

VITOLDO ANTONIO KOZLOWSKI JUNIOR

EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES  $H_1$  E  $H_2$ ,  
SOBRE A  $\gamma$ -GLUTAMILTRANSFERASE, NO SORO DE RATOS  
PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADOS

*Este exemplar  
é devidamente corrigido  
conforme resolução CCPG/036/83.  
Piracicaba, 16 de dezembro de 1991  
Thas. M. Tel. 69*

Tese apresentada à Faculdade de Odon-  
tologia de Piracicaba da UNICAMP, pa-  
ra obtenção do grau de Mestre em Ciên-  
cias - Área de Farmacologia

PIRACICABA

1991

K849e

15620/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

VITOLDO ANTONIO KOZLOWSKI JUNIOR <sup>in</sup>

EFEITO DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES  $H_1$  E  $H_2$ ,  
SOBRE A  $\gamma$ -GLUTAMILTRANSFERASE, NO SORO DE RATOS  
PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADOS

Orientador: Prof<sup>o</sup>.Dr. THALES R. DE MATTOS FILHO <sup>escri</sup>

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

PIRACICABA  
1991

À Sr<sup>ª</sup> ANASTÁCIA KOZLOWSKI ...

Sr<sup>º</sup> ANDRONINO SANTOS  
(in memoriam)...

com respeito e admiração.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. FLÁVIO RIBEIRO DOS SANTOS,  
por cujos exemplos, ingressei na carreira do magistério,  
a minha especial homenagem.

Ao Profº. Dr. THALES ROCHA DE MATTOS FILHO,  
orientador desta tese, pelo incentivo e confiança demonstra-  
dos ao longo deste trabalho, o meu reconhecimento.

## AGRADECIMENTOS

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE FIRACICABA (FOP-UNICAMP) através de seu digníssimo diretor, Prof<sup>o</sup>. Dr. Renato Roberto Biral pela oportunidade 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 da Prof<sup>a</sup> ANA NEOTTI ex-Chefe da Divisão de Pesquisa e ex-Coordenadora do Programa Institucional de Capacitação Docente pelo apoio e atenção que viabilizaram no momento oportuno, a realização deste trabalho.

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

Ao Mestre pela ESALQ-USF, Área de Toxicologia, Sr<sup>o</sup> JOÃO CÉSAR FERST pela incalculável colaboração durante a realização deste experimento.

Ao Cirurgião-Dentista Sr<sup>o</sup> JOSÉ CARLOS DE JESUS TONIOLO, e Sr<sup>a</sup> ELIANE MELO FRANCO e ELOÁ JANNUZZI HERNANDES JORDÃO, farmacêuticas bioquímicas, pela eficiência, desprendimento e auxílio na realização da fase experimental deste trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. JAIME APARECIDO CURY, pelo altruísmo científico demonstrado durante a realização deste trabalho.

A COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DO ENSINO SUPE  
RIOR (CAFES), pelo apoio a esta pesquisa, através da conces-  
são de bolsa de estudo.

Ao Sr<sup>os</sup>. JOSÉ CARLOS GREGÓRIO, técnico da área de Farmacolo-  
gia, PEDRO SÉRGIO JUSTINO fotógrafo do Centro de Recursos Ac  
diovisuais e Sr<sup>o</sup> WALDOMIRO VIEIRA FILHO e Sr<sup>o</sup> MARIZA DE JE-  
SUS CARLOS SOARES técnicos da área de Bioquímica pela cordia-  
lidade e atenção dispensada na realização de serviços técni-  
cos prestados.

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

A Sr<sup>o</sup> MÁRCIA EURICH BELINSKY Assistente Administrativa da  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Es-  
tadual de Ponta Grossa pela disponibilidade e atenção a mim  
dispensada.

Ao Sr<sup>o</sup> MOYSÉS JOSÉ MARIA DA SILVA, pela colaboração no manu-  
seio dos animais.

A Sr<sup>as</sup> VILMA BIZUTI DOS SANTOS, MARIA ELISA DOS SANTOS e ANA  
MARIA COSSA DE ARRUDA OLIVEIRA, pela amizade e solicitude de  
monstrados.

A todos aqueles que, embora não citados nominalmente, con-  
tribuíram para a concretização deste trabalho.

## C O N T E Ú D O

	Página
1 - INTRODUÇÃO . . . . .	03
2 - REVISÃO DA LITERATURA. . . . .	05
3 - PROPOSIÇÃO . . . . .	25
4 - MATERIAIS E MÉTODOS. . . . .	26
4.1 - Animais. . . . .	26
4.2 - Técnica de hepatectomia parcial. . . . .	26
4.3 - Grupos experimentais . . . . .	27
4.4 - Administração das drogas . . . . .	28
4.5 - Colheita do sangue para dosagem $\gamma$ -GT. . . . .	28
4.6 - Determinação da atividade $\gamma$ -GT no soro (SZASZ, 1974). . . . .	28
4.6.1 - Fundamentos do método . . . . .	29
4.6.2 - Características do sistema . . . . .	29
4.6.3 - Reativos . . . . .	30
4.6.4 - Procedimento . . . . .	30
4.6.5 - Obtenção das amostras para as dosagens . . . . .	31
4.7 - Cálculos para determinação da atividade da enzima. . . . .	32
4.8 - Análise estatística. . . . .	33

5 - RESULTADOS . . . . .	34
6 - DISCUSSÃO. . . . .	40
7 - CONCLUSÕES . . . . .	53
8 - RESUMO . . . . .	54
9 - SUMMARY. . . . .	55
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	56
11 - APÊNDICE . . . . .	76

## 1 - INTRODUÇÃO

A ressecção hepática parcial como procedimento cirúrgico no tratamento de vários tipos de neoplasias e traumatismos do órgão tem aumentado nos últimos anos. Experiências clínicas amplamente relatadas na literatura relacionam inúmeras complicações que ocorrem na cirurgia hepática. Uma destas complicações são úlceras hemorrágicas na mucosa gastroduodenal, associadas ao "stress" de pacientes que sofrem procedimentos cirúrgicos hepáticos. A profilaxia destas complicações baseia-se numa terapêutica voltada para a redução da acidez gástrica. Cimetidina, um antagonista de receptores  $H_2$  da histamina é um potente inibidor farmacológico da secreção ácida do estômago, e tem sido utilizado com sucesso na prevenção de hemorragias gastrointestinais. Entretanto, investigadores observaram redução do fluxo sanguíneo no fígado depois da utilização desta droga. Como uma capacidade notavelmente alta de formação de histamina está presente em muitos tecidos em rápido crescimento ou no processo de reparo, tais como tecidos embrionários, fígado em regeneração, medula óssea, tecidos de feridas e de granulação e tumores malignos, os receptores histamínicos  $H_1$  e  $H_2$  estão envolvidos em inú-

meras respostas multifatoriais. Os receptores  $H_1$ , têm maior afinidade pela histamina, são ativados a uma concentração menor da droga e mediam uma resposta, dilatadora de início relativamente rápido e curta duração. Em contraste, a ativação dos receptores  $H_2$  causa dilatação que demora mais a aparecer e é mais prolongada e assim, os efeitos vasodilatadores só são totalmente bloqueados por uma associação de antagonistas  $H_1$  e  $H_2$ .

O bloqueador  $H_1$  - Terfenadina, é apontado como um antagonista específico de receptores  $H_1$  periféricos, pois a sua molécula não atravessa a barreira hematoencefálica (não tendo portanto, efeito central). Destituída de efeito sedativo significativo, a Terfenadina não possui também efeito  $\alpha$ -adrenérgico, nem anticolinérgico, ao contrário de outros bloqueadores  $H_1$ .

Estudos conduzidos recentemente em animais demonstraram que a Cimetidina tem um efeito inibidor da regeneração hepática depois da hepatectomia parcial em ratos, ao contrário de outros que não conseguiram verificar esta inibição.

Embora estes trabalhos não tenham avaliado a enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase, seu significado clínico refere-se fundamentalmente às doenças do fígado e vias biliares, como se deduz de vários estudos feitos no soro ou no plasma. A  $\gamma$ -GT é uma enzima ligada à membrana que indica síntese hepática e atividade nos epitélios das vias biliares, além de um aumento simultâneo de permeabilidade celular, relacionando-se não apenas na colestase com tradução histológica, mas também nas lesões inflamatórias, tóxicas e neoplásicas.

Como são escassos os experimentos relacionando a regeneração hepática a frequência e a dose dos antagonistas de receptores histamínicos, propusemo-nos a conduzir um estudo para avaliar os efeitos dos antagonistas de receptores histamínicos sobre a enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase no soro de ratos submetidos a hepatectomia parcial.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

A participação da microcirculação no processo de angiogênese antecedendo o desenvolvimento, a reparação e a regeneração dos tecidos, bem como a atividade oncogênica do crescimento de células neoplásicas, tem-se revelado uma complexa inter-relação multifatorial (McKEEHAN et alii, 1986; SPLAWINSKI, 1988; NORRBY et alii, 1990).

EHRLICH foi responsável pela identificação de mastócitos em 1877, notando a distribuição perivascular e a associação destas células com crescimento e tecidos em regeneração. A possibilidade intrigante de que os mastócitos poderiam ser os responsáveis pela estimulação do tecido conjuntivo (RILEY, 1963) levou a determinação da importância da histamina, orientando a proliferação das células do tecido conjuntivo tanto "in vivo" como "in vitro", num efeito independente de reação vascular inflamatória (FRANZÉN & NORRBY, 1980).

Recentemente, LEVI-SCHAFFER & KUPIETZKY (1990) avaliando a mitose de fibroblastos através da incorporação de  $^3\text{H}$  Thymidine por radioautografia confirmaram o incremento de proliferação de fibroblastos sendo estimulada por mastócitos. A adi

ção de um inibidor específico da síntese de DNA sem efeito detectável sobre o RNA ou a síntese protéica, foi ineficaz em bloquear a migração celular, indicando também a influência do mastócito sobre esta propriedade do fibroblasto. Entretanto, como a viabilidade do novo contingente celular está na dependência da construção de novos capilares, cuja informação é expressa pelas células endoteliais da microvasculatura, a existência de mastócitos frequentemente associados com capilares "in vivo" sugere a interação de outras funções, uma vez que o fluxo sanguíneo e a pressão hidrostática não são requeridas para a organização da malha vascular (FOLKMAN & HAUDENSCHILS, 1980).

A performance dos ensaios científicos (FOLKMAN, 1984; FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987a), indicam que a angiogênese é um processo que envolve migração de células endoteliais, seguida de proliferação com subsequente interligação formando uma rede vascular que propicia o início do fluxo sanguíneo. A migração de células endoteliais é possível depois que ocorre a degradação da membrana basal onde um novo capilar surgirá. Enzimas endoteliais específicas, bem como proteases liberadas por mastócitos (LAGUNOFF & BENDITT, 1963; SCHWARTZ & AUSTEN, 1981) são responsáveis por esta degradação da membrana basal e por uma subsequente modificação da região, com a degradação de lipoproteínas extracelulares de baixa densidade (KOKKONEN & KOVANEN, 1985), onde deverão se desenvolver os novos capilares.

Os dois mais importantes processos, migração e proliferação, podem ocorrer independentemente e podem ser independentemente ou conjuntamente ativados (SHOLLEY et alii, 1984) conforme uma variedade de circunstâncias (DODD & KUMAR, 1984; POLVERINI & LEIBOVICH, 1984; FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987b), incluindo entre elas os estímulos hormonais (NORRBY et alii, 1990).

MARKS et alii (1986), investigando o papel de mastócitos na formação de vasos sanguíneos observaram um efeito proliferativo sobre células endoteliais da microvasculatura humana "in vitro". Utilizando antagonistas e agonistas específicos para

receptores histaminérgicos, esses autores demonstraram o efeito mitogênico da histamina sendo mediado por receptores  $H_1$ . A proliferação celular ocorreu mesmo na depleção de soro humano, sugerindo portanto, que a histamina é também um fator de crescimento endotelial com um importante papel no processo de angiogênese.

Como a persistente atividade de angiogênese é um dos eventos precursores da transformação de uma célula normal para uma célula neoplásica, podendo ocorrer antes das características morfológicas de malignidade, a atividade angiogênica tem sido apresentada como via de acesso para a terapia anti-cancerígena (DENEKAMP, 1982), bem como um marcador pré-neoplásico não somente em tumores de animais, mas em tumores de mama e bexiga de humanos.

TILLY et alii (1990) trabalhando com cultura de células, demonstraram que a histamina além de estimular a síntese de DNA e a divisão celular, evoca uma resposta quimiotáctica para as células malignas. Estas ações são mediadas através de receptores  $H_1$  que ativam a fosfolipase C, desencadeando a hidrólise de polifosfoinosítideos com conseqüente formação de vários segundo mensageiros com subseqüente mobilização intracelular de íons cálcio.

SAKUMA et alii (1988), utilizando técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho, demonstraram que a ativação dos receptores  $H_1$  não está associada com a elevação dos níveis de AMP cíclico, mas com o aumento do metabolismo fosfoinosítideo. Durante o desenvolvimento experimental os produtos do inositol fosfato foram 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 et alii (1983), que trabalhando com antagonistas de receptores  $H_1$  e  $H_2$  postularam que os receptores  $H_2$ , quando ativados seriam os responsáveis pe

lo aumento dos níveis de AMP cíclico intracelularmente, numa transdução farmacológica diferente da ativação de receptores  $H_1$ .

Embora os conhecimentos sobre a bioquímica da resposta celular e a participação dos receptores histamínicos seja uma área muito abrangente e diversificada, sabe-se que a Cimetidina, um antagonista de receptor  $H_2$  da histamina, tem um efeito benéfico na terapia tumoral, enquanto que os antagonistas de receptor  $H_1$  parecem favorecer o seu crescimento. Embora esta atividade seja relativa e dependa da identidade celular, NOLTE et alii (1987) encontraram que células de linhagens tumorais sintetizam histamina depois de estimuladas com ionóforo de cálcio A23187 e concanavalina A, evidenciando que esta histamina nascente é necessária para a manutenção de um rápido crescimento celular através de mecanismos desconhecidos.

Esta relação entre malignidade e metabolismo histamínico foi reafirmada por KIERSKA et alii (1987) que implantando sarcomas Sa 1828 em ratos, constataram mudanças nos níveis e no metabolismo da histamina ligadas a presença tumoral. Duas semanas depois da implantação dos tumores, a quantidade de histamina aumentou retornando ao normal depois da extirpação dos mesmos.

Além disso, a 4-metil-histamina também é capaz de atuar sobre células pluripotentes da medula óssea, alterando o ciclo celular do estado  $G_0$  para a fase S de síntese de DNA. Como os antagonistas de receptor  $H_2$  causam agranulocitose e, a administração crônica de histamina a cães ou coelhos aumenta pronunciadamente o número de neutrófilos circulantes no sangue periférico, TASAKA & NAKAYA (1987) sugeriram que a histamina também estimula a produção de neutrófilos nos órgãos hematopoiéticos. Esses pesquisadores demonstraram que a histamina é capaz de promover a diferenciação de mieloblastos e promielócitos na medula óssea e que este efeito não é inibido na presença tanto de pirilamina como de cimetidina. A incorporação é altamente

específica para a histamina sem ser afetada por vários agonistas ou antagonistas de receptores  $H_1$  e  $H_2$ , sugerindo que é mediada por um sistema específico de transporte, que inclui síntese de proteína gerada depois da incorporação de  $^3H$ -histamina.

A função de linfócitos T "suppressor/cytotoxic" e "helper/inducer" também pode ser influenciada pela histamina que se comporta como um importante modulador numa variedade de respostas imunes. A Cimetidina, parece aumentar a imunidade mediada por linfócitos T. O tratamento de camundongos e de seres humanos com cimetidina tem sido reportado retardar o crescimento de muitos tumores, provavelmente através do bloqueio de receptores  $H_2$  das células T. O papel da antigenicidade do tumor e a resposta imune do hospedeiro estabelece portanto uma inter-relação complexa entre linfócitos T com proliferação, diferenciação e resposta de mastócitos (GALOPPIN et alii, 1984), num importante envolvimento com macrófagos que produzindo fatores supressores induzidos pela histamina, atuam conjuntamente na regulação da atividade fibroblástica e das funções das células T (KENYON et alii, 1983).

