroacético demonstraram que todo silício presente no plasma não está ligado a proteínas, com fígado, pulmões e rins apresentando rápido *uptake* quando injetado  $^{31}\text{Si}$  intracardiacamente em ratos. Isto vem de encontro ao trabalho de MEHARD & VOLCANI (1975) que também observaram a mais alta incorporação de  $^{31}\text{Si}$  sendo promovida pelos rins e fígado, numa relação direta entre os níveis de silício no sangue com a atividade renal. Desta maneira, os elevados níveis de silício no soro estão correlacionados com insuficiência ou distúrbios renais que dificultam a eficiente excreção deste elemento através da urina (BERLYNE & CARUSO, 1983).

ROBERTS & WILLIAMS (1990), confirmam os trabalhos anteriores demonstrando que o elemento silício está presente no soro e na urina na forma solúvel do ácido silícico, com as concentrações no soro aumentadas até 20 vezes em pacientes com insuficiência renal crônica sob hemodiálise. Nos pacientes não submetidos a hemodiálise mas com insuficiência renal crônica, as concentrações de silício no plasma aumentam com o decréscimo da taxa de filtração glomerular. Além disso, estes pesquisadores verificaram que as concentrações de silício na urina de pacientes saudáveis suplantam as concentrações no soro na proporção de 20 a 100 vezes. Conseqüentemente, o aumento dos níveis de silício no soro dos animais tratados, sugere que durante a regeneração hepática os antagonistas de receptores histamínicos podem estar envolvidos com algum tipo ou quadro de insuficiência renal, o que justificaria os níveis encontrados no soro ao tempo de 6 e 24 h (Tabela 7) numa tendência a retornar a normalidade as 360 h num esforço fisiológico de manutenção de níveis sanguíneos mais baixos (Fig.10). Além disso, sabendo-se que a terfenadina tem predominantemente a via de eliminação fecal (não devido a má absorção mas a excreção biliar), com a eliminação sendo aproximadamente 10 vezes maior que a via urinária (LEESON et alii, 1982), os rins podem ter sofrido sobrecarga suficiente para provocar um grau de nefrotoxicidade em função da hepatectomia parcial. Sendo que no processo da regeneração hepática, a medida que o fígado estaria se recuperando, a terfenadina poderia ser mais eficientemente eliminada pela via biliar deixando de sobrecarregar os rins. O fato da terfenadina ser

rapidamente e extensivamente (>99%) metabolizada no fígado em dois grandes metabólitos (McTAVISH; GOA; FERRILL; 1990): um derivado de ácido carboxílico (metabólito I) o qual é produto da oxidação e tem aproximadamente um terço da atividade antihistamínica *in vitro* da terfenadina e um derivado piperidina-carbinol -  $\alpha,\alpha$ -diphenyl-4-piperidinylmethanol (metabólito II) o qual aparentemente não apresenta qualquer atividade antihistamínica (Fig. 13), aliado ao fato da terfenadina praticamente não ser recuperada na forma inalterada tanto nas fezes quanto na urina (GARTEIZ et alii, 1982; LEESON et alii, 1982) reforça a idéia da possibilidade de alteração renal, compatível com elevação dos níveis de silício no soro nos grupos de tratamento terfenadina e terfenadina + cimetidina, em função da insuficiência hepática criada artificialmente pela técnica da hepatectomia parcial (MATTOS F<sup>o</sup>, 1976).

Embora a cimetidina seja eliminada primordialmente nos rins na forma inalterada com pequenas quantidades recuperadas nas fezes, verifica-se que em situação patológica de cirrose hepática a excreção urinária pode cair até a 42% (GILMAN et alii, 1987).

Segundo ROCHA JR (1994) aproximadamente 70% da cimetidina é eliminada em condições normais pelos rins na forma inalterada. O restante nas formas de sulfóxido e 5-hidroxi metil-cimetidina, com apenas 10% da eliminação total da droga sendo feito através das fezes e o restante por via renal. Entretanto, este autor cita que a cimetidina apresenta uma grande concentração na bile 1 a 2 horas após administração, o que vem de encontro a informação de BROGDEN et alii (1978), que reportando-se ao trabalho de SPENCE et alii (1977) demonstra que a concentração na bile 1 a 2 horas depois de uma dose de 800 mg de cimetidina atinge 12,2 a 40,2  $\mu\text{g/ml}$  com concentrações correspondentes no sangue portal e sangue venoso de 3,5 a 12,1  $\mu\text{g/ml}$  e 2,0 a 7,7  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. Estes dados corroboram a efetiva participação do sistema porta na biodisponibilidade da cimetidina, que estaria promovendo em função da hepatectomia parcial, uma saturação da capacidade

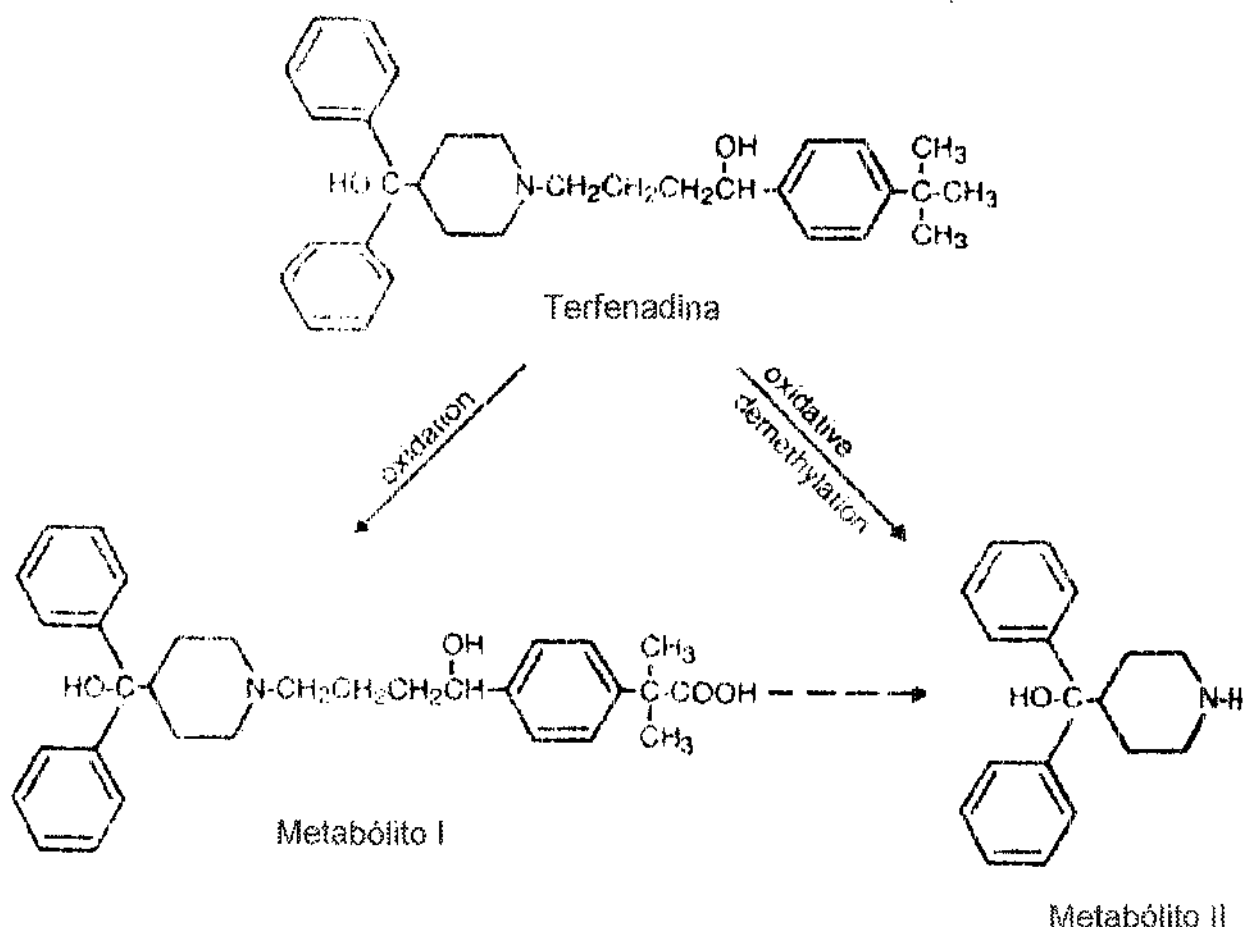


Fig.13 Metabolismo da terfenadina (GARTEIZ et alii, 1982).

renal diminuindo a excreção urinária que poderia refletir no aumento dos níveis de silício para o grupo tratado com cimetidina.