NORDLUND & ASKENASE (1983) investigando a taxa de crescimento de células "Cloudman S91 melanoma" em animais normais e imunologicamente comprometidos, observaram que o crescimento tumoral foi marcadamente acelerado nos animais imunossuprimidos. Outros grupos de animais normais e imunocomprometidos foram tratados com histamina, antihistamínico  $H_2$  cimetidina, antihistamínico  $H_1$  pirilamina ou estabilizador de mastócito, proxicromil. O tratamento com histamina acelerou o crescimento do tumor em animais normais e teve pouco efeito sobre a taxa de crescimento já acentuada em animais imunossuprimidos. A Cimetidina tendeu a aumentar o crescimento do tumor em animais normais, mas isto foi significativo estatisticamente em apenas 1 de 3 experimentos. Em contraste, o tratamento com cimetidina, pirilamina ou proxicromil sempre resultou em significativo retardo do crescimento tumoral em animais imunodeprimidos.

A detecção de histamina em concentrações relativamente altas em carcinomas e tecidos adjacentes, infiltrados com células tumorais (MATSUZAKI et alii, 1978), tecidos em reparação, fígado em regeneração, tecidos embrionários, medula óssea, outras degenerações malignas como leucemia granulocítica crônica (GRANERUS et alii, 1983), demonstra que a histamina não é encontrada somente em mastócitos mas é sintetizada através da decarboxilação da histidina pelas enzimas histidina decarboxylase (E.C. 4.1.1.22) e L-aromático aminoácido decarboxylase (E.C. 4.1.1.26) (GREEN et alii, 1987), no interior de outras células (BERG et alii, 1972), numa inter-relação com crescimento celular indicando um fenômeno ativo (GALOPPIN et alii, 1984) e interrelacionado com mecanismos anabólicos (KIM, 1961), embora existam pesquisadores que contestem tal fato (MACKAY et alii, 1961; MARKS et alii, 1982), acreditando inclusive que mastócitos e seus produtos desempenham um papel de defesa, inibindo o crescimento tumoral e aumentando a sobrevivência do hospedeiro (BURTIN et alii, 1985).

O fato de que os níveis de histamina aumentam em muitos tecidos distantes de tumores (MAŚLIŃSKI et alii, 1984) sugere um mecanismo complexo de regulação, onde estão envolvidos a histamina presente nos mastócitos e aquela disseminada nos tecidos. A existência de histamina em tecidos independentemente da presença de mastócitos, foi observada em camundongos mutantes deficientes nestas células ( $W/W^V$ ) quando comparados com camundongos normais (+/+) através de cromatografia líquida (YAMATODANI et alii, 1982). A pele, coração e pulmões de camundongos  $W/W^V$  continham aproximadamente 2% da histamina observada nos órgãos correspondentes em +/+, enquanto o fígado, rins e baço 15-8% e o cérebro e o estômago 45 e 34 % respectivamente dos valores encontrados em camundongos +/+.

Os estudos indicando a presença desta histamina "induzida", "não-mastocitária" (HUSZTI et alii, 1977) ou "nascente" (KAHLSON & ROSENGREN, 1968) na intimidade dos tecidos, bem como

aquela secretada por mastócitos, desempenhando funções importantes e não compreendidas, numa incógnita e intrigante relação com tecidos em rápido crescimento, sugere que a histamina tem um importante papel na modulação da proliferação e desenvolvimento celular como fator de mobilidade e crescimento autócrino (TILLY et alii, 1990).

O fato de que mastócitos são frequentemente abundantes nos tecidos adjacentes a tumores metastáticos e que eles migram se concentrando ao longo de feridas no processo de reparo (LEVI-SCHAFFER & KUPIETZKY, 1990), suportam a possibilidade de processo complexo e circunstancial da histamina na regulação proliferativa. Isto é consubstanciado até mesmo na embriogênese onde fetos de várias espécies animais inclusive humanos, também apresentam uma fase no desenvolvimento onde a taxa da produção de histamina é muito alta, chegando a dez vezes mais que na mãe. A histamina fetal entra na circulação materna sendo parte metabolizada e parte excretada inalterada na urina (KAHLSON & ROSENGREN, 1968).

Como RUSSEL & SNYDER (1968) detectaram uma atividade extremamente elevada de histidina decarboxylase em fígado fetal de ratos, TAGUCHI et alii (1984) estudando a distribuição e a atividade desta enzima em tecidos fetais de ratos, confirmaram que o fígado fetal foi o órgão onde a atividade foi mais significativa, mormente nos dias 18-20 da prenhez. O fígado foi responsável por 83% da atividade e somente 14% da proteína total dos fetos de ratos.

KAHLSON & ROSENGREN (1959) relacionando a extraordinária capacidade de formação de histamina com tecidos em crescimento, investigaram a formação desta em fígado em regeneração. Em ratos parcialmente hepatectomizados eles encontraram uma taxa de formação de histamina consideravelmente aumentada durante a regeneração hepática, além de que, quando histidina radioativa foi injetada e a formação de histamina seguida, observaram que a decarboxilação foi maior depois da cirurgia, demonstrando

que a rápida formação de histamina não estava relacionada somente a mastócitos. Este fato entretanto, foi contestado por SHEPHERD & WOODCOCK (1968), que avaliando a formação de histamina em ratos submetidos a hepatectomia parcial, não conseguiram demonstrar nenhuma relação entre a atividade de histidina decarboxylase e o fígado em regeneração.

Aproximadamente no mesmo período, CHAMBON et alii (1968) reportaram que a histamina em doses de 5, 500 e 50.000  $\mu$ g por dia não foi capaz de estimular nem por via subcutânea, nem por via intraperitoneal a regeneração hepática depois do procedimento da hepatectomia parcial.

Somente nove anos mais tarde CHAMBON et alii (1977), determinaram que os níveis de histamina aumentam rapidamente no fígado residual (Fig. 1) e no sangue dos animais submetidos ao

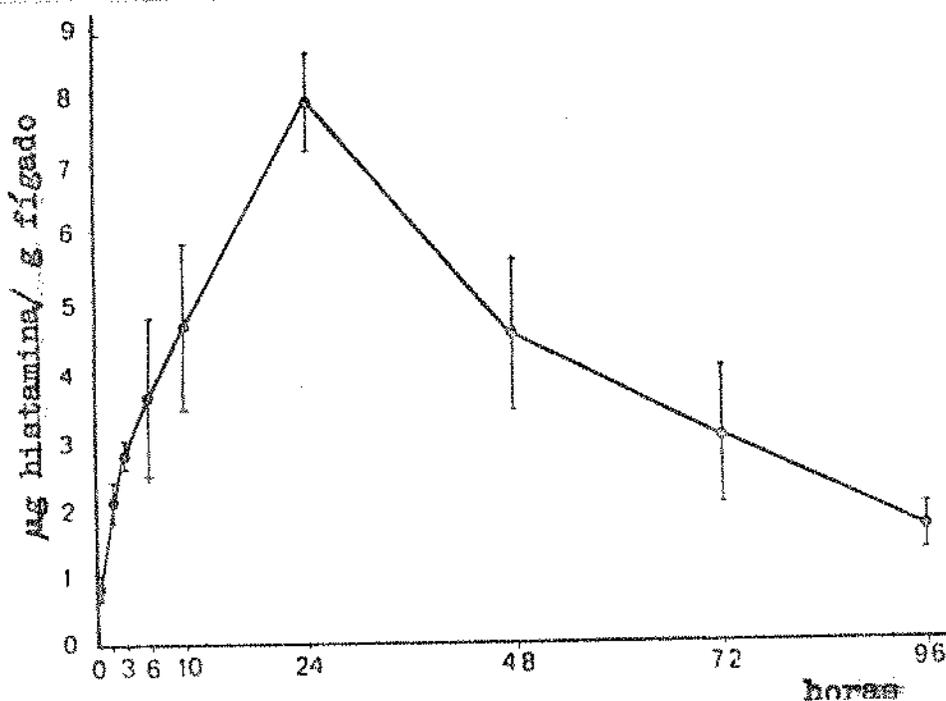


Fig. 1 - Concentração de histamina no fígado residual de ratos parcialmente hepatectomizados.

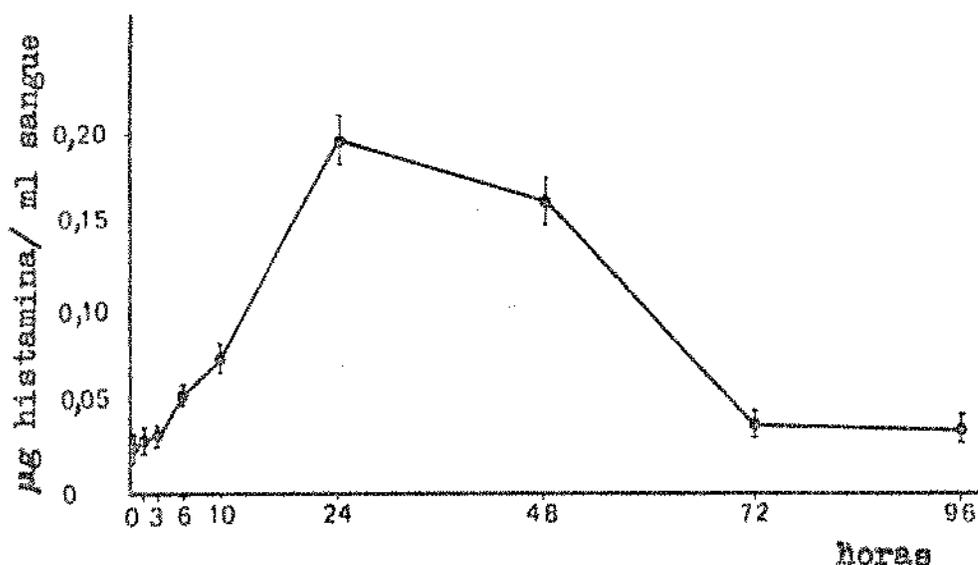


Fig. 2 - Concentração de histamina no sangue de ratos parcialmente hepatectomizados.

procedimento de hepatectomia parcial (Fig. 2), atingindo níveis máximos às 24 h e, retornando aos valores normais ao tempo de aproximadamente 96 horas da regeneração hepática, estabelecendo definitivamente que a histamina desempenha um papel funcional em bora não compreendido, dentro do processo de regeneração do fígado após a hepatectomia parcial.

A ressecção hepática como procedimento cirúrgico no tratamento de vários tipos de neoplasias e traumatismos hepáticos tem aumentado nos últimos anos (BALASEGARAM & JOISHY, 1981; FORTNER et alii, 1981). Experiências clínicas amplamente relatadas na literatura relacionam inúmeras complicações que ocorrem na cirurgia hepática. Uma destas complicações são úlceras hemorrágicas na mucosa gastroduodenal, associadas ao "stress" de pacientes que sofrem procedimentos cirúrgicos hepáticos (PINKERTON et alii, 1971). A profilaxia destas complicações baseia-se numa terapêutica voltada para a redução da acidificidade gástrica.

A Cimetidina ( N"-Ciano-N'-metil-N-[2-[[[(5-metil-1H-imidazol-4-il)metil]tio]etil]-guanidina) antagonista de receptores H<sub>2</sub> da histamina, é um potente inibidor farmacológico da se

creção ácida do estômago (BRIMBLECOMBE et alii, 1978) tanto basal como induzida (PLAYLE, 1977), e tem sido utilizada com sucesso na prevenção de hemorragias gastrointestinais (BASSO et alii, 1981; LANGMAN, 1980).

Recentemente casos de complicações hepáticas tem o corrido depois da administração de cimetidina. LORENZINI et alii (1981) relataram um caso de um paciente que desenvolveu alterações bioquímicas e morfológicas no fígado decorrentes de terapia com cimetidina. A avaliação no sangue da atividade catalítica da enzima  $\gamma$ -glutamilttransferase foi de aproximadamente 4x acima do limite superior dos valores de referência normal. Além disso, FEELY & WOOD (1983) observaram uma redução do fluxo sanguíneo no fígado, depois da utilização desta droga, fato constatado por AKAMATSU et alii (1986). Estes pesquisadores injetaram  $Xe^{133}$  na artéria hepática e na veia porta através de cateter, calculando a partir da curva de eliminação do isótopo o fluxo sanguíneo hepático total, que para doses convencionais de cimetidina (intravenosa) foi reduzido em média em 4% mas, sem alcançar significância estatística.

Os efeitos da cimetidina sobre a regeneração hepática foram estudados por KANASHIMA et alii (1983) depois da remoção de 2/3 do fígado de ratos através da técnica de HIGGINS & ANDERSON (1931). Segundo estes autores a cimetidina teria um efeito inibitório sobre a regeneração hepática, induzindo uma supressão da divisão celular, inclusive com aumento de atividade enzimática no soro. A atividade da  $\gamma$ -glutamilttransferase não foi avaliada neste experimento. Como KANASHIMA et alii (1985) utilizando outro antagonista de receptor  $H_2$  concluíram que este, tal como a cimetidina, poderia afetar a regeneração hepática depois de hepatectomia parcial em ratos, LEE et alii (1986) conduziram um estudo para reavaliar os efeitos de antagonistas de receptores  $H_2$  sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial, uma vez que a frequência extremamente baixa de anormalidades clí

nicas decorrentes da utilização destas drogas, embora documentadas na literatura, não suportam a ocorrência de efeitos hepatotóxicos significantes em relação ao tempo em que foram introduzidas no mercado mundial: 1970 para a cimetidina e 1980 para a ranitidina. Assim, estes pesquisadores utilizando 512 ratos machos adultos concluíram que antagonistas de receptores  $H_2$  (cimetidina e ranitidina) não inibem o fígado de ratos em regeneração após 2/3 de hepatectomia, não exercendo também efeitos deletéricos no fígado injuriado por tetracloreto de carbono ( $CCl_4$ ).

Embora para a Terfenadina ( $\mathcal{L}$  - [4-(1,1-dimetiletil)fenil]-4-(hidroxidifenilmetil)-1-piperidinebutanol) não existam experimentos avaliando o seu comportamento durante a regeneração hepática, testes pré-clínicos de segurança indicam que ela é uma droga relativamente atóxica, para ratos. Em estudos crônicos estes animais toleraram 100 mg/Kg/dia na dieta, durante 2 (dois) anos, sem desenvolverem efeitos colaterais e evidências de alterações histopatológicas ou clínicas. Doses diárias de 300 mg/Kg não afetaram a fertilidade de ratos machos e fêmeas, e nenhuma evidência de mutagenicidade ou carcinogenicidade foi observada, segundo GIBSON et alii (1982).

A terfenadina é um específico antagonista periférico de receptores  $H_1$  desprovido de atividade no sistema nervoso central (BRANDON & WEINER, 1980), com uma meia vida de aproximadamente 7-8 h, em ratos.

Nenhum efeito anticolinérgico, antiserotoninérgico ou antiadrenérgico foi demonstrado com terfenadina (WOODWARD & MUNRO, 1982) e, embora não esteja determinada a  $LD_{50}$  intraperitonealmente para ratos, GIBSON et alii (1982) fazem referência que para ratos pesando em média 157 g, a  $LD_{50}$  i.p. pode ficar em torno de 474 mg/Kg. A baixa toxicidade da droga é confirmada pela quase inexistência de casos relatados na literatura internacional, embora em 1985 LARREY et alii tenham reportado um caso de hepatite causado por terfenadina, cujos efeitos sobre o fígado

eram revertidos com a suspensão do fármaco. Estes pesquisadores observaram que o primeiro episódio de hepatite aguda ocorreu cinco meses depois do início da administração da terfenadina, e o segundo e terceiro episódios ocorreram quando a paciente continu ou tomando terfenadina intermitentemente. Os testes funcionais enzimáticos da atividade hepática sempre retornavam ao normal de pois da interrupção do fármaco e o mecanismo pelo qual a droga manifestava a hepatotoxicidade foi relatado ser desconhecido, mas provavelmente associado ao longo período de utilização intermitente da droga.

Muitas vezes, os doentes hepáticos apresentam-se com sintomas atípicos ou mesmo assintomáticos, desta maneira a determinação da atividade das enzimas celulares no soro, consti tue-se num indicador precoce de lesão hepática cuja sensibilidade ultrapassa a de todos os outros métodos (ADOLPH & LORENZ, 1980).

Nas células normais existe um equilíbrio entre a síntese e a degradação das enzimas, com pequenas quantidades libertando-se para o espaço extracelular, o que permite que nos in divíduos saudáveis a atividade das enzimas extracelulares oscile dentro de determinados limites. Entretanto, quando ocorrem alterações nesta homeostasia através de uma permeabilidade aumentada das membranas celulares, destruição da estrutura celular ou síntese enzimática, forma-se um gradiente de concentrações extra ordinariamente elevado entre os espaços intra e extracelular.

Como mudanças da membrana plasmática são verificadas durante o processo de regeneração hepática, após hepatectomia parcial (CHAUDHURI & LIEBERMAN, 1965; CAJONE et alii, 1985), credita-se uma participação dinâmica desta estrutura nos mecanis mos de crescimento e diferenciação, afetando uma variedade de processos, tais como: adesão celular, inibição de crescimento de pendente da densidade, ativação de receptores, processos de reco nhecimento celular, transporte de aminoácidos e peptídeos, etc.

Muitas destas alterações relacionadas a atividade de enzimas associadas a membrana tais como 5'-nucleotidase, leucyl- $\beta$ -naphthylamidase,  $\gamma$ -glutamyltransferase (CHENG et alii, 1978), fosfatase alcalina (SEKAS & COOK, 1979) entre outras.

KÖTTGEN et alii (1978) afirmaram que no fígado de rato em regeneração, a enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) ligada à membrana, existe em duas formas moleculares. Dependendo do estado da proliferação, a enzima rica em ácido siálico (comum no fígado fetal ou em regeneração) ou a enzima pobre em ácido siálico (no fígado adulto e quiescente) pode ser detectada. Em fígado em regeneração (24 horas depois da ressecção de 2/3), somente a enzima rica em ácido siálico ou enzima fetal pode ser encontrada. Uma vez que a atividade total da enzima (tipo fetal + adulto) permanece inalterada, conclui-se que o tipo adulto de  $\gamma$ -glutamyltransferase foi modificado pela sialilação durante a fase inicial da regeneração hepática (Fig. 3). Este processo de siali-

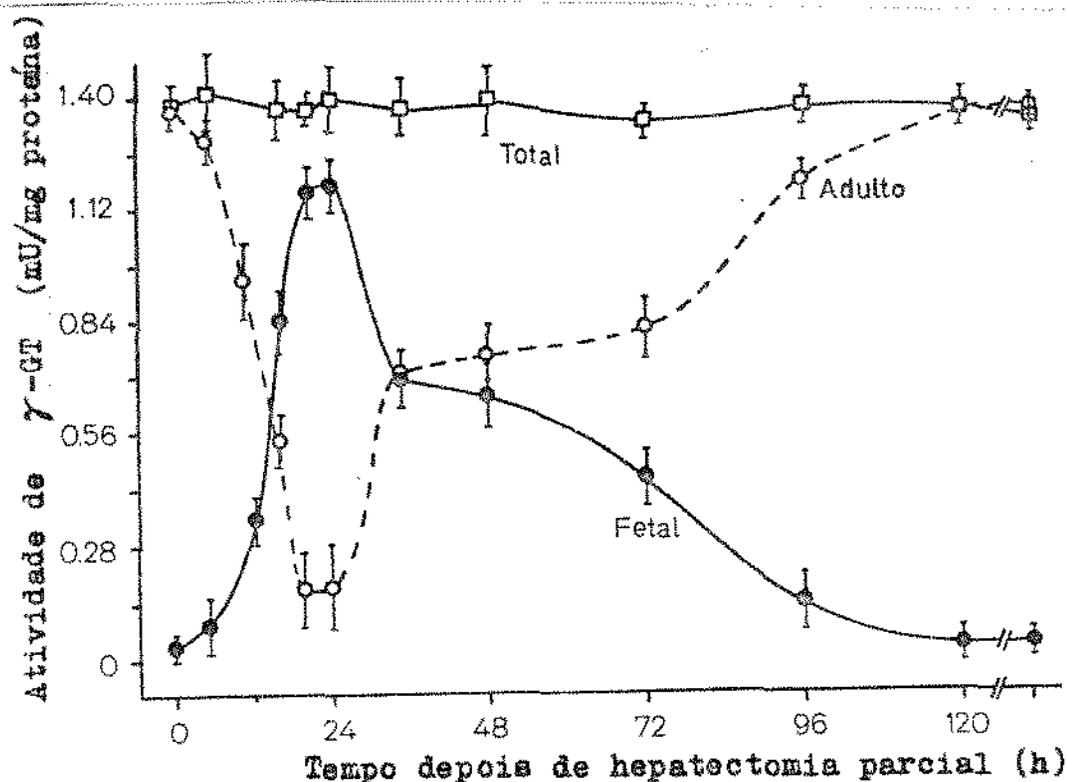


Fig. 3 - Atividade total (adulto e fetal) de  $\gamma$ -glutamyltransferase dependendo do tempo depois de hepatectomia parcial. Cada valor representa a média  $\pm$  S.D. de 4 a 6 fígados.

lação não foi prejudicado por inibidores de síntese de DNA, mas foi impedido por inibidores de RNA ou de síntese de proteína tais como D-galactosamina, actinomicina D ou cicloheximide.

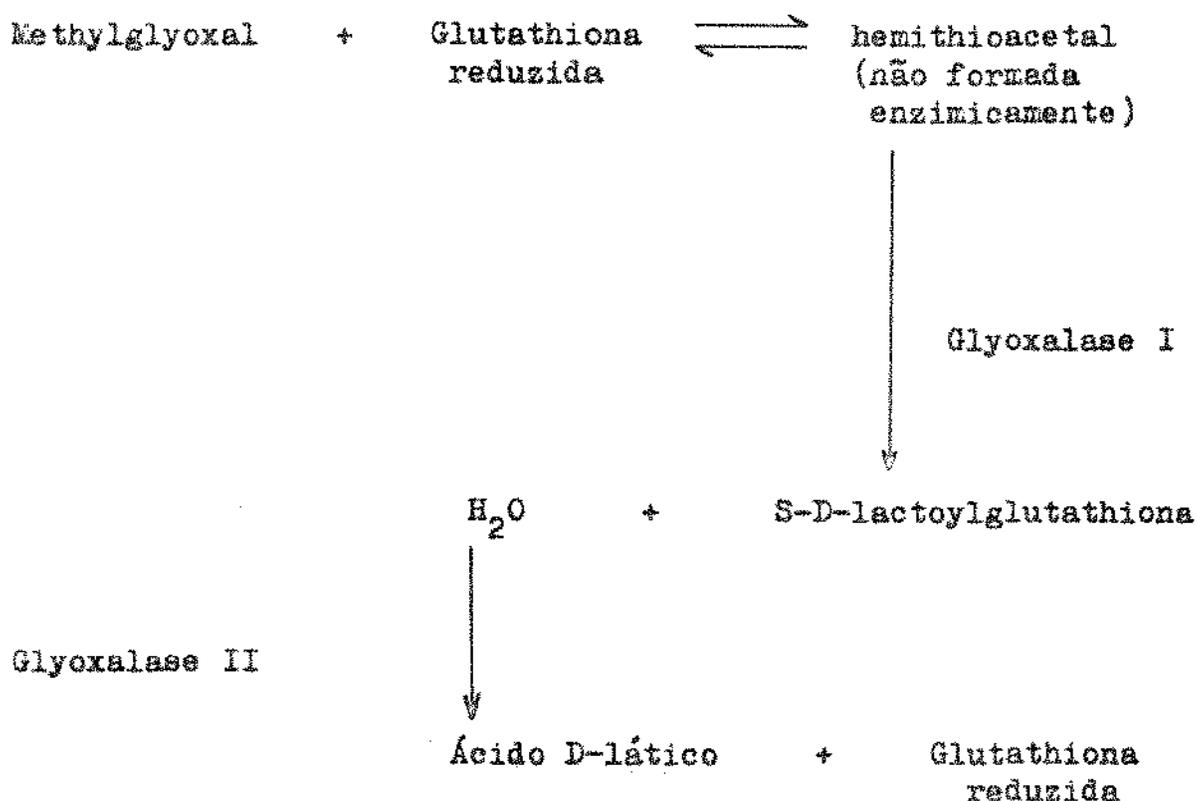
A  $\gamma$ -Glutamyltransferase [(5-glutamyl)-peptídeo : aminoácido 5 -glutamyltransferase, EC 2.3.2.2] é uma enzima que se encontra em membranas e que está amplamente distribuída em tecidos de mamíferos (MEISTER & TATE, 1976). Esta enzima cataliza a transferência da parte  $\gamma$ -glutamyl da glutathiona (doadora) para um aminoácido (acceptora):



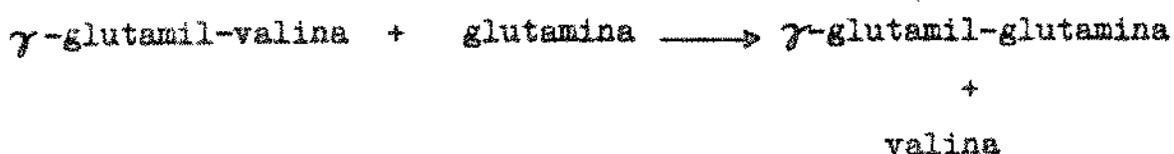
sendo uma componente do ciclo  $\gamma$ -glutamyl para o transporte de aminoácidos e peptídeos através de membranas celulares (MEISTER, 1973). Além disso, regulando a degradação da glutathiona, que é um tripeptídeo com importantes funções biológicas, participa também da manutenção de grupos -SH de proteínas e outras moléculas; destruição de peróxido de hidrogênio, outros peróxidos e radicais livres; destoxificação de compostos estranhos; bem como uma série de outras reações bioquímicas complexas (cf. APÊNDICE 1), entre elas o sistema glyoxalase que cataliza a conversão do methyl-glyoxal para ácido D-lático, utilizando glutathiona reduzida como coenzima. FRINCIFATO em 1983, citado em THORNALLEY(1990), encontrou em fígado de rato em regeneração, depois de hepatectomia parcial, que a atividade da glyoxalase I foi significante - mente mais alta que os controles às 24 e 48 h depois da hepatectomia, retornando mais tarde aos níveis dos controles; enquanto que atividade da glyoxalase II foi significante mais baixa

às 24 h e mais alta depois de 48 e 72 h que os controles, retornando também aos níveis normais posteriormente. Como o pico de atividade mitótica e de síntese de DNA ocorre entre 20 e 28 h depois da hepatectomia, THORNALLEY (1990) faz referência ao trabalho de DIXIT et alii em 1983, demonstrando uma correspondência temporal aumentada com o índice mitótico e a atividade de glyoxalase I, correlacionando as atividades das glyoxalases com proliferação e diferenciação. Tecido imaturo proliferando tem uma atividade relativamente alta de glyoxalase I e baixa atividade da glyoxalase II. Tecidos maturados, diferenciados tem atividades relativamente baixa de glyoxalase I e altas de glyoxalase II.

A S-D-lactoylglutathiona é formada pela ação catalítica da glyoxalase I e é hidrolizada pela ação catalítica da glyoxalase II no citosol das células e organelas celulares, formando ácido D-lático e devolvendo a glutathiona reduzida consumida pela reação catalizada pela glyoxalase I:



Entretanto, além de promover a biodisponibilidade da glutathiona reduzida, a  $\gamma$ -glutamyltransferase também metaboliza a S-D-lactoylglutathiona para S-D-lactoylcysteinyglycine o qual é recomposto para N-lactoylcysteinyglycine (THORNALLEY, 1990) numa tradução de respostas biológicas ainda não compreendidas. Desta maneira, a  $\gamma$ -glutamyltransferase participa de inúmeras reações bioquímicas, comumente, através de dois tipos de reações de ligação. Numa destas reações, o grupo  $\gamma$ -glutamyl é transferido para um aminoácido como a glutamina no exemplo abaixo:



Em outra, um di- $\gamma$ -glutamyl aminoácido é formado:



Como podemos observar, a  $\gamma$ -GT cataliza as reações de doadores de  $\gamma$ -glutamyl enquanto uma enorme variedade de aminoácidos bem como peptídeos servem como aceptores numa reação bioquímica que pode ser reversível (MEISTER & TATE, 1976).

Embora, a  $\gamma$ -GT tenha sido descoberta em 1950 por HANES et alii e isolada na forma pura dos rins em 1963 por SZEWCZUK & BARANOWSKI, apresentando grupos -SH e constituindo-se numa glicoproteína com 20% de carboidrato (SZASZ, 1974), atualmente sabemos que existe espécies (SULAKHE & LAUTT, 1985) e tecidos diferentes nas propriedades físico-químicas da  $\gamma$ -GT, demonstrando

que o conteúdo em aminoácidos e carboidratos são diferentes, embora possam ter a mesma atividade cinética enzimática. A complexidade do dado passa a ser evidente quando adicionamos o fato de que em rim de rato, a  $\gamma$ -GT foi separada em 12 diferentes frações ativas enzimáticas, com substrato especificidade e composição de aminoácidos similares, mas com diferenças no conteúdo de ácido siálico que pode ser o responsável por algumas das formas isoenzímicas separadas (KÖTTGEN & LINDINGER, 1976; MEISTER & TATE, 1976; TATE & MEISTER, 1976).

Para SZASZ (1974) a atividade catalítica da  $\gamma$ -GT encontrada no soro é a expressão da presença de muitas isoenzimas, que podem ser separadas eletroforéticamente e por colunas cromatográficas, enquanto para SHAW et alii (1983), as múltiplas formas de  $\gamma$ -GT no soro, não são isoenzimas mas, complexos formados com lipoproteínas circulantes.

Purificando a  $\gamma$ -GT, SELVARAJ & BALASUBRAMANIAN (1985) concluíram que a enzima é estruturalmente semelhante em fígado humano adulto, fígado fetal e hepatoma, e que os elevados níveis encontrados em fetos e hepatomas são somente um aumento quantitativo e não provocado por uma nova isoenzima. Isto implica que as atividades biológicas da  $\gamma$ -GT, entre elas o transporte de aminoácidos na membrana plasmática, podem ser realizados de diferentes maneiras, por uma mesma célula, bem como variar a sua atividade conforme o papel e as características celulares intrínsecas, como também aquelas próprias de cada tecido ou órgão.

O mais interessante é que a atividade da  $\gamma$ -glutamiltransferase está interrelacionada com diferenciação, neoplasia, blastogênese (NOVOGRODSKY et alii, 1976) e que as alterações significantes clinicamente da atividade catalítica no soro são devidas exclusivamente a um aumento da liberação da enzima pelo fígado (SHAW et alii, 1983), num parâmetro considerado específico e de mais alta sensibilidade bioquímica para alterações hepáticas em função de numerosos estudos realizados (WHITFIELD

et alii, 1972; WENHAM et alii, 1986; CASTRO-E-SILVA JR et alii, 1990).

A enzima apresenta-se em parte ligada a estrutura celular e parte na forma solúvel, sendo esta última a que aparece no soro e na urina (SZASZ, 1974). As mais altas atividades da enzima tem sido encontradas nos túbulos proximais e nas alças de Henle no rim, no epitélio dos canais biliares intrahepáticos e nos ductos pancreáticos. Altos níveis no soro indicam geralmente doenças hepáticas e dos canais biliares (IDÉO et alii, 1972; SPANO et alii, 1983), colestase (CASTRO-E-SILVA JR et alii, 1990) enfermidades hepáticas devido ao álcool (YAMADA et alii, 1985), hepatocarcinogênese e metástases hepáticas (RUSSEL et alii, 1987).