Destarte estas discussões serem relevantes, o relato que na dieta normal de humanos, 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de silício são ingeridos diariamente (MEHARD & VOLCANI, 1975), bem como a observação de ADLER; ETZION; BERLYNE (1986) que osso e pele alteram os seus níveis de  $^{31}\text{Si}$  de acordo com mudanças nas concentrações plasmáticas num rápido e eficiente equilíbrio, sugerem um contínuo *steady-state* entre sangue e estes tecidos demonstrando que os níveis de silício na dieta e na água "*ad libitum*" podem definir a razão deste estado de equilíbrio, concorrendo inclusive na justificativa para variabilidade - 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (CARLISLE, 1972), 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (CHAUSMER & WALLACH, 1990) - encontrada no sangue de mamíferos, para os níveis normais de silício. Um exemplo bastante interessante é a nefrite intersticial crônica conhecida como *Nefropatia dos Balcãs* e encontrada somente em certas regiões da antiga Iugoslávia, Bulgária e Romênia que está ligada com uma forma de silicato solúvel encontrada na água de beber daquela região (MARCOVIC & ARAMBASIC, 1971), o que confirma os dados de ROBERTS & WILLIAMS (1990) que relatam o aumento de silício no soro associado a insuficiência renal numa relação direta da excreção urinária do elemento dependente dos níveis na dieta.

Entretanto, como os níveis de fósforo (Fig.8) e especialmente de magnésio (Fig.9), não sofreram aumentos significativamente diferentes dos grupos controles, isto também sugere que durante este experimento os valores obtidos para os níveis de silício podem não corresponder a qualquer quadro de insuficiência ou alteração renal, o que desta forma ampliaria a abrangência e o significado dos dados obtidos, demonstrando que silício pode estar desempenhando um papel na regeneração hepática que necessita ser melhor investigado.

GESTRING & SOLTANPOUR (1987) avaliando a disponibilidade de boro em vários solos e tentando verificar níveis de toxicidade para determinada espécie vegetal constataram que os níveis deste elemento normalmente são reduzidos. Com isto, a dificuldade analítica também é verificada na determinação de boro em amostras biológicas em função das baixas concentrações encontradas em vários tecidos e fluidos biológicos, além de que as amostras podem ser rapidamente contaminadas durante a preparação, especialmente se ácidos minerais são utilizados em combinação com vidros de borosilicato (VANHOE et alii, 1993). Desta forma, ao minimizar a manipulação das amostras, pré-tratando-as apenas através da técnica da diluição direta conforme Materiais e Métodos, diminuimos o risco de contaminação e otimizamos a qualidade da determinação. Além disso, como precaução adicional, o sistema de introdução da amostra era constantemente limpo por alguns minutos depois da medida de cada solução (escolhida de maneira randomizada), monitorando-se os níveis dos brancos/padrões. Segundo VANHOE et alii (1993) um tempo de lavagem de 2 min é suficiente para reduzir a nível aceitável os "efeitos de memória" que podem ocorrer com boro. Estes pesquisadores informaram ainda, que não encontraram diferenças significativas entre água, ácido nítrico 0,14 M e ácido nítrico 1,4 M utilizadas como soluções de lavagem. Consequentemente, como foi utilizada H<sub>2</sub>O como diluente no preparo das amostras de soro, ela também foi empregada como solução de lavagem. Esta precaução tomada para limpeza do "efeito de memória" (cf. VANHOE et alii, 1993), significa que depois da medida de uma amostra contendo boro, pode ocorrer a manutenção do sinal deste elemento, o que pode levar a um erro sistemático para a próxima amostra, que desta maneira através da lavagem, da randomização da ordem de análise das amostras e monitorização dos brancos/padrões foi evitada.

A determinação de vários elementos químicos simultaneamente também é otimizada, em função das características peculiares ao sistema ICP-AES que elimina uma série de outras interferências pela leitura em comprimentos de onda específicos selecionados adequadamente. Por exemplo, os comprimentos de onda característicos do B são 2088, 2089, 2496 e 2497 Å com razão de intensidade do analito para radiação de fundo ( $I_n / I_b$ ) respectivamente de 25, 30, 53 e 63 (TAMAT; MOORE; ALLEN; 1987). Assim, a linha de emissão do boro 2496 Å foi escolhida para análise, preferencialmente que a linha 2497 Å, na base da menor possibilidade de interferência do ferro e do fósforo, conforme TAMAT;

MOORE; ALLEN (1987) e porque existem outros elementos os quais tem linhas de emissão próximas a do B I 2497 Å como tântalo, germânio e tungstênio, segundo KUMAMARU et alii (1986).

Desta maneira, os resultados obtidos sugerem que B ou alguma molécula que apresente boro em sua composição, pode estar envolvida no processo da regeneração hepática, uma vez que 6 h após a hepatectomia parcial, em um período de tempo que antecede o pico de atividade mitótica (FAUSTO & MEAD, 1989), a média dos níveis nos soros controle, foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ), decaindo para níveis mais baixos a medida que se processa a restauração do fígado, completado ao tempo de 360 h (Tabela 8) e com isto aproximando-se dos valores normais encontrados por TEMPLETON; PAUDYN; BAINES (1989).

Como existem uma série de compostos de boro que apresentam natural afinidade por tecidos em rápido crescimento, especialmente tumores malignos, tais como *4-(dihydroxyboryl)phenilalanine*, *mercaptoundecahydro-closo-dodecaborate dianion* (SHELLY et alii, 1992) existe a possibilidade de que a incorporação possa ser carregada através de diferentes formas de moléculas de boro que na avaliação do ICP-AES é otimizada para a determinação apenas do elemento. Além disso, SHELLY et alii (1992) cita outros autores que demonstraram que determinados fosfolípidos podem funcionar como eficientes moléculas carreadoras preferencialmente para células neoplásicas, o que levanta a suspeita que o sistema fosfoinositideo também pode estar envolvido na atividade acentuada de crescimento, trabalhando paralelamente ou provavelmente interdisciplinarmente aos níveis de boro. Isto é reforçado pelo encontro que o antagonista de receptor H<sub>1</sub>, isoladamente ou associado foi capaz de impedir o aumento de boro 6 h após a hepatectomia parcial no soro dos animais tratados (Fig. 11) enquanto a cimetidina embora tenha promovido um decréscimo na concentração de boro no soro 6 h após a hepatectomia parcial não foi estatisticamente diferente do grupo controle.

A discussão fica mais interessante no momento que associamos os resultados encontrados por KOZLOWSKI JR. & MATTOS F<sup>o</sup> (1995) que reportaram um aumento significativo da enzima transportadora  $\gamma$ -glutamilttransferase no soro de animais tratados com terfenadina e terfenadina + cimetidina, 360 h da regeneração hepática, exatamente ao mesmo tempo onde foi constatado aumento significativo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de boro no grupo de animais tratado com terfenadina + cimetidina vs grupo controle (Fig.11). Este aumento da concentração de boro no grupo de animais submetido a terfenadina + cimetidina, acompanhado pelos resultados dos grupos tratados separadamente, uma vez que as médias dos níveis de boro não foram estatisticamente diferentes no tempo de 360 h entre estes grupos, sugere a possibilidade de intrincado e complexo mecanismo de regulação envolvendo histamina (através de incorporação celular e/ou via ativação de receptor), boro (provavelmente através de algum complexo BnHy), receptores histamínicos



(especialmente receptor H1) e sistema de transporte na membrana (por exemplo,  $\gamma$ -glutamyltransferase).

Como GESPACH; MARREC; BALITRAND (1985) demonstraram que  $^3\text{H}$ -histamina em contato com células leucêmicas é "capturado" via processo irreversível, não podendo ser removido, mesmo depois de prolongada lavagem, num sistema dependente de concentração, tempo, temperatura e consumo de energia, com agonistas e antagonistas interagindo com o sistema de transporte da histamina sem alterar a viabilidade celular, duas grandes questões são levantadas neste interessante trabalho: 1. Por que existe um sistema de transporte com alta capacidade e especificidade para histamina em granulócitos imaturos? e 2. Por que estas células realizam este processo de incorporação inclusive num sistema complexo envolvendo transporte ativo?

As observações de TASAKA & NAKAYA (1987) confirmam os resultados obtidos anteriormente pelo grupo de pesquisadores franceses demonstrando a existência de um sistema de transporte específico que inclui síntese de proteína, uma vez que estes autores encontraram efeito inibitório com cicloheximide e actinomicina D, na incorporação específica de  $^3\text{H}$ -histamina. Além disso, a descoberta de outra via metabólica histamínica, sendo mediada através da  $\gamma$ -glutamilação da histamina, mediada por enzimas transportadoras de membrana como a transglutaminase e  $\gamma$ -glutamyltransferase, em assunto revisto por KOZLOWSKI JR (1991), através da produção de  $\gamma$ -glutamylhistamina (FESUS et alii, 1985) que pode ser incorporada para dentro das células, aumentam as indagações sobre o papel da histamina em tecidos em rápido crescimento, fato amplamente estudado por diversos pesquisadores (TAGUCHI et alii, 1982; NOLTE; STAHL SKOV; LOFT 1987), inclusive sob o ponto de vista de fosforilação de proteínas (TASAKA; NAKAYA; NONAKA 1990).

Como proteína-quinases através de reações de fosforilação, podem modificar a atividade da  $\gamma$ -glutamyltransferase (KOLESNICHENKO & CHERNOV, 1986), estando envolvidos, entre outras situações com alterações neoplásicas (COUTURIER; BAZGAR; CASTAGNA 1984) e fígado em regeneração (OKAMOTO et alii, 1988), onde foi constatado elevação no soro dos níveis de B 6 h após hepatectomia parcial (Fig.11), as observações referentes a existência de receptores intracelulares para histamina denominados [Hic], confirmam que a histamina pode desempenhar funções através da sua incorporação ou *uptake* na intimidade das células, suportando a hipótese que histamina atuando intracelularmente pode regular a regeneração hepática, possivelmente pela promoção de síntese de DNA e transcrição do RNA (BRANDES et alii, 1992), numa relação com B uma vez que antagonistas de receptores histamínicos, especialmente H1, foram capazes de suprimir o aumento deste elemento no soro dos animais tratados 6 h após hepatectomia parcial em comparação com animais do grupo controle (Fig.11).

Paralelamente, muitos estudos sobre o elemento estrôncio citados por WALLACH & CHAUSMER (1990) tem demonstrado que os seus níveis são mais altos em animais que no homem, tendendo a aumentar com a idade, de tal maneira que os níveis em organismos adultos são mais altos que em fetos e crianças. Estes pesquisadores explicam que embora os sistemas gastrointestinal e renal discriminem Sr em favor da retenção de cálcio, taxas mais altas de Sr/Ca na dieta de animais em relação a humana, se constituem provavelmente, na explicação para os níveis mais altos de estrôncio especialmente no tecido ósseo, numa relação do aumento dos níveis com a idade em função da exposição ambiental ao Sr no solo e/ou água, especialmente em áreas onde a presença de Sr tende a ser mais alta. Isto poderia explicar parcialmente os resultados mais expressivos obtidos nos grupos controles em relação as observações efetuadas por LEBLONDEL; MAURAS; ALLAIN (1986) e TEMPLETON; PAUDYN; BAINES (1989), uma vez que os controles sendo também animais hepatectomizados também poderiam estar refletindo um decréscimo na concentração no soro de Sr (Tabela 9) em função do processo de regeneração hepática após hepatectomia parcial, embora isto provavelmente não esteja ocorrendo em função dos valores obtidos não terem sido significativamente diferentes quando submetidos a análise estatística.

Diversos trabalhos (ANTTILA & ANJA, 1987) realizados em diferentes regiões do planeta (SHIRAISHI et alii, 1987) confirmam que Sr normalmente está presente em amostras biológicas em baixas concentrações (WOHLGEMUTH; STANEK; PENAZ; 1987). Embora os níveis sejam dependentes daqueles presentes na dieta/água (GRAVINA; CABRINI; CARRANZA JR; 1970), a possibilidade de serem modificados pela taxa Sr/Ca e a versatilidade do cátion na substituição do Ca, aliado ao fato que Sr tem sua localização essencialmente extracelular (LEBLONDEL; MAURAS; ALLAIN; 1986), sugere que Sr pode desempenhar algum papel nos intrincados mecanismos bio/fisiológicos (RAEBURN & RODGER, 1987). Embora no presente trabalho não se tenha verificado alterações estatisticamente diferentes para os grupos e sub-grupos controles e submetidos a tratamento com terfenadina, cimetidina ou ambos (Fig. 12).

A bem da verdade, os resultados obtidos sugerem que receptores histamínicos e por consequência a histamina, desempenham importantes funções no fígado em regeneração após hepatectomia parcial, estando correlacionados com metabolismo de cálcio, presença no soro de silício, e especialmente, de boro através de mecanismos que necessitam ser estudados em maior profundidade e extensão. Com isto, a determinação simultânea de múltiplos elementos em uma única amostra biológica, representa um importante avanço, na pesquisa e diagnóstico bio-médico, especialmente no que tange ao comportamento de elementos traços.

O crescimento da lista de elementos de interesse biológico fazem da análise de multielementos uma questão de necessidade muito mais que de conveniência. Por que frequentemente, a análise deve ser

processada em quantidades reduzidas e instáveis de amostras, bem como requerida a comparar concentrações de substâncias ou moléculas potencialmente interferentes, que são eliminadas com a atomização e ionização dos elementos, embora estudos estejam ainda por definir parâmetros adequados na interpretação dos dados obtidos em função da variabilidade biológica, clínica e patológica para todos os analitos de interesse.

## **8. CONCLUSÕES**

## 8. CONCLUSÕES

Em função das condições experimentais utilizadas e dos resultados obtidos, foi-nos permitido concluir que:

**7.1** As concentrações de Ca, P, Mg e Sr no soro de ratos parcialmente hepatectomizados, não foram significativamente diferentes nos períodos de 6, 24 e 360 h após a cirurgia.

**7.2** A média das concentrações de B no soro de ratos parcialmente hepatectomizados foi significativamente mais elevada as 6 h após hepatectomia parcial.

**7.3** Os níveis de Si sugerem existir um aumento na concentração deste elemento no soro durante a regeneração hepática.

**7.4** Terfenadina, Cimetidina e Terfenadina + Cimetidina não alteraram os níveis de P, Mg e Sr no soro de ratos, nos períodos de 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial.

**7.5** Terfenadina, Cimetidina e Terfenadina + Cimetidina promoveram um maior *turnover* de Ca no soro de ratos parcialmente hepatectomizados.