Entretanto, sabe-se que pacientes sem nenhuma evidência de doença hepática, tratados com anti-epilépticos, apresentam a atividade catalítica no soro de  $\gamma$ -GT elevadas, possivelmente como um resultado da indução da atividade catalítica da enzima no fígado por mecanismos ainda desconhecidos (WHITFIELD et alii, 1972). SATOH et alii (1982) administrando aminopirina (AM-600mg Kg<sup>-1</sup>) uma vez ao dia durante 20 dias, bem como dois metabólitos da aminopirina, 4-aminoantipirina (AA - 525mg Kg<sup>-1</sup>) e 4-acetamidoantipirina (AC - 635 mg Kg<sup>-1</sup>), observaram uma indução catalítica da  $\gamma$ -glutamilttransferase nos grupos de ratos tratados com AM e AA, obtendo valores significativamente aumentados, inclusive no soro dos animais tratados.

ÖMER et alii (1989) realizando prétratamento diário com ácido acetilsalicílico (ASA) em ratos, nas doses de 50 mg/Kg e 200 mg/Kg durante 30 dias, não encontraram alterações significativas na atividade enzimática da  $\gamma$ -GT no soro. A administração crônica da ASA em altas doses (200 mg/Kg) causou um aumento significativo na atividade da  $\gamma$ -GT nas membranas plasmáticas hepáticas por grama de proteína de membrana, não ocorrendo o mesmo na administração da droga em baixa dose (50 mg/Kg).

Muitos mecanismos podem estar concorrendo para o

aumento da atividade catalítica de uma enzima no soro. A enzima pode estar sendo liberada em função de necrose celular ou aumento da permeabilidade da membrana, sem que esteja ocorrendo lise propriamente dita. Indução enzimática com posterior liberação, pode também estar envolvida, bem como, contrariamente, outros mecanismos podem estar promovendo o decréscimo desta atividade catalítica.

A detecção histoquímica da ocorrência de hepatócitos alterados, precedendo a formação de tumor em ratos tratados com carcinógenos é uma metodologia amplamente utilizada como indicador de neoplasia hepática incipiente. Segundo RUSSELL et alii (1987) o mais comum marcador histoquímico é a  $\gamma$ -GT, e a sua elevação está correlacionada a processos neoplásicos, numa relação de indução enzimática e hepatocarcinogênese.

CHENG et alii (1978) comparando as atividades enzimáticas da  $\gamma$ -GT em hepatócitos normais, em regeneração e neoplásicos, sugeriram que a acentuada atividade desta enzima é característica de células sofrendo transformação celular. Fato estudado e confirmado por CASPERS & DIGLIO (1984), que induzindo viralmente a transformação de células endoteliais normais "in vitro", para neoplásicas, demonstraram que a atividade da  $\gamma$ -GT, aumenta quantitativamente e histoquimicamente numa relação desta enzima com processo de diferenciação e carcinogênese viral.

Neoplasia hepática raramente é produzida por uma única administração de hepatocarcinógeno. Este fenômeno se verifica em função do dano no DNA de hepatócitos, ser geralmente reparado a tempo. Entretanto, HIROTA et alii (1982) documentaram focos alterados, até 12 semanas após hepatectomia parcial, através de reação histoquímica para  $\gamma$ -GT, em células hepáticas submetidas a uma única aplicação de N-nitrosodiethylamine, 6 h após hepatectomia parcial, demonstrando um dano do carcinógeno no material genético, sendo convertido em um genoma permanentemente alterado. O efeito da regeneração hepática foi interpretado como

um efeito promotor do aumento da conversão do dano no DNA através de permanentes mutações durante a replicação celular induzida pela hepatectomia parcial. Com o tempo, seguindo a regeneração hepática, o dano sobre o DNA é reparado, sugerindo que a extensão do reparo da alteração induzida pelo carcinógeno está relacionada à extensão da fase de descanso do ciclo celular e ao tempo de exposição ao carcinógeno.

SULAKHE & LAUTT (1987) comparando fígado com lesões pré-malignas e malignas, induzidas pela técnica de hepatectomia parcial num protocolo associado a diethylnitrosamina, com fígados de animais normais e fetais, sugeriram que a atividade da  $\gamma$ -GT está associada a um estado de proliferação ativa, desempenhando um papel de relevante importância. Os resultados encontrados por estes pesquisadores suportam que as alterações que ocorrem durante a hepatocarcinogênese, estão correlacionadas diretamente a atividade hepática da  $\gamma$ -glutamyltransferase, numa relação inclusive com o aparecimento da enzima no sangue.

### 3 - PROPOSIÇÃO

Face as considerações expostas, pretende-se investigar a atividade da enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), 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  $H_1$  periféricos)
2. Cimetidina (Antagonista específico de receptores  $H_2$ )
3. Terfenadina + Cimetidina

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - ANIMAIS

Foram utilizados 67 ratos albinos (Rattus Norvegicus Albinus, Wistar) machos, pesando entre 150 e 230g., fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP, e que receberam ração especial para animais de laboratório marca PRODUTOR, Nº 49 (ANDERSON CLAYTON S.A.) e água "AD LIBITUM".

### 4.2 - TÉCNICA DE HEPATECTOMIA PARCIAL

Foi utilizada a técnica de hepatectomia parcial de HIGGINS & ANDERSON(1931), descrita por MATTOS FILHO (1976), que consiste nos 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<sup>R</sup> - 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.

#### 4.3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os 67 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.

I	- terfenadina	2 mg/Kg/dia
II	- cimetidina	20mg/Kg/dia
III	- terfenadina + cimetidina	2 mg/Kg/dia e 20mg/Kg/dia
IV	- solução de NaCl a 0,9%	3 ml/Kg

---

I	- Teldane <sup>R</sup>	- MERREL LEPETIT <sup>TM</sup>
II	- Tagamet <sup>R</sup>	- SMITHKLINE & Cia.
IV	- Esse volume foi padronizado por ser equivalente àquele empregado nos demais sub-grupos.	

#### 4.4 - 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.

#### 4.5 - COLHEITA DO SANGUE PARA DOSAGEM $\gamma$ -GT

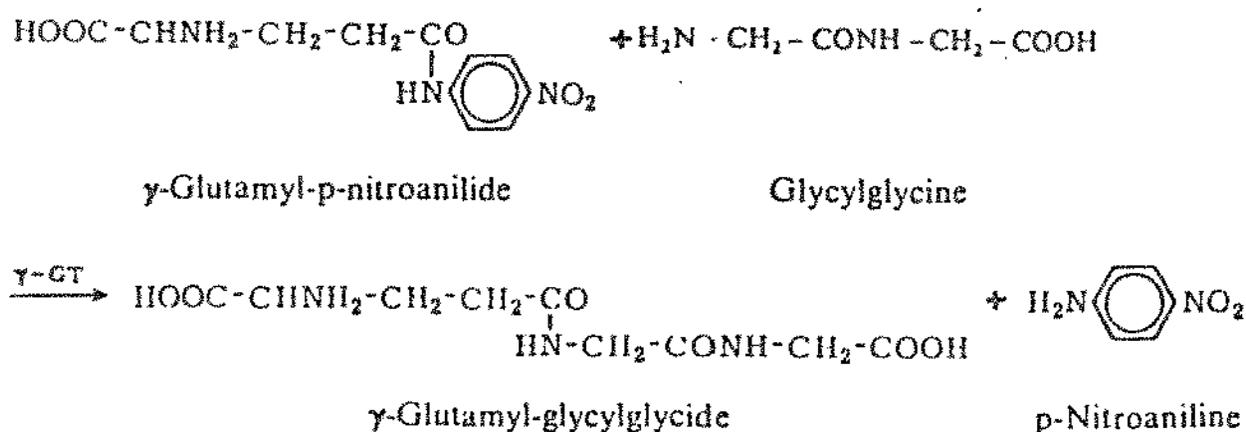
O sangue, para dosagem da  $\gamma$ -GT, era colhido por rompimento do plexo braquial (CURY, 1984). O método consiste numa incisão cutânea da região anterior torácica, e afastamento da pele formando uma bolsa lateral, que recebe o sangue oriundo da hemorragia. A colheita do sangue arterial e venoso misturados, 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, inclusive a  $\gamma$ -GT.

#### 4.6 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE $\gamma$ -GT NO SORO (SZASZ, 1974)

- Método cinético (405 nm)
- Substrato glutamil-p-nitroanilida
- Kit Gama GT - Reactoclin<sup>R</sup> (Celm Cia. Equipamentos de Laboratórios Modernos)

#### 4.6.1. Fundamentos do método

A enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase -  $\gamma$ -GT [( $\gamma$ -glutamyl)-peptide: amino-acid  $\gamma$ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.2.] cataliza a transferência do grupo  $\gamma$ -glutamil da  $\gamma$ -glutamil-paranitroanilida (doador) à molécula de glicilglicina (aceptor), liberando p-nitroanilina em quantidades equimoleculares, de acordo com a seguinte reação:



p-Nitroanilina tem uma absorção máxima a 405 nm, enquanto os substratos da reação não absorvem neste comprimento de onda. Portanto, a atividade da  $\gamma$ -GT é diretamente proporcional a quantidade de p-nitroanilina liberada por unidade de tempo (ORLOWSKI & MEISTER, 1963) que tem coloração amarela e pode ser medida fotocolorimetricamente.

#### 4.6.2. Características do sistema

A reação enzimática se desenvolve a velocidade constante, com cinética de ordem zero ( $dx/dt = k$ ). O substrato

to se encontra em concentrações ótimas de acordo com o Comitê de Enzimas da Sociedade Escandinava de Química Clínica(SSCC), assegurando máxima atividade. O sistema tem resposta linear até 250 U/l. O método cinético a 405 nm emprega um único reativo de trabalho e uma determinação requer 4 minutos.

#### 4.6.3. Reativos

Tampão: Glicilglicina 60 mmol/l tamponada a pH 8,4.

Substrato: Comprimidos contendo cada um, 8  $\mu$ mols de Gama-Glutamil paranitroanilida, 3 mM de Nitrato de Sódio e estabilizantes.

Preparação: Dissolve-se 1 comprimido em um tubo de ensaio com 2 ml de tampão, para 0,100 ml de amostra.

#### 4.6.4. Procedimento

As dosagens foram feitas logo após a preparação do substrato e sistematizadas na sequência de determinação de 3 (três) amostras. Para isto, 4 comprimidos eram dissolvidos em 8 ml de tampão, obtendo-se dois volumes de 2,5 ml e um volume de 3,0 ml.

As leituras de absorbância foram realizadas num espectrofotômetro, Spectronic 20 (Baush & Lomb, Rochester, N. Y., USA) em 405 nm, monitorando-se constantemente a temperatura de trabalho.

Ao tubo de ensaio com 2,5 ml ou com 3,0 ml de substrato, adicionava-se 0,125 ml ou 0,150 ml de soro respectivamente, disparando-se ao mesmo tempo cronômetro (Casio GS-11, Japan) e anotando-se a temperatura da reação. Após 1 minuto, levava-se ao espectrofotômetro, registrando a leitura de  $A_0$ , repetindo-se o registro de A, 1, 2 e 3 minutos após  $A_0$ , acertando-se o zero de A do aparelho com água destilada e deionizada.

#### 4.6.5. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA AS DOSAGENS

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 model 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.

As amostras hemolizadas foram desprezadas, embora a atividade enzimática da  $\gamma$ -GT seja estável mesmo nestas amostras, podendo ser determinada por uma variação da técnica descrita (GJERDE & MORLAND, 1985).

Anticoagulantes não foram utilizados, em função de interferirem na atividade enzimática (SHAW, L. et alii, 1983; CASTRO E SILVA JR., O. et alii, 1989.) e pelo fato, do soro dentro da técnica preconizada por SZASZ (1974), hemoliza-

do até 0,5g% de hemoglobina, não ter efeito na atividade enzimática da  $\gamma$ -GT.

Os soros foram mantidos a  $-5^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. A enzima no soro é estável entre  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $+25^{\circ}\text{C}$  (SZASZ, 1974; ADOLPH & LORENZ, 1980), podendo ser conservada até 2 semanas refrigerada ou 6 meses em temperaturas inferiores ao ponto de congelação (SHAW, 1983; REACTOCLIN, 1989) sem nenhuma perda da atividade catalítica.

#### 4.7 - CÁLCULOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA

Após o registro das leituras determinava-se o Delta de Absorbância por minutos ( $\Delta A/\text{min}$ ), nos tempos  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ , conforme a fórmula abaixo:

$$\Delta A/\text{min} = \frac{(A_1 - A_0) + (A_2 - A_1) + (A_3 - A_2)}{3}$$

Em seguida, multiplicava-se o valor encontrado por 2077 e pelo fator de correção de temperatura:

$$\gamma - \text{GT U/l} = \Delta A/\text{min} \times 2077 \times \text{Fator de correção de Temperatura}$$

obtido na Tabela (cf. Apêndice 3), determinando-se desta forma a atividade enzimática da  $\gamma$ -GT em Unidades Internacionais por litro (U/l).

Segundo a Comissão Internacional para Nomenclatura Bioquímica, uma Unidade Internacional (U) é a atividade en

zimática que cataliza, por minuto, em condições ótimas, a transformação de um micromol ( $1 \mu\text{Mol}$ ) de substrato (BERGMEYER & GAWERN, 1974). Portanto, a atividade catalítica não é referida à quantidade ou ao peso da enzima, porque ainda não se pôde isolar puras um grande número delas. As atividades catalíticas nos líquidos biológicos são em geral referidas a 1 ml ou a 1 litro. Por isso são expressas em mU/ml ou U/l, sendo numericamente idênticas, embora atualmente prefira-se a designação internacional U/l (ADOLPH & LORENZ, 1980) tal como neste experimento.

#### 4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estatísticos foram submetidos a Análise de Variância, Teste F e Teste "t" de Student, ao nível de significância de 5 % (VIEIRA, S. 1985).

## 5 - RESULTADOS

Os dados das Tabelas 1, 2 e 3 foram calculados e sumarizados ( $n; \bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{x}}$ ) a partir dos resultados obtidos, que podem ser encontrados nos apêndices 4 a 15, entre as páginas 79 e 90 .

A análise estatística mostrou que as variâncias de todas as amostras testadas foram homocedásticas. Desta maneira, através do Teste F, não foi rejeitada a hipótese de que as variâncias são iguais e para proceder ao Teste "t" de Student, ou simplesmente teste "t", estabelecemos o nível de significância  $\alpha = 5 \%$  e calculamos

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s^2}}$$

onde  $s^2$  é a variância ponderada das duas amostras, calculada através da fórmula

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

O valor de "t", assim calculado, foi associado a  $n_1 + n_2 - 2$  graus de liberdade.

Conseqüentemente, pelo teste "t" de Student os grupos controles as 6 h , 24 h e 360 h não foram estatisticamente diferentes.

TABELA 1 - Valores médios de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro e variância 6 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	$\bar{x}$	$\frac{s^2}{x}$
Controle (NaCl 0,9%)	7	5.82	1.20
Terfenadina (2mg/Kg/dia)	6	6.49	1.86
Cimetidina (20mg/Kg/dia)	7	5.22	0.82
Terfenadina (2mg/Kg/dia) + Cimetidina (20mg/Kg/dia)	7	6.07	1.35

TABELA 2 - Valores médios de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro, e variância, 24 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	$\bar{x}$	$\frac{s^2}{x}$
Controle (NaCl 0,9%)	6	6.95	1.06
Terfenadina (2mg/Kg/dia)	4	4.32	0.80
Cimetidina (20mg/Kg/dia)	5	5.19	0.61
Terfenadina (2mg/Kg/dia) + Cimetidina (20mg/Kg/dia)	6	4.21	0.65

TABELA 3 - Valores médios de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro, e variância 360 h após hepatectomia parcial, para os diferentes grupos experimentais.