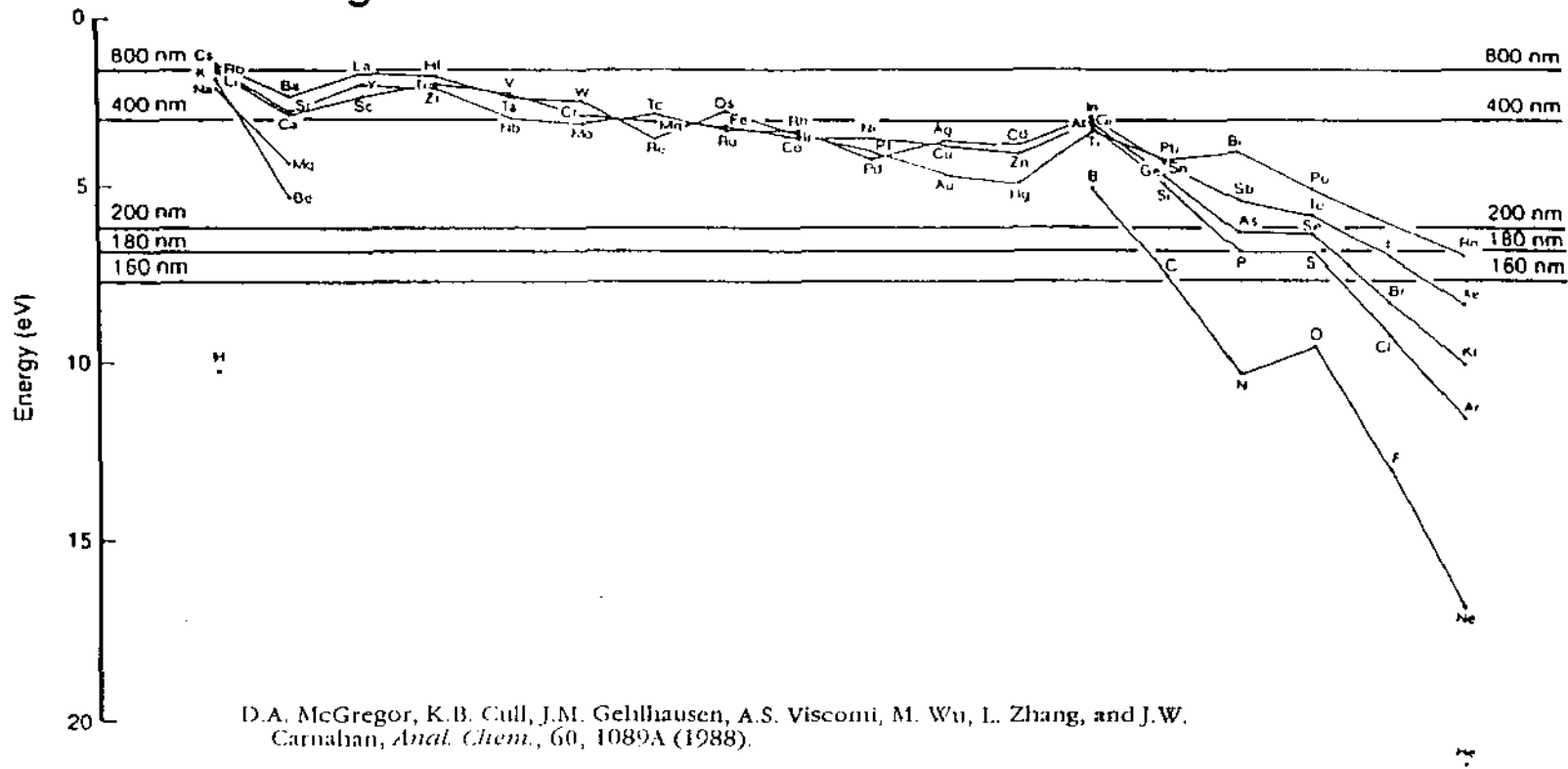
**7.6** Terfenadina e Terfenadina + Cimetidina inibem o aumento da concentração de B verificado as 6 h no soro de ratos parcialmente hepatectomizados.

**7.7** Terfenadina, Cimetidina e Terfenadina + Cimetidina parecem impedir o aumento de silício no soro de ratos parcialmente hepatectomizados.

**7.8** Terfenadina + Cimetidina induziram o aumento da concentração de B no soro de ratos, 360 h após hepatectomia parcial.

## **9. APÊNDICES**

## Energies of the First Excited State of the Atoms



D.A. McGregor, K.B. Cull, J.M. Gehlhausen, A.S. Viscomi, M. Wu, L. Zhang, and J.W. Carnahan, *Anal. Chem.*, 60, 1089A (1988).

(BARNES s/d)

APPENDICE I

## APÊNDICE 2

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) nos padrões analíticos

Ca	P	Mg	Si	B	Sr
10,07	10,13	10,14	10,09	1,009	9,970
9,514	10,12	9,221	9,876	0,951	9,751
9,687	9,943	9,633	9,574	0,933	9,466
9,774	10,24	9,792	9,906	0,983	10,05
9,559	9,993	9,435	10,17	0,950	9,848
9,696	10,63	9,636	10,07	0,966	10,10
10,00	9,990	9,935	9,549	0,996	9,550
10,24	10,06	9,769	9,892	0,977	9,956
10,44	10,33	9,905	9,724	0,993	10,03
10,18	9,975	10,07	9,784	1,031	9,958
10,79	9,530	10,31	10,10	1,058	9,650
10,74	9,924	10,30	9,439	1,030	9,775
10,13	9,803	10,10	10,13	1,022	9,910
10,25	9,736	9,916	10,33	1,000	9,872
10,42	10,02	9,918	9,959	1,001	10,07
10,38	9,917	9,891	9,934	0,992	9,689
10,37	10,26	10,39	9,663	1,033	9,981
10,25	10,39	10,28	9,646	0,997	9,973
10,35	9,973	10,32	10,04	1,030	9,999
10,18	10,02	9,537	9,981	0,905	9,944
10,67	9,607	10,48	9,969	1,025	9,894
10,13	9,709	10,15	9,470	0,961	9,905
10,55	10,05	9,923	9,384	0,935	10,08
10,30	9,931	10,20		1,029	10,01
10,14	9,861	10,11		1,016	10,02
10,42	9,419	10,34		1,056	9,742
10,08	9,468	10,11		1,033	9,692
10,29		10,11		1,019	
9,974		9,957		0,999	



## APÊNDICE 3

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo controle  
6 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
57 C1	81,16	145,0	21,19	3,072	0,736	0,238§
77 C1	78,82	322,7	37,10	<i>f</i>	0,502	0,168§
67 C1	68,41	187,6	29,44	6,488	0,827	0,168§
72 C1	88,40	102,1	30,92	3,041	0,915	0,171§
62 C1	90,63	230,8	22,48	2,860	0,611	0,143§
87 C1	66,23	144,3	27,99	3,069	0,040£	0,286§
82 C1	74,16	256,3	31,43	14,08	1,013	0,218§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 4

**Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo terfenadina 6h após hepatectomia parcial**

<b>Amostra</b>	<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Mg</b>	<b>Si</b>	<b>B</b>	<b>Sr</b>
63 A1	66,91	248,3	34,79	50,91	0,322£	0,153§
68 A1	78,27	127,1	20,53	2,938	0,527	0,240§
73 A1	82,43	116,3	28,23	10,14	0,184£	0,183§
78 A1	86,92	265,7	55,75	2,523	0,485	0,261§
83 A1	71,23	174,0	22,26	12,54	0,062£	0,135§
88 A1	86,97	137,6	34,69	10,24	0,146£	0,223§

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 5

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo cimetidina 6 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
59 B1	81,81	114,6	26,62	2,634	0,205£	0,208§
64 B1	67,26	299,1	25,51	4,201	0,764	0,244§
69 B1	70,99	110,1	27,72	15,19	0,307£	0,162§
74 B1	75,80	84,65	27,32	<i>f</i>	0,266£	0,254§
79 B1	67,89	333,3	35,11	11,75	0,527	0,154§
84 B1	90,30	245,3	34,53	9,582	0,572	0,191§
89 B1	89,02	162,6	34,28	33,40	0,485	0,206§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 6

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo terfenadina + cimetidina 6 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
90 AB1	67,80	248,5	24,42	22,43	0,495	0,198§
80 AB1	69,49	241,4	26,62	8,920	0,144£	0,170§
70 AB1	89,20	155,6	32,57	<i>f</i>	0,338£	0,249§
75 AB1	83,56	270,8	37,48	<i>f</i>	0,332£	0,200§
65 AB1	84,23	206,6	34,91	<i>f</i>	0,511	0,180§
60 AB1	72,19	113,1	23,94	2,484	0,244£	0,148§
85 AB1	66,85	163,2	29,40	12,37	0,177£	0,137§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 7

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo controle 24 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
5 C2	78,37	260,6	41,98	<i>f</i>	0,511	0,200§
10 C2	77,19	237,9	42,84	<i>f</i>	<i>f</i>	0,176§
15 C2	67,27	173,3	33,73	15,88	0,049£	0,176§
19 C2	46,17	232,2	20,91	12,21	0,149£	0,103§
24 C2	89,25	167,1	32,80	4,691	0,484	0,233§
29 C2	62,53	123,0	20,82	<i>f</i>	0,125£	0,124§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 8

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo terfenadina 24 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
1 A2	58,99	236,5	26,80	<i>f</i>	0,325£	0,165§
6 A2	60,65	278,2	30,10	10,32	0,095£	0,176§
11 A2	93,73	167,1	44,47	<i>f</i>	0,240£	0,228§
16 A2	16,37	33,44	10,04	5,604	0,177£	0,073§
20 A2	61,48	225,3	33,15	<i>f</i>	0,261£	0,191§
25 A2	63,56	149,3	16,04	33,27	0,015£	0,120§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 9

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo cimetidina 24 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
2 B2	55,93	273,0	27,44	22,50	<i>f</i>	0,115§
7 B2	91,19	288,2	34,57	3,826	0,175£	0,248§
12 B2	82,34	170,5	37,01	2,866	0,024£	0,196§
17 B2	69,28	103,3	24,31	24,58	0,028£	0,215§
21 B2	62,75	164,4	21,34	0,906§	0,764	0,166§
26 B2	79,56	126,0	28,97	7,034	0,217£	0,197§
31 B2	64,83	86,83	17,07	4,586	0,195£	0,128§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 10

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo terfenadina + cimetidina 24 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
27 AB2	77,76	131,3	23,17	4,708	0,040£	<i>f</i>
18 AB2	74,48	271,4	32,79	4,559	0,319£	0,208§
22 AB2	62,62	191,8	30,90	<i>f</i>	0,196£	0,224§
13 AB2	83,43	151,7	34,84	<i>f</i>	0,284£	0,208§
32 AB2	52,76	108,2	14,62	2,523	0,096£	0,158§
3 AB2	65,91	234,6	31,96	26,30	0,073£	0,197§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )



## APÊNDICE 11

**Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo controle  
360 h após hepatectomia parcial**

<b>Amostra</b>	<b>Ca</b>	<b>P</b>	<b>Mg</b>	<b>Si</b>	<b>B</b>	<b>Sr</b>
39 C3	62,14	173,1	19,81	4,966	0,199£	0,106§
42 C3	78,23	159,8	39,26	13,82	0,269£	0,208§
50 C3	88,59	204,0	29,30	24,43	0,167£	0,164§
54 C3	65,22	219,0	25,58	11,83	0,024£	0,163§

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 12

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo terfenadina 360 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
34 A3	84,44	270,7	46,81	<i>f</i>	0,315£	0,190§
43 A3	100,0	126,5	24,39	12,98	0,314£	0,218§
47 A3	83,19	288,3	33,45	6,684	0,115£	0,202§
51 A3	107,6	59,70	24,46	4,982	0,845	0,182§
55 A3	64,98	217,9	24,27	2,571	0,124£	0,156§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 13

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo  
cimetidina 360 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
36 B3	83,20	244,2	42,43	<i>f</i>	0,205£	0,186§
40 B3	97,14	158,6	35,42	8,292	0,716	0,288§
44 B3	88,09	127,5	28,08	7,077	0,172£	0,238§
48 B3	80,69	247,5	31,55	<i>f</i>	0,278£	0,308§
52 B3	87,24	194,4	34,52	9,640	0,291£	0,190§
56 B3	99,98	163,1	29,65	2,948	0,228£	0,245§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## APÊNDICE 14

Níveis de Ca, P, Mg, Si, B e Sr ( $\mu\text{g/ml}$ ) no soro de ratos do grupo terfenadina + cimetidina 360 h após hepatectomia parcial

Amostra	Ca	P	Mg	Si	B	Sr
37 AB3	98,89	194,9	38,03	9,762	0,686	0,256§
45 AB3	86,24	243,2	29,11	10,40	0,772	0,123§
35 AB3	65,39	264,5	43,02	<i>f</i>	1,577	0,162§
41 AB3	119,1	181,2	33,59	<i>f</i>	1,150	0,287§
53 AB3	77,59	210,6	30,37	7,818	0,268£	0,146§
49 AB3	56,19	204,7	20,24	2,527	0,499	0,256§

*f* indica leitura não discriminada daquela da radiação de fundo

£ abaixo do limite quantificável (0,020  $\mu\text{g/ml}$ )

§ abaixo do limite quantificável (0,100  $\mu\text{g/ml}$ )

## **10. SUMMARY**

## 10. SUMMARY

Adult male albino rats (Wistar strain) were used to investigate the effects of selective antagonist of only peripheral histamine H<sub>1</sub>-receptors, Terfenadine and histamine H<sub>2</sub>-receptors antagonist, Cimetidine on the serum concentrations of elements Ca, P, Mg, Si, B and Sr, by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) during liver regeneration after partial hepatectomy. Seventy-three animals were randomly divided into three groups and were sacrificed respectively 6, 24 and 360 h postoperatively. Each group was divided into four sub-groups that received doses of Terfenadine (2mg/kg/day), Cimetidine (20mg/kg/day), Terfenadine (2mg/kg/day) + Cimetidine (20mg/kg/day) and NaCl 0,9% (Control), intraperitoneally during the experimentation. The results obtained suggested that P, Mg and Sr levels not modified in rat serum during liver regeneration, with Ca levels' exhibiting a significant *turnover* in the treated groups and Si, specially, Boron showing important changes.

## **11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADLER,A; ETZION,Z; BERLYNE,G. Uptake, distribution, and excretion of <sup>31</sup>silicon in normal rats. Am. J. Physiol. 251(Endocrinol. Metab.14):E670-E673, 1986.
2. AL-OTHMAN,K. et alii. Plasma levels of zinc, copper, magnesium and calcium in rats after partial hepatectomy. Acta Pharmac. Toxicol. 59:223-226, suppl. VII, 1986.
3. ANDERSEN,P. et alii. Serum and urinary phosphate during and after prolonged muscular ischaemia in non-exercising men and women. J. Int. Med. 226:149-155, 1989.
4. ANTTILA,A. & ANJA,A. Trace-element content in the enamel surface and in whole enamel of deciduous incisors by proton-induced X-ray emission of children from rural and urban Finnish areas. Arch. Oral Biol. 32(10):713-718, 1987.
5. BARNES, R. Inductively coupled plasma spectroscopy instrumentation. Short course on plasma spectrochemical analysis. Society for Applied Spectroscopy s/d 107 p.
6. BARTHOLEYNS,J. & BOUCLIER,M. Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. Cancer Res. 44(2):639-645, 1984.
7. BAZZI, M.D. & NELSESTUEN, G. Protein kinase C interaction with calcium: a phospholipid-dependent process. Biochemistry 29 (33):7624-7630, 1990.
8. BERLYNE,G.M. & CARUSO,C. Measurement of silicon in biological fluids in man using flameless furnace atomic absorption spectrophotometry. Clin. Chim. Acta 129: 239-244, 1983.
9. BERRIDGE,M.J. & IRVINE,R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction Nature 312(5992):315-321,1984.
10. BEVINGTON,A. et alii. Phosphate-sensitive enzymes: a possible molecular basis for cellular disorders of phosphate metabolism. Clin.Chem. Enzym. Comms. 4(4): 235-257, 1992.