Grupos	n	$\bar{x}$	$s^2_x$
Controle (NaCl 0,9%)	4	7.17	1.53
Terfenadina (2mg/Kg/dia)	4	13.16	2.38
Cimetidina (20mg/Kg/dia)	6	6.59	1.18
Terfenadina (2mg/Kg/dia) + Cimetidina (20mg/Kg/dia)	5	14.02	0.96

Os valores da  $\gamma$ -GT no soro para os grupos tratados com Cimetidina 20 mg/Kg/dia às 6 h, 24 h e 360 h não foram estatisticamente diferentes dos grupos controles (Fig. 4, 5 e 6). Entretanto, para o grupo dos animais submetidos a Terfenadina (2 mg/Kg/dia) + Cimetidina (20 mg/Kg/dia) ao tempo de 360 h, o valor da  $\gamma$ -GT foi em média, significativamente maior do que do grupo controle (Fig. 6), não sendo significativamente diferente aos tempos de 6 h e 24 h (Fig. 4 e 5). O grupo dos animais submetidos a Terfenadina (2 mg/Kg/dia) ao tempo de 360 h teve o valor da  $\gamma$ -GT no soro maior que o do grupo Controle (Fig. 6), não sendo em média estatisticamente diferente do valor obtido para o grupo de animais submetidos a ambas as drogas, mas significativamente maior, estatisticamente, que o valor encontrado para o grupo tratado com Cimetidina (20 mg/Kg/dia) neste tempo. A atividade catalítica da  $\gamma$ -GT no soro do grupo dos animais tratados com Terfenadina (2 mg/Kg/dia) não foi, em média significativamente diferente do valor encontrado para os animais dos grupos Controles ao tempo de 6 e 24 h (Fig. 4 e 5).

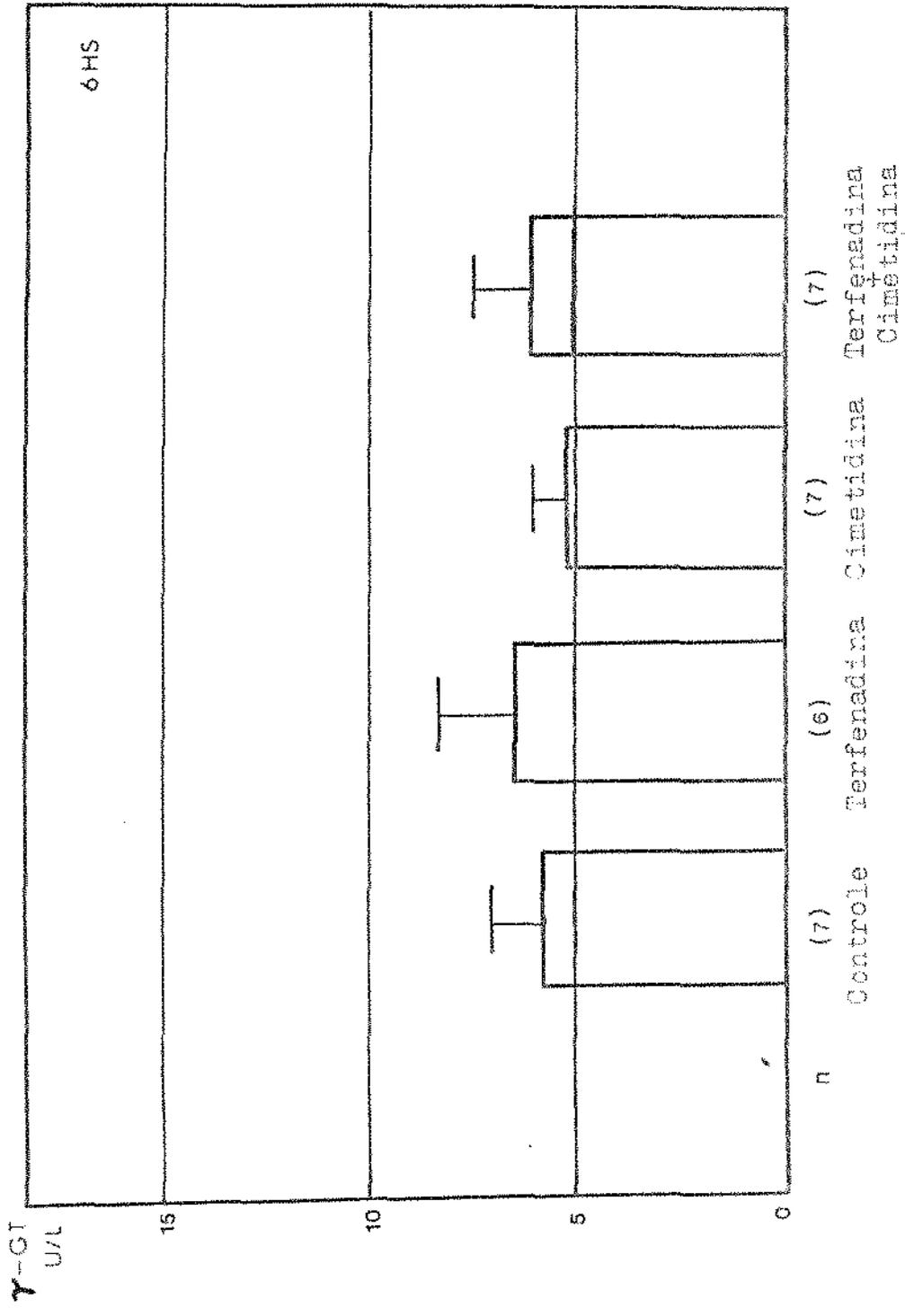


Fig. 4 - Histograma de barras, mostrando valores de  $\gamma$ -GT (U/l) nos diferentes grupos experimentais, 6 horas após a hepatectomia parcial.

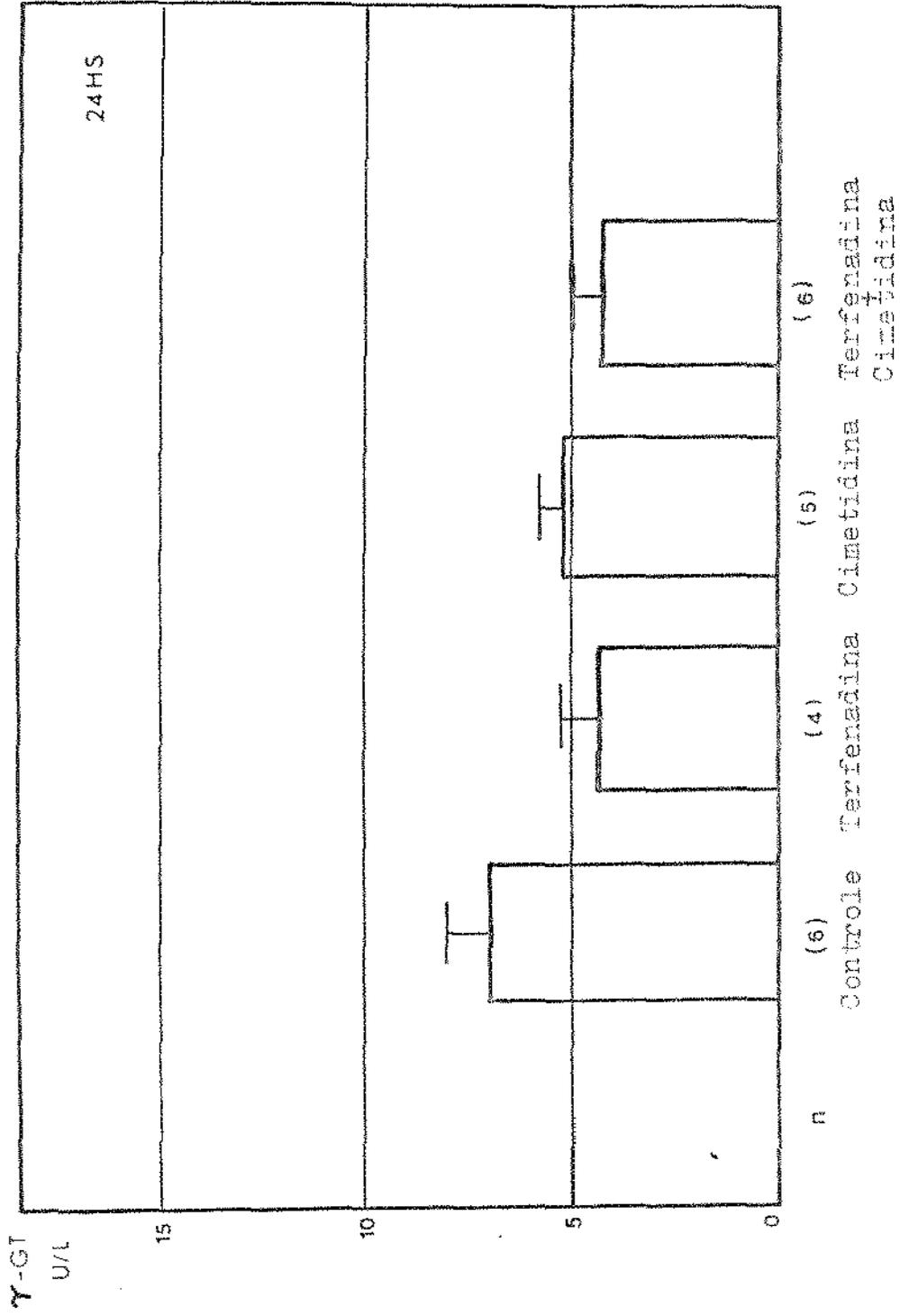


Fig. 5 - Histograma de barras, mostrando valores de  $\gamma$ -GT (U/l) nos diferentes grupos experimentais, 24 horas após a hepatectomia parcial.

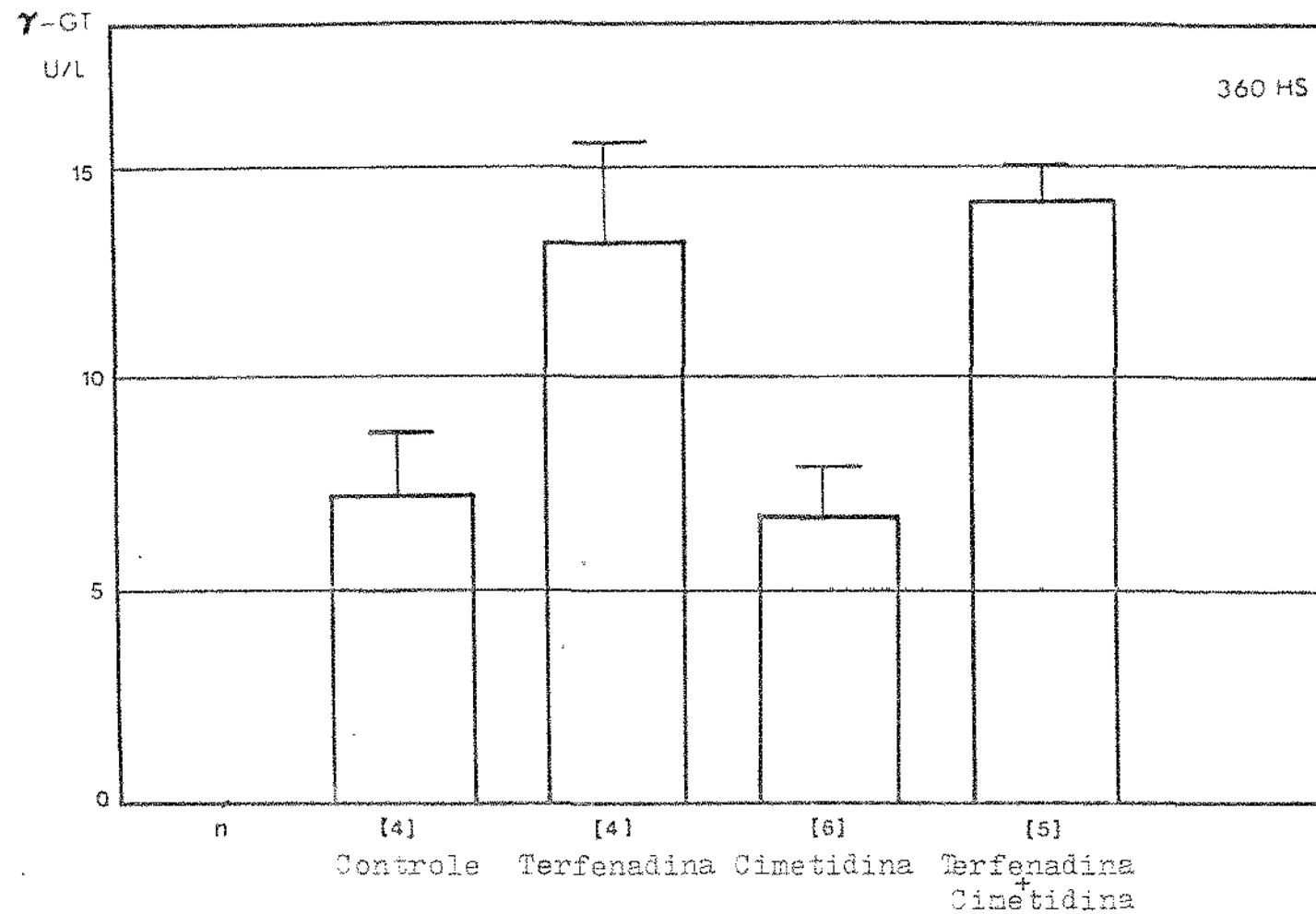


Fig. 6 - Histograma de barras, mostrando valores de  $\gamma$ -GT (U/l) nos diferentes grupos experimentais, 360 horas após a hepatectomia parcial.

## 6 - DISCUSSÃO

Na discussão dos resultados devemos levar em consideração que os tecidos de vários órgãos e de várias espécies diferem significativamente quanto ao conteúdo e a capacidade de formar histamina (KOWALEWSKI et alii, 1969), tendo o fígado um papel primário no metabolismo da histamina endógena. Por isso, a alimentação dos animais é importante e o fornecimento de ração "ad libitum", livre de antibióticos e quimioterápicos (ALÊNDI-CE 2), prende-se ao fato de que ratos privados de alimento reduzem o "output" e a capacidade de formação de histamina (KAHLSON & ROSENGREN, 1968). Esse fenômeno ocorre em virtude da histidina decarboxylase necessitar de um cofator essencial que é o piridoxal-5-fosfato obtido de carne, fígado, pão, cereais integrais, soja (MARCUS & COULSTON, 1987) presentes na dieta fornecida. KAHLSON et alii (1963) observaram que em ratos com dieta sem piridoxal fosfato a capacidade de formação de histamina era reduzida a

50% ao tempo de 2 semanas, continuando a cair para atingir aproximadamente 20% em 6-7 semanas, com a taxa original de formação podendo ser restaurada rapidamente adicionando pyridoxal fosfato a dieta.