11. BIERI,F. Peroxisome proliferators and cellular signaling pathways. A review Biol Cell 77: 43-46, 1993.
12. BLACKMORE,P. et alii. Role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of hepatocyte phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. J. Biol. Chem. 260(27):14477-14483, 1985.
13. BLUMENTHAL,N. The *in vitro* uptake of trace elements by hydroxyapatite. In.: PRIEST,N. & Van De VYVER,F. Trace metals and fluoride in bones and teeth. Florida, CRC Press, 1990. cap. 13 p.307-313.
14. BOLES,J. et alii. Acute renal failure caused by extreme hyperphosphatemia after chemotherapy of an acute lymphoblastic leukemia. Cancer 53: 2425-2429, 1984.
15. BRANDES,L. et alii. Intracellular histamine and liver regeneration: high affinity binding of histamine to chromatin, low affinity binding to matrix, and depletion of a nuclear storage pool following partial hepatectomy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184(2): 840-847, 1992.
16. BROGDEN, R.N. et alii. Cimetidine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in peptic ulcer disease. Drugs 15:93-131, 1978.
17. BRUGGE, J.S. New intracellular targets for therapeutic drug design. Science 260:918-919 1993.
18. BUCKMAN,D.; ERICKSON,K.; ROSS,B. Dietary fat modulation of murine mammary tumor metabolism studied by *in vivo* phosphorus 31 NMR spectroscopy. Cancer Res. 47(21):5631-5636, 1987.
19. CABALLERO,S. et alii. Nutrients and liming requirements on the bean dry matter production in a yellow-red latosol in the Barretos region, Sao Paulo state. Pesqui. Agropecu. Bras. 22(4): 387-392, 1987.
20. CAMPBELL,K. et alii. *In vivo* <sup>31</sup>P NMR spectroscopic changes during liver regeneration J. Surg.Res. 49:244-247, 1990.
21. CARLISLE,E. Silicon: an essential element for the chick. Science 178:619-621, 1972.

22. CHAMBON, Y.; MOULINOUX, J.; FONTAINE, N. Importante augmentation des taux hépatique et sanguin de l'histamine après hépatectomie partielle chez le rat. C.R. Séanc. Soc. Biol. 171(3):644-649, 1977 I.
23. CHAMBON, Y.; MOULINOUX, J.; FONTAINE, N. Action de la tritoqualine sur les taux hépatique et sanguin de l'histamine après hépatectomie partielle chez le rat. C.R. Séanc. Soc. Biol. 171(6):1283-1287, 1977 II.
24. CHAUSMER, A. & WALLACH, S. Metabolism of trace metals in animals: Part II: Essential trace elements. In.: PRIEST, N. & Van De VYVER, F. Trace metals and fluoride in bones and teeth. Florida, CRC Press, 1990. cap. 11 p.253-270.
25. COOPER, R.A.; BRAUNWALD, A.D.; KUO, A.L. Phorbol ester induction of leukemic cell differentiation is a membrane-mediated process. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 79 (9):2865-2869, 1982.
26. CORREIA, J.; BATY, L.; WILLIAMS JR, R. Mg<sup>2+</sup> dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. J.Biol.Chem. 262(36):17278-17284, 1987.
27. COUTURIER, A.; BAZGAR, S.; CASTAGNA, M. Further characterization of tumor-promoter-mediated activation of protein kinase C Bioch. Biophys. Res. Commun. 121 (2): 448-455, 1984.
28. CROFTS, J. & BARRITT, G. The liver cell plasma membrane Ca<sup>2+</sup> inflow systems exhibit a broad specificity for divalent metal ions. Biochem.J. 269(3):579-587, 1990.
29. CUMMINGS, J.; WILLMOTT, N.; CALMAN, K. Effect of a subcutaneously growing Walker 256 carcinosarcoma on host tissue mitochondrial function and magnesium content. Cancer Res. 44:1333-1336, 1984.
30. CURY, J.A. Estudo do metabolismo do flúor em função da sua administração a ratas por períodos pré-natais sucessivos. Tese Livre-Docência em Bioquímica FOP-UNICAMP Piracicaba, 1984. 136p.
31. DOUGLAS, W.W. Histamina, 5-hidroxitriptamina (serotonina) e seus antagonistas In.: GILMAN, A.G. et alii Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica cap. 26, 1987. p.396-417.

32. EL SOLH,N. & ROUSSELET,F. Effects of stable strontium on calcium metabolism with particular reference to low-calcium diet. In.: SKORYNA,S. Handbook of stable strontium New York, Plenum Press, 1981. 515 p.
33. ESTELLE,F.; SIMONS,R; J.SIMONS,K. Pharmacokinetic optimisation of histamine H1-receptor antagonist therapy. Clin. Pharmacokinet. 21(5): 372-393, 1991.
34. ÉTHIER,C. et alii. Vitamin D depletion retards the normal regeneration process after partial hepatectomy in the rat. Endocrinology 126(6): 2947-2959,1990.
35. ÉTHIER,C.; GOUPIL,D.; GASCON-BARRÉ,M. Influence of the calcium and vitamin D endocrine system on the "priming"of the liver for compensatory growth. Endocrine Res. 17(3&4): 421-436, 1991.
36. FARGHALI,H. et alii. Liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. Sequential events monitored by <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance spectroscopy and biochemical studies. Lab. Invest. 70(3):418-425, 1994.
37. FAUSTO, N. & MEAD,J. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. Lab. Invest. 60 (1):4-13, 1989.
38. FERRERO,M. et alii. Expression of a growth arrest specific gene (gas-6) during liver regeneration: molecular mechanisms and signalling pathways. J. Cell. Phys. 158(2):263-269, 1994.
39. FESUS,L. et alii. Activation of transglutaminase and production of protein-bound  $\gamma$ -glutamylhistamine in stimulated mouse mast cells. J. Biol.Chem. 260(25):13771-13778, 1985.
40. FREEDMAN,R. & SHARKEY JR,A. Recent advances in the analysis of respirable coal dust for free silica, trace elements, and organic constituents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 200:7-16, 1972.
41. FUKANO,S. et alii. Bile acid metabolism in partially hepatectomized rats. Steroids 45(3,4):,209-227, 1985.
42. GARTEIZ,D. et alii. Pharmacokinetics and biotransformation studies of terfenadine in man. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 32(9a):1185-1190, Suppl. II, 1982.

43. GESPACH,C.; MARREC,N.; BALITRAND,N. Relationship between  $^3\text{H}$ -histamine uptake and  $\text{H}_2$ -receptors in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. Agents and Actions 16(3/4):279-283,1985.
44. GESTRING,W. & SOLTANPOUR, P. Comparison of soil tests for assessing boron toxicity to alfalfa. Soil Sci. Soc. Am. J. 51(5): 1214-1219, 1987.
45. GIESBRECHT, A.M. Princípios de ação de fármacos In.: VALLE,L.; DeLUCIA,R; OLIVEIRA F°,R.M.; OGA,S. Farmacologia integrada -Farmacologia básica v.1 Rio de Janeiro, Atheneu, 1988. cap. 12 p. 171-178.
46. GILMAN, A.G. et alii Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1987. 1195 p.
47. GINÉ, M. F. Espectroscopia de emission atomica con plasma inducido (ICP-AES) São Paulo, CENA/USP, 1990. 22 p.
48. GRAVINA,O; CABRINI,R.; CARRANZA JR, F. Effect of a strontium-containing diet on periodontal tissues of rat molars. J. Periodontol. 41(3):46/174 - 49/177, 1970.
49. HABER,B. et alii. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. J.Clin. Invest. 91:1319-1326, 1993.
50. HADDEN, J. et alii Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69(10):3024-3027, 1972.
51. HEGEWALD,H. et alii. Influence of  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  on the turnover of the phosphomonoester group of phosphatidylinositol 4-phosphate in human erythrocyte membranes. Biochem. J. 244(1): 183-190, 1987.
52. HIGGINS,G. & ANDERSON,R. Experimental pathology of the liver. I. restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Archs. Path. 12:186-202, 1931.
53. HIYAMA, Y. et alii Platelet-derived growth factor and thromboxane are necessary for liver regeneration. Cell.Mol.Biol. 27 (6): 593-599, 1981.

54. HOLDEN,A.; LITTLEJOHN,D.; FELL,G. Method for the determination of silicon in biological samples using electrothermal atomic absorption spectrometry with matrix modification. Anal. Proc. 29:260-262, 1992.
55. HOUWELING,M; VAARTJES,W.J.; Van GOLDE,L.G. Metabolic responsiveness to phorbol ester and activity of protein kinase C in isolated hepatocytes from partially hepatectomized rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 158 (1):294-301, 1989.
56. HUANG, Z. Silicon measurement in bone and other tissues by electrothermal atomic absorption spectrometry. J.Anal. At. Spectrom. 9:11-15, 1994.
57. JOHNSON,R. & ALBERT,S. The uptake of radioactive phosphorus by rat liver following partial hepatectomy. Arch. Biochem. Biophys. 35(2):340-345, 1952.
58. JONES,A. et alii Ca-calmodulin mediates the DNA-synthetic response of calcium-deprived liver cells to the tumor promotor TPA. Exp.Cell Res. 138: 87-89, 1982.
59. KANASHIMA,R. et alii. Inhibitory effect of cimetidine on liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats. Am.J. Surg. 146:293-298, 1983.
60. KANASHIMA,R; NAGASUE,N.; SAKATO,K. Ranitidine as an inhibitor of liver regeneration. Am.J. Surg. 149:223-227, 1985.
61. KANTA,J. & CHMELAR,V. Kinetics of 3H-thymidine label in rat liver regenerating after partial hepatectomy and after damage with carbon tetrachloride or silica. Sb.Ved.Pr.Lek.Fak.Karlovy Univerzity Hradci Kralove 32(4):395-401, 1989.
62. KAO,J. et alii. Active involvement of Ca<sup>2+</sup> in mitotic progression of Swiss 3T3 fibroblasts. J.Cell Biol. 111(1):183-196, 1990.
63. KEMP,G. & BEVINGTON,A. The clinical biochemistry of intracellular phosphate: new perspectives on cellular phosphate shifts and other abnormalities of phosphate metabolism. Clin. Chem. Enzym.Comms. 4(4):209-233, 1992.
64. KIELY,M. & DOMM,L. The effect of a magnesium deficient diet and cortisone on the growth of the rat incisor. J. Dent. Res. 56(12):1577-1585, 1977.

65. KOIDE, Y. Alterations in the intracellular distribution of cGMP and guanylate cyclase activity during rat liver regeneration. J. Biol. Chem. 253(12):4439-4445, 1978.
66. KOLESNICHENKO, L. & CHERNOV, N. Phosphorylation and inhibition of  $\gamma$ -glutamyl transferase activity by cAMP-dependent protein kinase. Biokhimiya 51(4): 612-615, 1986.
67. KOMURA, M.; NAKAI, H.; SHIRO, M. Regioselective synthesis of [1-B<sup>10</sup>H<sub>9</sub>(SH)]<sup>2-</sup> and [2-B<sup>10</sup>H<sub>9</sub>(SH)]<sup>2-</sup>: potential agents for boron-neutron capture therapy of brain tumors. J. Chem. Soc. Dalton Trans. 0(8):1953-1956, 1987.
68. KOSHLUKOVA, S. et alii. Alterations in microsomal and plasma membranes during liver regeneration. Biochimie 74:981-987, 1992.
69. KOSSAKOWSKI, S. Decontaminating effectiveness of calcium, zinc, manganese DTPA chelates in contamination with radioisotopes cesium-137, cerium-144, iodine-131, strontium-90. Pol. Arch. Weter. 24(4):538-558, 1987.
70. KOZLOWSKI JR, V.A. Efeito de antagonistas de receptores H1 e H2, sobre a  $\gamma$ -glutamiltransferase, no soro de ratos parcialmente hepatectomizados. Tese-Mestrado - FOP-UNICAMP. Piracicaba, 1991. 90 p.
71. KOZLOWSKI JR, V.A. & MATTOS F<sup>o</sup>, T.R. Effect of H1 and H2 receptor antagonists on the serum activity of gamma-glutamyltransferase during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Pharmacology 51(2):134-136, 1995.
72. KRAFT, A.S.; APPLING, C.; BERKOW, R.L. Specific binding of phorbol esters to nuclei of human promyelocytic leukemia cells Biochem. Biophys. Res. Commun. 144 (1):393-401, 1987.
73. KU, W.W. et alii. Tissue disposition of boron in male Fischer rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 111(1):145-151, 1991.
74. KUMAMARU, T. et alii. Inductively-coupled plasma atomic emission spectrometric determination of boron based on generation of methyl borate. Anal. Chim. Acta 186:267-272, 1986.
75. LEBLONDEL, G.; MAURAS, Y.; ALLAIN, P. Tissue distribution of some elements in rats. Biol. Trace Elem. Res. 10:327-333, 1986.

76. LEE,S. et alii. Effects of H<sub>2</sub>-receptor antagonists on the rat liver after partial hepatectomy or carbon tetrachloride-induced hepatic injury. Scand. J.Gastroenterol 21(8):984-990, 1986.
77. LEESON,G.A. et alii. Metabolic disposition of terfenadine in laboratory animals. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 32(9a):1173-1178, Suppl. II, 1982.
78. LEFFERT,H. & KOCH,K. Ionic events at the membrane initiate rat liver regeneration. Ann. N. Y. Acad. Sci. 339:201-215, 1980.
79. LEONI,S; SPAGNUOLO,S; PANZALI,A. Rat liver adenylate cyclase and phosphodiesterase dependence on Ca<sup>2+</sup> and on cytoplasmic factors during liver regeneration. FEBS Letters 92(1):63-67, 1978.
80. MacMANUS, J.P. et alii An increase in calmodulin during growth of normal and cancerous liver in vivo. FEBS Lett. 133: 99-102, 1981.
81. MARCOVIC,B. & ARAMBASIC,M. Experimental chronic interstitial nephritis compared with endemic human nephropathy. J. Pathol. 103:35-40, 1971.
82. MARKS, R.M. et alii Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cells. Lab. Invest. 55 (3):289-294, 1986.
83. MARTINEZ-HERNANDEZ,A.; DELGADO,F; AMENTA,P. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. Lab. Invest. 64(2):157-166, 1991.
84. MATHEWS, C.K. & VAN HOLDE,K.E. Biochemistry Redwood City, The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1990. 1129 p.
85. MATTOS FILHO,T.R. Influência da hepatectomia parcial no tempo de sono pelo metohexital, em ratos. Tese-Mestrado - FOP-UNICAMP. Piracicaba, 1976. 56p.
86. MATHUR,P. & CASE,R. Phosphate loss during reversible myocardial ischaemia. J. Mol. Cell. Card. 5:375-393, 1973.
87. MAY,L. & BERENSON,M. Value of serum inorganic phosphate in the diagnosis of ischaemic bowel disease. Am. J. Surg. 146:266-268, 1983.