Buscando-se um melhor controle das variáveis que poderiam interferir no experimento, realizamos o ensaio com ratos machos, uma vez que FONVERT et alii (1985) determinaram diferenças nos níveis teciduais de histamina entre machos e fêmeas, além de que SCHEINKMANN et alii (1980) observaram diminuição dos níveis de histamina depois de ovariectomia e aumento após castração de machos, numa relação hormonal, onde o ciclo estral poderia circunstancialmente, se constituir numa interferência experimental. Ainda mais que BAROUKI et alii (1983) apresentaram que o estradiol provoca estimulação da atividade hepática da  $\gamma$ -GT, em ratos normais Wistar fêmeas demonstrando que a atividade basal da  $\gamma$ -GT nos fígados de ratos fêmeas, é mais alta que a dos fígados de machos e que quando ratos machos são castrados, a atividade da  $\gamma$ -GT nos fígados deles é estimulada a atingir níveis similares àqueles de fígado de rata normal. Tais observações, inclusive as realizadas por BONE III et alii (1985), que ao investigar o efeito da hepatectomia parcial sobre a expressão da  $\gamma$ -GT observaram o envolvimento de esteróides sexuais induzindo a  $\gamma$ -GT em ratos fêmeas, com níveis no fígado permanecendo elevados até 1 ano depois da cirurgia através de mecanismo desconhecido. Estas informações confirmam a decisão de se ter utilizado ratos machos para a realização deste experimento, visando diminuir a interferência de variáveis biológicas. Outro fator de interferência encontra-se no trabalho de SULAKHE & LAUTT (1985) que examinando a atividade específica da  $\gamma$ -GT em fígados de uma variedade de espécies animais, encontraram uma atividade enzimática aproximadamente 150 vezes menor ( $0,24 \pm 0,004$  nmol/mg/min) em ratos machos, que a atividade da  $\gamma$ -GT em fígado de cobaias machos ( $38,16 \pm 1,40$  nmol/mg/min), configurando uma atividade baixa e consequentemente sensível a alterações intra e extra-hepáticas.

Existem muitos aspectos concernentes a atividade enzimática (DIXON et alii, 1979) com muitos autores demonstrando inclusive uma variabilidade bastante extensa entre os indivíduos, e durante o próprio curso das doenças hepáticas.

Atualmente, sabemos que o nível da  $\gamma$ -GT no soro não está correlacionado necessariamente a atividade hepática da enzima (SELINGER et alii, 1982), embora a elevação significativa da atividade da  $\gamma$ -GT no soro seja oriunda do fígado, em função da existência de um gradiente do órgão para a circulação sanguínea (SHAW et alii, 1983; SELVARAJ & BALASUBRAMANIAN, 1985; OHMO et alii, 1988).

Esta variabilidade pode ser constatada durante a regeneração hepática após o procedimento da hepatectomia parcial. SULAKHE (1986) demonstrou que a atividade da  $\gamma$ -GT aumenta até 5,6 vezes acima do valor normal no fígado de ratos machos Fischer 344, sete dias após hepatectomia parcial, declinando em atividade nos próximos 14 dias e expressando valores normais três semanas após a hepatectomia parcial. Este aumento entretanto, não é verificado séricamente, uma vez que SEKAS & COOK (1979) avaliando a atividade da  $\gamma$ -GT no soro de ratos submetidos a hepatectomia parcial, observaram que a enzima atinge a máxima atividade 6 h após a hepatectomia parcial, variando aproximadamente entre 4-7 U/l durante duas semanas. O mais interessante é que os valores encontrados para os animais submetidos a hepatectomia parcial foram semelhantes aos controles que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico. Desta maneira, durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial os níveis da  $\gamma$ -GT no soro não sofrem mudanças significativas, fato confirmado neste experimento, uma vez que os valores para os grupos controles aos tempos de 6 h, 24 h e 360 h não foram estatisticamente diferentes.

Entretanto, sabe-se que algumas drogas são capazes de induzir a  $\gamma$ -GT no fígado na ausência de doenças hepáticas (WHITFIELD et alii, 1972; SATOH et alii, 1982; ÖMER et alii, 1989).

Este fato é bastante curioso, uma vez que a Terfenadina induziu a atividade da  $\gamma$ -GT no soro dos ratos, 360 h após hepatectomia parcial, dentro das nossas condições experimentais, mas que não pode ser totalmente sustentada e a ela atribuída, em função da literatura reportar a indução da  $\gamma$ -GT por fenitoína, fenobarbital, aminopirina e seus metabólitos, ácido acetilsalicílico, anticoagulantes, anticoncepcionais, glicocorticóides (BADYLAK & VAN VLEET, 1982), não fazendo referência a antagonistas de receptores histamínicos. Conseqüentemente, para creditar-se a indução da enzima, atribuindo-se somente a terfenadina o efeito observado, necessita-se saber se a droga é capaz de induzir a  $\gamma$ -GT fora das condições experimentais da regeneração hepática. Uma vez que, durante este processo onde a própria síntese de DNA pelos hepatócitos é sincronizada, iniciando-se 12 horas depois da hepatectomia parcial, atingindo o máximo às 24 horas, as células hepáticas além de poderem responder a sinais intra e extrahepáticos (mecanismos parácrinos e endócrinos) são capazes de sintetizar fatores que regulam o seu próprio crescimento (mecanismos autócrinos), num complexo e ordenado circuito, durante a regeneração hepática (FAUSTO & MEAD, 1989).

Como o valor da  $\gamma$ -GT no grupo dos animais submetidos a ambas as drogas, ao tempo de 360 h foi, em média, maior ao nível de significância de 5%, do que no grupo controle, e os animais submetidos a Terfenadina ao tempo de 360 h tiveram os valores da  $\gamma$ -GT maiores que os do grupo controle, não sendo diferentes do grupo dos animais submetidos a ambas as drogas, mas diferentes ao nível de 5% do grupo tratado com Cimetidina, sugere que somente a Terfenadina foi capaz de induzir a atividade catalítica da  $\gamma$ -GT, não ocorrendo interação com o antagonista de receptor  $H_2$  - Cimetidina, em nenhum dos tempos estudados da regeneração hepática. Fato consubstancialmente observado, uma vez que a Cimetidina na dose de 20 mg/Kg/dia, quando administrada isoladamente, não foi capaz de induzir a atividade da  $\gamma$ -GT.

Os resultados encontrados para os grupos tratados com Cimetidina às 6 h, 24 h e 360 h após a hepatectomia parcial, evidenciam que este antagonista de receptor  $H_2$  determina pequena incidência de efeitos hepatotóxicos, conforme já demonstrado em dez anos de experiência clínica em todo o mundo, envolvendo mais de 35 milhões de pacientes com raros casos de efeitos adversos sobre o fígado (BASSAN et alii, 1986; SABESIN & PRESTON, 1986).

Já, o aumento da atividade catalítica da  $\gamma$ -GT para o grupo dos animais tratados com Terfenadina, pode ser justificado em função da farmacocinética da droga. Segundo LEESON et alii (1975), a administração de  $^{14}C$ -Terfenadina em ratos, demonstrou que o fígado é um dos órgãos que apresenta a mais alta concentração da droga. Trinta minutos depois de uma dose de 10 mg/Kg (p. c.), a concentração no sangue foi em média 9,9 ng/ml, persistindo estes níveis por 6 h, enquanto a concentração no fígado, 30 min depois da dose, foi de 57 ng/g, declinando para 10 ng/g em 6 h. Isto indica que a Terfenadina em ratos apresenta um rápido metabolismo sendo excretada totalmente em 72 h. Fato confirmado por estes pesquisadores, que em trabalho subsequente (LEESON et alii, 1982) demonstraram que a Terfenadina é preferencialmente eliminada do organismo através das fezes, tendo na excreção biliar o maior papel na disposição metabólica de  $^{14}C$ -Terfenadina em rato.

Os estudos confirmaram que em rato o metabolismo de  $^{14}C$ -Terfenadina é rápido e completo, o que sugere que a  $\gamma$ -GT pode estar associada ao sistema responsável pela biotransformação e excreção deste princípio ativo em função de que a enzima participa na eliminação de xenobióticos via excreção biliar. Desta maneira, em decorrência do processo de regeneração hepática, a droga poderia acumular-se no organismo durante um período inicial culminando por provocar uma indução da  $\gamma$ -GT, no epitélio dos canais biliares intrahepáticos, num ciclo êntero-hepático de excreção e reabsorção dinâmico e acentuado, com o objetivo de detoxificar o organismo dos animais tratados com a droga, via excreção biliar.

Entretanto, como a dose utilizada durante o experimento foi reduzida a 0,0042 de uma provável  $DL_{50}$  i.p. de 474 mg/Kg, ou seja 2 mg/Kg/dia, configura-se uma margem de segurança de 237 vezes abaixo do valor sugerido para  $DL_{50}$  i.p.; como a  $DL_{50}$  p.o. é 5000 mg/Kg (GIBSON et alii, 1982) e o fator de segurança mínimo para a utilização de uma droga é de 100 vezes, de forma a reduzir os níveis sem efeito toxicológico a 0,01 (LAVORENTI & GIANNOTTI 1985), o valor encontrado para atividade catalítica da  $\gamma$ -GT pode ser representativo de alguma alteração no processo de regeneração hepática. Esta alternativa torna-se interessante uma vez que BIANCHARD et alii (1986), observaram uma diminuição do crescimento compensatório do rim, em ratos submetidos a antagonistas de receptor  $H_1$ - $H_2$  e BUDROE et alii (1984), demonstraram através de cultura de hepatócitos, que alguns antihistamínicos são capazes de induzir alterações genéticas, através de mecanismos desconhecidos, sendo potencialmente carcinogênicos.

Estudos cinéticos dos efeitos antihistamínicos da Terfenadina (CHENG & WOODWARD, 1982), demonstraram que este fármaco liga-se seletivamente ao receptor  $H_1$  da histamina, apresentando uma baixa dissociação deste receptor. Com isto, a Terfenadina é capaz de produzir um efeito antihistamínico muito mais consistente que outros fármacos do mesmo grupo como a chlorpheniramina e com longa duração de ação. Além disso, a Terfenadina é biotransformada em muitos metabólitos, sendo que o mais importante, um ácido carboxílico análogo, possui aproximadamente 1/3 da sua atividade antihistamínica (WOODWARD & MUNRO, 1982) o que intensifica o tempo e a ação sobre os receptores  $H_1$ , além de poder aumentar a inibição da enzima histamina-N-metiltransferase, através de outro mecanismo atribuído aos antihistamínicos e relatado por NICHOLSON & STONE (1982).

A histamina é metabolizada por duas vias principais (TRUMMEL, 1983). A mais importante envolve a metilação do anel imidazólico e é catalisada pela enzima histamina-N-metiltransfe-

rase (HMT). Por essa via grande parte do produto resultante, a N-metil-histamina (MeHi), é convertida pela monoaminoxidase(MAO) em ácido metilimidazolacético (MeImAA). Na outra via, a histamina sofre desaminação oxidativa catalisada pela enzima inespecífica diaminoxidase (DAO), resultando no ácido imidazolacético (ImAA), grande parte do qual é subseqüentemente conjugado com ribose.

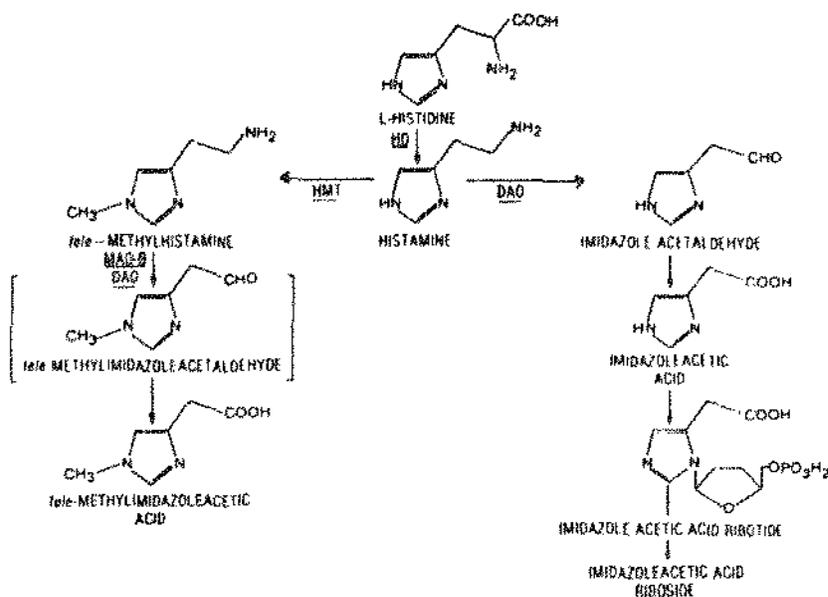


Fig. 7 - Principais vias metabólicas da histamina.

HD=histidine decarboxylase; HMT=histamina methyltransferase; DAO=diaminoxidase; MAO-B=monoaminoxidase B. (GREEN et alii, 1987)

Como este metabolismo sofre variações em diferentes situações e tecidos, as vias que estão sendo mobilizadas e a retroalimentação histamínica em condição temporária ou perene, deve ser considerada neste experimento, uma vez que HESTERBERG et alii (1984) encontraram uma alta atividade de histamina-N- metiltransferase no fígado de humanos, enquanto que a atividade de diaminoxidase não foi observada. Este fato é importante, em função da possibilidade do bloqueio de receptores  $H_1$  pela Terfenadi

na ter-se efetivado e, desta maneira, o comportamento observado na atividade da  $\gamma$ -GT possa corresponder à droga, ou ao acúmulo de histamina e/ou metabólitos numa relação com a via catabólica durante a regeneração hepática. A complexidade dessa observação se fundamenta na existência de um processo extremamente dinâmico e alternativo, uma vez que em fígado de animais portadores de fibrossarcoma, a via da diaminoxidase (DAO) é a que está aumentada. A observação realizada por KAŚLINSKI et alii (1984) levanta a questão de que não apenas o aumento da histamina, mas a ativação do catabolismo oxidativo com a formação de ácido imidazolacético pode também estar envolvido na regulação homeostática de crescimento e que portanto, o antagonista de receptor  $H_1$  poderia ter interferido. Esta inferência é verdadeira, no momento em que reportamo-nos ao trabalho de SESSA et alii (1982), que demonstraram uma indução da atividade da diaminoxidase (DAO) na regeneração hepática, em ratos, sendo mediada pela síntese de nova enzima, num evento comum de resposta celular frente ao processo de crescimento.

Como os receptores para a histamina expressam diferentes respostas teciduais, conforme a distribuição e a atividade uni ou multidirecionada celular, a discussão dos dados obtidos, que revelam apenas um ponto referencial estático, não deve perder a visão abrangente e dinâmica do comportamento do fígado após a hepatectomia parcial. Isto é muito importante em função da atividade histamínica tecidual e da resposta adaptativa da regeneração hepática frente as drogas que foram ensaiadas. Consequentemente, a atividade aumentada da enzima  $\gamma$ -GT nos grupos tratados com Terfenadina isoladamente, e associada a Cimetidina, ao tempo de uma regeneração que deveria estar completa, sugere a presença de alguma alteração na atividade regenerativa normal do fígado.

Da mesma maneira que pacientes portadores de altos níveis de histamina no plasma não apresentam efeitos sistêmicos,

indicando a existência de mecanismo adaptativo dando aos pacientes menos sensibilidade à histamina circulante (GRANERUS et alii 1983), o encontro, algumas vezes, de baixos níveis de histamina no soro de pacientes com doenças malignas (MOTOKI et alii, 1984), não descarta a possibilidade de que isto também ocorra refletindo provavelmente característica típica de metabolismo celular que necessita apenas metodologia mais acurada para a sua resolução (GRANERUS & WASS, 1984).

Entretanto, o mecanismo pode ser mais complexo envolvendo outros sistemas com o objetivo de captar a histamina circulante, num "uptake" eficiente e importante para o fígado em regeneração, uma vez que as próprias células em crescimento sintetizam histamina (NOLTE et alii, 1987) e, o tempo do pico da histamina no fígado em regeneração, interessantemente é o mesmo da máxima atividade mitótica celular.

Como TASAKA & NAKAYA (1987) demonstraram que a histamina é incorporada celularmente, promovendo uma diferenciação celular de células progenitoras através de um sistema de transporte específico para a histamina, isto sugere que a  $\gamma$ -GT pode estar envolvida neste processo de incorporação fundamental para a diferenciação celular. Os valores da enzima encontrados no soro ao tempo de 360 h após a hepatectomia parcial podem estar relacionados ao "uptake" da histamina, devido ao fato do antagonista histamínico utilizado, ter a capacidade de bloquear o receptor  $H_1$ , mas não impedir a liberação de histamina por mastócitos presentes no tecido, que, somando-se à histamina nascente, incrementaria a taxa da amina disponível no tecido. Como a Terfenadina liga-se ao receptor durante mais tempo que outros antihistamínicos, embora demore mais para atingir a saturação dos receptores, isto justificaria o efeito observado as 360 h com a dosagem de 2 mg/Kg/dia fracionadas de 6 em 6 h..

O estudo da transdução farmacológica e/ou fisiológica molecular da histamina é um campo atual e totalmente aberto à pesquisa com muitos pesquisadores somando esforços no sentido

de elucidar os aspectos concernentes ao assunto. Entretanto, a diversidade de respostas celulares frente ao autacóide, dificulta a compreensão do seu papel na intimidade dos tecidos, pois sugere a existência de outros receptores com conformações espaciais diferentes das conhecidas atualmente. Isto foi confirmado com a descoberta de uma nova classe de receptores histamínicos, farmacologicamente distintos dos receptores  $H_1$  e  $H_2$ , os receptores  $H_3$ .

Os receptores  $H_3$  tem sido identificados no sistema nervoso central e periféricamente, atuando no processo de modulação da neurotransmissão simpática em nervos perivascularares. ISHIKAWA & SPERELAKIS (1987) descobriram que os receptores  $H_3$  são muito mais sensíveis à histamina que os receptores  $H_2$ , desempenhando uma importante função no controle fisiológico da circulação. Segundo estes pesquisadores os receptores  $H_3$  podem produzir vasodilatação pela inibição do tônus simpático, e além disso, são responsáveis pela modulação colinérgica nas vias aéreas estando envolvidos no controle "feedback" de síntese e liberação da histamina (ICHINOSE et alii, 1989). Tal controle, especialmente em relação a captação da histamina pelas células, mostra-se de uma maneira extremamente complexo uma vez que sugere um mecanismo envolvendo interação com DNA e possivelmente a ativação de receptores específicos, passando por biossíntese de peptídeos.

A biossíntese de uma proteína carreadora dependeria da interação da histamina incorporada, com o DNA, que poderia estar relacionado a um receptor especial ativando a captação histamínica, ou também, através de um sistema de transporte no qual os receptores  $H_2$  poderiam estar participando (GESPACH et alii 1985). A verdade é que a síntese de proteína está envolvida no processo guiando a captação de histamina, por causa do efeito inibitório que foi observado por TASAKA & NAKAYA (1987) com o cicloheximide e a actinomicina D, na incorporação específica de  $^3H$ -histamina.

Com isto, o fato de que nenhum mecanismo de "uptake"

para histamina, pode ser observado no cérebro (KHANDELWAJ et alii 1982), se constitui num dado bastante peculiar, uma vez que as células nervosas são destituídas de competência mitótica (GOSS, 1967), o que inclusive as inviabiliza para malignização.

O mais interessante é que a  $\gamma$ -glutamilhistamina, o maior produto da histamina em "Aplysia californica" (WEINREICH, 1985), pode ser formada pelos tecidos em mamíferos, como parte de outra via metabólica histamínica até há bem pouco tempo desconhecida. A  $\gamma$ -glutamilação da histamina pode ser catalizada pela glutamine synthetase e  $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase. Entretanto, pesquisas recentes indicam que a reação é processada pela enzima  $\gamma$ -GT (GREEN et alii, 1987). Esta informação é de substancial importância, uma vez que ao tempo de 360 h, tivemos um aumento significativo para a atividade catalítica desta enzima nos animais tratados com o antagonista de receptor  $H_1$ , o que, desta maneira, poderia estar correlacionado com a formação de  $\gamma$ -glutamilhistamina.

FESUS et alii (1985) determinaram que a quantidade de proteína ligada à  $\gamma$ -glutamilhistamina é diretamente proporcional à atividade da transglutaminase. A atividade enzimática de células neoplásicas mastocitárias de camundongos (PT18), aumentou concomitantemente com a liberação de histamina, induzida por mecanismos dependentes de IgE e pela exposição a ionóforos. Fato observado por WAJDA et alii (1961) que tratando animais com endotoxina de "Salmonella typhosa", concomitantemente com histamina, conseguiram incorporar o autacóide em proteínas do fígado dos animais, acompanhado de um aumento na atividade da transglutaminase.

Uma vez que mastócitos, incluindo aqueles no fígado são portadores de enzimas proteolíticas (LAGUNOFF & BENDITT, 1963) um peptídeo ou peptídeos contendo  $\gamma$ -glutamilhistamina devem ser liberados em circunstâncias especiais. Consequentemente, para GREEN et alii (1987), outros peptídeos da histamina podem exis-

tir, com transduções farmacológicas e/ou fisiológicas desconhecidas.

A tentativa de interpretar os resultados obtidos com o antagonista de receptor de  $H_1$ , encontra uma dificuldade significativa devido a participação da  $\gamma$ -GT em uma série de reações bioquímicas complexas, que abrangem a conversão de leucotrieno C para leucotrieno D pela remoção de um resíduo glutamil (ÖRNING & HAMMARSTRÖM, 1982), a metabolização da S-D-lactoylglutathiona no sistema glyoxalase (THORNALLEY, 1990), e a formação de oxalyl thioesters (OTEs) a partir da S-oxalylglutathiona (Gs-Ox) (HAMILTON et alii, 1988), que podem estar correlacionadas com o sistema fosfatidil-inositol, responsável por inúmeros sinais de transdução celular (SAKUMA et alii, 1988), possivelmente bloqueado pelo antagonista de receptor  $H_1$ .

Além de participar da regulação da concentração intracelular da glutathiona e do transporte de compostos, com seu significado qualitativo e quantitativo (em relação a outros sistemas de transporte) variando em vários tecidos e durante diferentes estágios do desenvolvimento e crescimento celular, a  $\gamma$ -GT serve como um componente estrutural da membrana, como parte de um mecanismo protetor da célula ou da própria membrana celular como também de um sistema para síntese da mesma, num interrelacionamento com o metabolismo de xenobióticos, alterações no microambiente, mudanças hormonais associadas com envelhecimento, interações específicas epitélio-mesenquimais ou outras influências modulatórias (SOLT et alii, 1985), funcionando como uma espécie de receptor para compostos externos, os quais ao serem transportados para dentro da célula, desencadeiam e modulam sinais que afetam a atividade metabólica celular.

Os conhecidos substratos desta enzima incluem glutathiona (que ocorre predominantemente intracelularmente), outros  $\gamma$ -glutamil compostos, aminoácidos e peptídeos. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade que a transferase interage com

outros substratos e sistemas, tendo funções adicionais, não correlacionadas com as atividades catalíticas conhecidas.

Esta interação complexa com outros sistemas bioquímicos se constitui numa realidade, em virtude da atividade histoquímica da  $\gamma$ -GT ser negativa para células hepáticas e positiva no fígado, para células de Kupfer, epitélio dos condutos biliares e endotélio de vasos (RUTENBURG et alii, 1969). Como vimos na revisão da literatura, as células endoteliais desempenham um papel importantíssimo nos processos de regeneração e reparação tecidual sendo ativadas pela histamina, com transformação celular sendo avaliada pela atividade da  $\gamma$ -GT (CASPERS & DIGLIO, 1984). O fato mais relevante é que atualmente sabemos que embora os hepatócitos contenham receptores para TGF- $\beta$  ("Transforming Growth Factor - $\beta$ ") e respondam a este fator, eles não o sintetizam, sendo as células endoteliais num circuito parácrino, as responsáveis pela produção deste fator que desempenha um papel no controle da replicação de hepatócitos durante a regeneração hepática (FAUSTO & MEAD, 1989).

Conseqüentemente, a muito baixa atividade da  $\gamma$ -GT no fígado, onde um alto nível de transporte de aminoácidos tem lugar, indica que a enzima não está diretamente correlacionada com o transporte de aminoácidos no fígado de rato (SULAKHE & LAUTT, 1987). Isso sugere a participação da enzima em reações associadas com processos da mais alta significância fisiológica e patológica, através de mecanismos ainda não entendidos (WENHAM et alii, 1986), estabelecendo uma série de transduções, as quais motivam a realização de experimentos que poderão posteriormente definir com mais acuidade a inter-relação existente, com os receptores  $H_1$ , que sugerimos neste experimento.

## 7 - CONCLUSÕES

1. Os valores da atividade da  $\gamma$ -GT no soro de ratos parcialmente hepatectomizados, não foram significativamente diferentes nos períodos de 6, 24 e 360 h após a cirurgia.

2. A Cimetidina não alterou a atividade da  $\gamma$ -Glutamyltransferase no soro de ratos nos períodos de 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial.

3. A Terfenadina não alterou a atividade da  $\gamma$ -Glutamyltransferase no soro de ratos nos períodos de 6 e 24 h após hepatectomia parcial.

4. A Terfenadina induziu maior atividade da  $\gamma$ -Glutamyltransferase no soro de ratos, 360 h após hepatectomia parcial.

5. Não houve interação entre os antagonistas de receptor  $H_1$  (Terfenadina) e  $H_2$  (Cimetidina) sobre os níveis de atividade da  $\gamma$ -Glutamyltransferase no soro de ratos, 6, 24 e 360 h após hepatectomia parcial.

## 8 - RESUMO

Ratos albinos machos foram utilizados para investigar os efeitos de antagonista específico de receptores  $H_1$  periféricos, Terfenadina e receptores  $H_2$ , Cimetidina sobre a enzima  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) no soro destes animais durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial. 67 ratos divididos em três grupos foram sacrificados respectivamente, 6 h, 24 h e 360 h após a técnica cirúrgica. Cada grupo contendo 4 sub-grupos receberam doses de Terfenadina (2 mg/Kg/dia), Cimetidina (20 mg/Kg/dia), Terfenadina (2 mg/Kg/dia) + Cimetidina (20 mg/Kg/dia) e NaCl 0,9% (Controle), intraperitonealmente durante o tempo do experimento. Os resultados obtidos sugerem que o antagonista de receptor  $H_1$  periférico - Terfenadina, induziu a atividade da  $\gamma$ -glutamyltransferase no soro de ratos, 360 h após hepatectomia parcial.

## 9 - SUMMARY

Adult male albino rats (Wistar strain) were used to investigate the effects of selective antagonist of only peripheral histamine  $H_1$ -receptors, Terfenadine and histamine  $H_2$ -receptors antagonist, Cimetidine on the serum activity of the enzyme  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) during liver regeneration after partial hepatectomy. Sixty-seven animals were randomly divided into three groups and were sacrificed respectively, 6 h, 24 h and 360 h postoperatively. Each group was divided into four sub-groups that received doses of Terfenadine (2 mg/Kg/day), Cimetidine (20 mg/Kg/day), Terfenadine (2mg /Kg /day) + Cimetidine (20 mg/Kg/day) and NaCl 0,9 % (Control), intraperitoneally during the experimentation. The results obtained suggested that peripheral histamine  $H_1$ - receptor antagonist - Terfenadine, induced the  $\gamma$ -glutamyltransferase serum activity in rats, 360 h after partial hepatectomy.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADOLFH, L. & LORENZ, R. Diagnóstico enzimático das doenças do coração, fígado e pâncreas. Basileia (Suíça), S. Karger AG, 1980. 128 p.
2. AKAMATSU, K. et alii Efeitos dos antagonistas  $H_2$  no fluxo sanguíneo hepático total em pacientes com doença hepática crônica. SKOPIA 18(5):20, 1986.
3. BADYLAK, S. & VAN VLEET, J. Tissue  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity and hepatic ultrastructural alterations in dogs with experimentally induced glucocorticoid hepatopathy. Am. J. Vet. Res. 43(4):649-655, 1982.
4. BALASEGARAM, M. & JOISHY, S.K. Hepatic resection: the logical approach to surgical management of major trauma to the liver. Am. J. Surg. 142:580-3, 1981.
5. BAROUKI, R. et alii The hormonal induction of gamma glutamyltransferase in rat liver and in a hepatoma cell line. Mol. Cell. Biochem. 53/54:77-88, 1983.

6. BASSAN, H. et alii Effects of three H<sub>2</sub> antagonists on the isolated perfused rat liver. Correlation of bile flow changes with potential for causing hepatic disease in patients. Biochem. Pharmac. 35(24):4519-4522, 1986.
7. BASSO, N. et alii Cimetidine and antacid prophylaxis of acute upper gastrointestinal bleeding in high risk patients. Controlled, randomized trial. Am. J. Surg. 141:339-341, 1981.
8. BERG, B. et alii Histamine formation from <sup>14</sup>C-L-histidine in man. Br. J. Pharmac. 46(2):270-280, 1972.
9. BERGMAYER, H. & GAWEHN, K. Methods of enzymatic analysis 2 ed. v. 1. New York, Verlag Chemie Weinheim Academic Press, 1974. 565 p.
10. BLANCHARD, M. et alii Croissance compensatrice du rein. Effets de trois antihistaminiques. C. R. Séanc. Soc. Biol. 180(4):411-415, 1986.
11. BONE III, S.; MICHALOPOULOS, G.; JIRTLE, R. Ability of partial hepatectomy to induce  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in regenerated and transplanted hepatocytes of Fischer 344 and Wistar-Furth Rats. Cancer Res. 45:1222-1228, 1985.
12. BRANDON, M. & WEINER, M. Clinical investigation of terfenadine, a non-sedating antihistamine. Ann. Allergy 44(2):71-75, 1980.
13. BRIMBLECOMBE, R. W. et alii Characterization and development of cimetidine as a histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonist. Gastroenterology 74:339-347, 1978.

14. BUDROE, J.; SHADDOCK, J.; CASCIANO, D. A study of the potential genotoxicity of methapyrilene and related antihistamines using the hepatocyte / DNA repair assay. Mutation Research 135(2):131-137, 1984.
15. BURTIN, C. et alii Inverse correlation between tumor incidence and tissue histamine levels in  $W/W^v$ ,  $W^v/+$ , and  $+/+$  mice. J. natn. Cancer. Inst. 74(3):671-674, 1985.
16. CAJONE, F.; GAJA, G.; SHERBET, G. Plasma membrane changes in hepatocytes from normal and regenerating rat liver. European journal of cell biology 38(1):174-177, 1985.
17. CASPERS, M. & DIGLIO, C. Expression of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in a transformed rat cerebral endothelial cell line. Biochim. biophys. Acta. 803(1/2):1-6, 1984.
18. CASTRO-E-SILVA JR., O. et alii Heparin-induced increase in plasma and serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity. Brazilian J. Med. Biol. Res. 22:1333-1335, 1989.
19. CASTRO-E-SILVA JR., O. et alii Serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in chronic extrahepatic cholestasis. Brazilian J. Med. Biol. Res. 23(6-7):515-518, 1990.
20. CHAMBON, Y.; MOLINOX, 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.
21. CHAMBON, Y.; PICARD, F.; LEFOULON-GOURVÈS, M. L'hyperplasie régénératrice du foie chez le rat est-elle stimulée par l'administration d'histamine? C. R. Séanc. Soc. Biol. 168:986-989, 1968.