88. McGAVACK,T.; LESLIE,J.; TANG KAO,K-Y. Silicon in biological material. I. Determinations eliminating silicon as a contaminant. Proc. Soc. Exp.Biol. Med. 110: 215-218, 1962.
89. McTAVISH,D.; GOA,K.; FERRILL,M. Terfenadine - an updated review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. Drugs 39(4):552-574, 1990.
90. MEHARD,C.W. & VOLCANI,B.E. Similarity in uptake and retention of trace amounts of <sup>31</sup>silicon and <sup>66</sup>germanium in rat tissues and cell organelles. Bioinorg. Chem. 5:107-124, 1975.
91. MEIER-ABT,P. Cellular mechanisms of intrahepatic cholestasis. Drugs 40(Suppl.3):84-97, 1990.
92. MICHALOPOULOS,G. et alii. Hepatopietins A and B and hepatocyte growth. Dig. Dis. Sci. 36(5):681-686, 1991.
93. MICHALOPOULOS,G. Liver regeneration and growth factors: old puzzles and new perspectives. Lab. Invest. 67(4):413-415, 1992.
94. MIYAKE,R. et alii Activation of protein kinase C by non-phorbol tumor promoter, mezerein. Biochem.Biophys.Res.Commu 121(2):649-656,1984.
95. MIZUTA, K. Eventos mediados por cálcio/ Calmodulina:estrutura e função In.: VALLE,L.; DeLUCIA,R; OLIVEIRA Fº,R.M.; OGA,S. Farmacologia integrada - Farmacologia básica v.1 Rio de Janeiro, Atheneu, 1988. cap. 15 p. 293-299.
96. MOLLESON,T. The accumulation of trace metals in bone during fossilization. In.: PRIEST,N. & Van De VYVER,F. Trace metals and fluoride in bones and teeth. Florida, CRC Press, 1990. cap. 15 p.341-365.
97. MOULINOUX,J.; FONTAIN,N.; CHAMBON,Y. Action du sulfate d'aminoguanidine sur les taux hépatique et sanguin de l'histamine après hépatectomie partielle chez le rat. C.R. Séanc. Soc. Biol. 171(6):1288-1292, 1977 II.
98. MURRAY,A.; STRECKER,W; SILZ,S. Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy, and comparison with biochemical results. J. Cell Sci. 50:433-448, 1981.



99. NAKAHATA,N. & HARDEN, T.K. Regulation of inositol trisphosphate accumulation by muscarinic cholinergic and H1-histamine receptors on human astrocytoma cells Biochem.J. **241** (2):337-344, 1987.
100. NAKATA,R.; TSUKAMOTO,I.; MIYOSHI,M; KOJO,S. Effect of thyroparathyroidectomy on the activities of thymidylate synthetase and thymidine kinase during liver regeneration after partial hepatectomy. Clin.Sci. **72**: 455-461, 1987.
101. NOLTE,H; STAHL SKOV,P.; LOFT,H. Stimulation of histamine synthesis from tumour cells by concanavalin A and A23187. Agents and Actions **20**(3/4):291-294, 1987.
102. OKAMOTO,Y. et alii Protein kinase C in the regenerating rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. **151**(3):1144-1149, 1988.
103. OLIVEIRA F°, R.M.; VALLE, L.B.S.; MINETTI,C.A. Efeito fosfoinositídeo In.: VALLE,L.; DeLUCIA,R; OLIVEIRA F°,R.M.; OGA,S. Farmacologia integrada - Farmacologia básica v.1 Rio de Janeiro, Atheneu, 1988. cap. 13 p.195-213.
104. OLIVEIRA LIMA, A. et alii Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação. 6ed. R.J., Guanabara Koogan, 1985. 699p.
105. PALEMENT, J et alii GTP-dependent membrane fusion during hepatocarcinogenesis and liver regeneration. Biochem. Biophys. Res. Commun. **176**(3):1494-1500, 1991.
106. PAPASPYROU,M. et alii. Determination of boron in cell suspensions using electrothermal atomic absorption spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. **9**:791-795, 1994.
107. PÉREZ-BARRIOCANAL,F.; ESTELLER,A.; GALLEGO,J. Relationship between biliary calcium and bile acid secretion in the regenerating liver of the rat. Br.J.exp. Path. **68**(6): 787-791, 1987.
108. PUJADES,C. et alii. Decrease of calmodulin and actin in the plasma membrane of rat liver cells during proliferative activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **173**(3):1287-1291, 1990.
109. RAEBURN,D. & RODGER, I. Strontium may differentiate high and low affinity calcium stores in guinea-pig trachealis. Gen. Pharmacol. **18**(6):605-608, 1987.

131. SZELENYI,I. Therapeutic potential of magnesium. Drugs of Today 27(4):275-283, 1991.
132. TAGUCHI,Y et alii Increase in histidine decarboxylase activity in skin of genetically mast-cell-deficient *W/W<sup>v</sup>* mice after application of phorbol 12-myristate 13-acetate: evidence for the presence of histamine-producing cells without basophilic granules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79(22):6837-6841, 1982.
133. TAMAT,S.; MOORE,D.; ALLEN,B. Determination of boron in biological tissues by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Anal. Chem. 59: 2161-2164, 1987.
134. TASAKA,K. & NAKAYA,N. The relationship between incorporation of histamine and differentiation of neutrophil progenitors in murine bone marrow. Agents and Actions 20(3/4):320-323, 1987.
135. TASAKA,K.; NAKAYA,N.; NONAKA,T. Effects of histamine, granulocyte colony-stimulating factor and db-cAMP on the differentiation of HL-60 cells. Agents and Actions 30(1/2):240-242, 1990.
136. TAYLOR,D.; YOFFE,J.; WOOLLEY,D. Histamine H<sub>2</sub> receptors on foetal-bovine articular chondrocytes. Biochem.J. 212 (2):517-520, 1983.
137. TEMPLETON,D.; PAUDYN,A.; BAINES,A. Multielement analysis of biological samples by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. I. Preliminary considerations and analysis of rat liver and serum. Biol.Trace Elem. Res. 22:17-33, 1989.
138. TILLY,B. et alii Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca<sup>2+</sup> - mobilizing H<sub>1</sub> receptors. J. Cell biol. 110(4):1211-1215, 1990.
139. TSUKAMOTO, I. & KOJO,S. Effect of phorbol ester on rat liver regeneration Biochem. Pharmac. 36(17):2871-2872, 1987 I.
140. TSUKAMOTO,I. & KOJO,S. Effect of calcium channel blockers and trifluoperazine on rat liver regeneration. European J.Pharmacol. 144 (2):159-162, 1987 II.
141. UESUGI,T.; BOGNACKI,J.; LEVINE,W. Biliary excretion of drugs in the rat during liver regeneration. Biochem. Pharmac. 25(10):1187-1193, 1976.

142. VALLARI,R. & PIETRUSZKO,R. Interaction of  $Mg^{2+}$  with human liver aldehyde dehydrogenase. J. Biol. Chem. 259(8):4922-4926, 1984.
143. VALLE, L.B; OLIVEIRA F°,R.M.; MINETTI, C.A. Ciclases e quinases In.: VALLE,L.; DeLUCIA,R; OLIVEIRA F°,R.M.; OGA,S. Farmacologia integrada - Farmacologia básica v.1 Rio de Janeiro, Atheneu, 1988. cap. 14 p. 215-291.
144. VANHOE,H. et alii Determination of boron in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry after a simple dilution of the sample. Anal. Chim. Acta 281:401-411, 1993.
145. VANHOE,H; DAMS,R; VERSIECK,J. Use of inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace elements in human serum. J. Anal. At. Spectrom. 9:23-31, 1994.
146. VIEIRA,S. Introdução à Bioestatística 3ed. RJ,Campus,1985. 294 p.
147. ZIVNÝ,P.; SIMEK,J.; PALICKA,V. Effect of saline solutions administered parenterally in different postoperation phases on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. Physiol. Bohemoslov. 38(4):339-347, 1989.
148. WALLACH,S. & CHAUSMER,A. Metabolism of trace metals in animals and man: Part I: Non-essential pollutant metals. In.: PRIEST,N. & Van De VYVER,F. Trace metals and fluoride in bones and teeth. Florida, CRC Press, 1990. cap. 10 p.231-252.
149. WEI,J-W.; MORRIS,H.; HICKIE,R. Positive correlation between calmodulin content and hepatoma growth rates. Cancer Res. 42:2571-2574, 1982.
150. WHITFIELD,J. et alii. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. Ann. N.Y. Acad. Sci 339:216-239, 1980.
151. WILLIAMSON,J. et alii Inositol trisphosphate and diacylglycerol as intracellular second messengers in liver. Am. J. Physiol. 248(Cell Physiol. 17):c203-c216, 1985.
152. WOHLGEMUTH,E; STANEK,Z; PENAZ,M. Total  $\beta$ -activity and the content of most important artificial radionuclides in tissues of fishes from the Jihlava River basin [Czechoslovakia]. Folia. Zool. 36(2):183-191, 1987.