22. CHAUDHURI, S. & LIEBERMAN, I. The surface of the liver cell after partial hepatectomy. Biochem. biophys. Res. Commun. 20(3):303-309, 1965.
23. CHENG, H. & WOODWARD, J. A kinetic study of the antihistaminic effect of terfenadine. Arzneim-Forsch. Drug Res. 32(9a):1160-1166 Suppl II, 1982.
24. CHENG, S.; NASSAR, K.; LEVY, D.  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase activity in normal, regenerating and malignant hepatocytes. Febs Letters 85(2):310-312, 1978.
25. CODE, C.F. Suppression of histamine leucocytosis by metiamide. J. Physiol. 254(1):31P-32P, 1976.
26. 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. 136 p.
27. DENEKAMP, J. Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. Br. J. Cancer 45(1):136-139, 1982.
28. DODD, N.J.F. & KUMAR, S. Effect of tumour angiogenesis factors on the membrane of capillary and aortic endothelial cells: an E.S.R. Spin-label study. J. Cell. Sci. 68:153-162, 1984.
29. DIXON, M.; WEBB, E.; THORNE, C.; TIFTON, K. Enzymes 3<sup>rd</sup> ed. New York, Academic Press, 1979 1116 p.
30. EHRLICH, P.: Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik In The Collected Papers of Paul Ehrlich, edited by

- Himmelweit F, p. 19 London, Pergamon Press, 1956. A-  
pud MARKS,R.M. et alii Mast cell granules cause pro-  
liferation of human microvascular endothelial cells.  
Lab. Invest. 55(3):289-294, 1986.
31. FAUSTO,N. & MEAD,J. Regulation of liver growth: pro-  
tooncogenes and transforming growth factors. Lab.  
Invest. 60(1):4-13, 1989.
32. FEELY,J. & WOOD,A. Effect on apparent liver blood flow  
of histamine-receptor blockers and inhibition of pros-  
taglandin synthesis. Clin. Pharmacol. Ther. 33(1):  
91-94, 1983.
33. FESUS,L. et alii Activation of transglutaminase and  
production on protein-bound  $\gamma$ -glutamylhistamine in  
stimulated mouse mast cells. J. biol. Chem.260(25):  
13771-13778, 1985.
34. FOLKMAN,J. What is the role of endothelial cells in an-  
giogenesis? Lab. Invest. 51(6)601-604, 1984.
35. FOLKMAN,J. & HAUDENSCHILD,C. Angiogenesis "in vitro".  
Nature 288(5791):551-556, 1980.
36. FOLKMAN,J. & KLAGSBRUN,M. Angiogenic factors. Science  
235(4787):442-447, 1987 a.
37. FOLKMAN,J. & KLAGSBRUN,M. A family of angiogenic pepti-  
des. Nature 329(6141):671-672, 1987 b.
38. FORTNER,J.G. et alii The seventies evolution in liver  
surgery for cancer. Cancer 47:2162-6, 1981.

39. FRANZÉN, L. & NORRBY, K. Local mitogenic effect of tissue mast cell secretion. Cell tissue kinet. 13(6): 635-642, 1980.
40. GALOPPIN, L. et alii Tissue histamine levels and mast cell numbers in tumour-bearing mice. Agents and actions 14(3/4):494-496, 1984.
41. GESFACH, C.; MARREC, N.; BALITRAND, N. Relationship between <sup>3</sup>H- histamine uptake and H<sub>2</sub>-receptor in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. Agents and actions 16:279-283, 1985.
42. GIBSON, J.; HUFFMANN, K.; NEWBERNE, J. Preclinical safety studies with terfenadine. Arzneim-Forsch/ Drug Res. 32(9a):1179-1184 Suppl II. 1982.
43. GJERDE, H. & MORLAND, J. Determination of gamma glutamyl transferase in completely haemolysed blood samples Scand. J. Clin. Lab. Invest. 45(7):661-664, 1985.
44. GOSS, R. The strategy of growth In: TEIR, H. & RITÖ-MAA, T. Control of cellular growth in adult organisms. London, Academic Press, 1967. p. 3-27.
45. GRANERUS, G. & WASS, U. Urinary excretion of histamine, methylhistamine (1-MeHi) and methylimidazoleacetic acid (MeImAA) in mastocytosis: comparison of new HFIC methods with other present methods. Agents and actions 14(3/4):341-345, 1984.
46. GRANERUS, G.; WEINFELD, A.; WESTIN, J. Histamine symptoms and histamine metabolism in chronic granulocytic leukaemia. Agents and actions 13(2/3):251-255, 1983.

47. GREEN, J. et alii Aspects of histamine metabolism. Agents and actions 22(1/2):1-15, 1987.
48. HAMILTON, G. et alii S-oxalylglutathione is a substrate for  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT). Implications for the role of GGT in cell proliferation. Biochem. biophys. Res. Commun. 150(2):828-834, 1988.
49. HESTERBERG, R. et alii 1. Distribution and metabolism of histamine. Histamine content, diamine oxidase activity and histamine methyltransferase activity in human tissues: fact or fictions? Agents and actions 14(3/4):325-334, 1984.
50. HIGGINS, G. & ANDERSON, R. Experimental pathology of the liver. I restoration of the liver of the white rat following partial surgiceanal removal. Archs. Path. 12:186-202, 1931.
51. HIROTA, N.; MORIYAMA, S.; YOKOYAMA, T. Induction of  $\gamma$ -Glutamyltransferase-Positive and nonspecific esterase-positive foci in rat liver by partial hepatectomy following single injection of N-Nitrosodiethylamine. J. natn. Cancer Inst. 69(6):1299-1304, 1982.
52. HUSZTI, Z. et alii Non-mast cell histamine levels in rat tissues after histidine loading. European journal of pharmacology 42(3):231-240, 1977.
53. ICHINOSE, M. et alii Histamine H<sub>3</sub>-receptors inhibit cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. Br. J. Pharmacol. 97(1):13-15, 1989.

54. IDEO, G.; MORGANTI, A.; DIOGUARDI, N.  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase: a clinical and experimental study. Digestion 5:326-336, 1972.
55. ISHIKAWA, S. & SPERELAKIS, N. A novel class ( $H_3$ ) of histamine receptors on perivascular nerve terminals. Nature 327(6118):158-160, 1987.
56. KAHLSON, G. & ROSENGREN, E. Prevention on foetal development by enzyme inhibition. Nature 184(4694): 1238-1239, 1959.
57. KAHLSON, G. & ROSENGREN, E. New approaches to the physiology of histamine. Physiological reviews 48(1):155-196, 1968.
58. KAHLSON, G.; ROSENGREN, E.; THUNBERG, R. Observations on the inhibition of histamine formation. J. Physiol. 169:467-486, 1963.
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, E. et alii Ranitidine as an inhibitor of liver regeneration. Am. J. Surg. 149:223-227, 1985.
61. KENYON, A.; RAMOS, L.; MICHAELS, E. Histamine-induced suppressor macrophage inhibits fibroblast growth and wound healing. Am. J. Vet. Res. 44(11):2164-2166, 1983.

62. KHANDELWAL, J.K. et alii Measurement of tele-methylhistamine and histamine in human cerebrospinal fluid, urine and plasma. Agents and actions 12(5):583-590, 1982.
63. KIERSKA, D.; SASIAK, K.; BIEGAŃSKI, T.; MAŚLIŃSKI, Cz. Causal relationship between a tumour growth and the changes in histamine metabolism in tissues of sarcoma-bearing rat. Agents and actions 20(3/4):314-316, 1987.
64. KIM, K. Anabolic agents and histamine metabolism. Nature 191 (4796):1368-1370, 1961.
65. KÖTTGEN, E. & LINDINGER, G. Nachweis molekularer Varianten der  $\gamma$ -Glutamyltransferase mit differenter conca-  
navalin-A- affinität. Hopp-Seyler's Z. physiol.Chem. 357(10):1439-1442, 1976.
66. KÖTTGEN, E.; REUTTER, W.; GEROK, W. Induction and 'Superinduction' of sialylation of membrane-bound  $\gamma$ -Glutamyltransferase during liver regeneration. Eur. J. Biochem. 82:279-284, 1978.
67. KOKKONEN, J. & KOVANEN, P. Low density lipoprotein degradation by rat mast cells. Demonstration of extracellular proteolysis caused by mast cell granules. J. biol. Chem. 260(27):14756-14763, 1985.
68. KOWALEWSKI, K.; RUSSEL, J.C.; KOHEIL, A. Blood and tissue histamine in mice, rats, hamsters and guinea pigs. Comparative study (34233). Proc. Soc. exp. Biol. Med. 132(2):443-446, 1969.

69. LAGUNOFF, D. & BENDITT, E.P. Proteolytic enzymes of mast cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 103:185-198, 1963.
70. LANGMAN, M. Histamine H<sub>2</sub> antagonists. Drugs of today 16(11):393-402, 1980.
71. LARREY, D.; PALAZZO, L.; BENHAMOU, J. Terfenadine and hepatitis. Ann. intern. Med. 103(4):634, 1985.
72. LAVORENTI, A. & GIANNOTTI, O. Resíduos de defensivos agrícolas em alimentos e segurança dos consumidores. Anais da IX ENAFB - 27 a 31 de maio de 1985.p.21-37.
73. LEE, S.D. 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.
74. LEESON, G. et alii Metabolic fate of terfenadine in rats. Fedn. Proc. 34(3):733, 1975.
75. LEESON, G. et alii Metabolic disposition of Terfenadine in laboratory animals. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 32(9a):1173-1178 Suppl. II, 1982.
76. LEVI-SCHAFFER, F. & KUPIETZKY, A. Mast cells enhance migration and proliferation of fibroblasts an "in vitro" wound, Expl. Cell Res. 188(1):42-49, 1990.
77. LORENZINI, I.; JEZEQUEL, A.; ORLANDI, F. Cimetidine induced hepatitis. Electron microscopic observations and clinical pattern of liver injury. Digestive diseases and sciences 26(3):275-280, 1981.

78. MACKAY, D.; REID, J.; SHEPHERD, D.M. Histidine decarboxylase and growth. Nature 191(4795):1311-1312, 1961.
79. MARCUS, R. & COULSTON, A. Vitaminas hidrossolúveis. Complexo vitamínico B e ácido ascórbico. In. GILMAN, A.; GOODMAN, L.; RALL, T.; MURAD, F. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 7 ed. R.J. Guanabara Koogan, 1987 cap. 66, p. 1016-1031.
80. MARKS, R.; DYKES, P.J.; TAN, C.Y. Histamine and epidermal proliferation. Br. J. Derm. 107(1):15-20, 1982.
81. MARKS, R.M. et alii Mast cell granules cause proliferation of human microvascular endothelial cells. Lab. Invest. 55(3):289-294, 1986.
82. MASLIŃSKI, Cz. et alii Histamine and its catabolism in tumour-bearing rat and mouse. Agents and actions 14(3/4):497-500, 1984.
83. MATSUZAKI, S.; SUZUKI, M.; HAMANA, K.; ITOH, K. Elevated levels of polyamines and histamine in adenocarcinomas of the thyroid. J. Clin. Endocr. Metab. 47(5):1038-1041, 1978.
84. MATTOS F<sup>o</sup>, T.R. Influência da hepatectomia parcial no tempo de sono pelo metohexital, em ratos. Tese-Mestrado em Farmacologia FOP-UNICAMP, Piracicaba. 1976, 56p.
85. MCKEEHAN, W. et alii Two apparent human endothelial cell growth factors from human hepatoma cells are tumor-associated proteinase inhibitors. J. Biol. Chem. 261(12):5378-5383, 1986.

86. MEISTER, A. On the enzymology of amino acid transport. Transport in kidney and probably other tissues is mediated by a cycle of enzymic reactions involving glutathione. Science 180:33-39, 1973.
87. MEISTER, A. & TATE, S. Glutathione and related  $\gamma$ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization. A. Rev. Biochem. 45:559-604, 1976.
88. MOTOKI, T.; OBARA, H.; EZOE, H.; SHIMAZU, H. Low serum histamine in malignant disease, New Engl. J. Med. 310 (6):391-392, 1984.
89. NICHOLSON, A. & STONE, B. Performance studies with the  $H_1$ -histamine receptor antagonists, astemizole and terfenadine. Br. J. Clin. Pharmac. 13:199-202, 1982.
90. NOLTE, H.; SKOV, P.; LOFT, H. 6. Pathophysiological role of histamine and clinical aspects - Stimulation of histamine synthesis from tumour cells by concanavalin A and A 23187. Agents and actions 20(3/4):291-294, 1987.
91. NORDLUND, J. & ASKENASE, P. The effect of histamine, antihistamines, and a mast cell stabilizer on the growth of cloudman melanoma cells in DBA / 2 mice. J. invest. Derm. 81(1):28-31, 1983.
92. NORRBY, K.; JAKOBSSON, A.; SÖRBO, J. 5. Histamine: metabolism and cell proliferation. On mast-cell-mediated angiogenesis in the rat mesenteric window assay. Agents and actions 30(1/2):231-233, 1990.

93. NOVOGRODSKY, A.; TATE, S.; MEISTER, A.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase, a lymphoid cell-surface marker: relationship to blastogenesis, differentiation, and neoplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(7):2414-2418, 1976.
94. OHNO, H. et alii Effect of physical training on immunoreactive.  $\gamma$ -Glutamyltransferase in human plasma. Enzyme 39:110-114, 1988.
95. OLIVEIRA LIMA, A. et alii Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação. 6<sup>o</sup> ed. R.J. Guanabara Koogan 1985. 699 p.
96. ÖMER, B. et alii Liver  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase activity following chronic treatment with acetylsalicylic acid in rats. Enzyme 42:185-188, 1989.
97. ORLOWSKI, M. & MEISTER, A.  $\gamma$ -Glutamyl-p-nitroanilide: A new convenient substrate for determination and study of L- and D-  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activities. Biochem. biophys. Acta. 73:679-681, 1963.
98. ÖRNING, L. & HAMMARSTRÖM, S. Kinetics of the conversion of leukotriene C by  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase. Biochem. biophys. Res. Commun. 106(4):1304-1309, 1982.
99. PADAWER, J. Mast cells and basophils. Ann. N. Y. Acad. Sci. 103:1-492, 1963.
100. PALEKAR, A.; TATE, S.; MEISTER, A. Decrease in glutathione levels of kidney and liver after injection of methionine sulfoximine into rats. Biochem. biophys. Res. Commun. 62(3):651-657, 1975.

101. FINKERTON, J.A. et alii A study of the postoperative course after hepatic lobectomy. Ann. surg. 173:800-11, 1971.
102. FLAYLE, A.C. Cimetidina. Drugs of today 13(5):183-191, 1977.
103. POLVERINI, P.J. & LEIBOVICH, S.J. Induction of neovascularization "in vivo" and endothelial proliferation "in vitro" by tumor-associated macrophages. Lab. Invest. 51(6):635-642, 1984.
104. PONVERT, C. et alii Tissue histamine levels in male and female mast cell deficient mice ( $W/W^V$ ) and in their littermates ( $W^V/+$ ,  $W/+$  and  $+/+$ ). Agents and actions 17(1):1-4, 1985.
105. REACTOCLIN. Técnica Kit GAMA GT. CELM Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, 1989.
106. RILEY, J. Functional significance of histamine and heparin in tissue mast cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 103:151-163, 1963.
107. RUSSEL, D. & SNYDER, S. Amine synthesis in rapidly growing tissues: Ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60:1420-1427, 1968.
108. RUSSEL, J. et alii Effects of rat strain, diet composition, and phenobarbital on hepatic  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase histochemistry and on the induction of altered hepatocyte foci and hepatic tumors by diethylni -

- trosamine. Cancer Res. 47(4):1130-1134, 1987.
109. RUTENBURG, A. et alii Histochemical and ultrastructural demonstration of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity. J. Histochem. Cytochem. 17(8):517-526, 1969.
110. SABESIN, S. & PRESTON, J. Efeitos hepáticos dos bloqueadores- $H_2$ . Experiência clínica atual Skopia 18(5):32-37, 1986.
111. SAKUMA, I.; GROSS, S.; LEVI, R. Positive inotropic effect of histamine on guinea pig left atrium:  $H_1$ -receptor -induced stimulation of phosphoinositide turnover. J. Pharmac. exp. Ther. 247(2):446-472, 1988.
112. SATOH, T. et alii Induction of hepatic  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase in rats by repeated administration of aminopyrine. J. Pharmac. exp. Ther. 221(3):795-800, 1982.
113. SCHEINMANN, P. et alii Histamine levels in mouse tissues: influence of castration. Agents and actions, 10:150-151, 1980.
114. SCHWARTZ, L.B. & AUSTEN, K.F. Acid hydrolases and other of rat and human mast cell secretory granules. In: BECKER, E.L. Biochemistry of the acute allergic reactions. Fourth International Symposium, Kroc Foundation Series 24 New York, Alan Liss 1981.p. 103-108.

115. SEKAS,G. & COOK,R. The evaluation of liver function after partial hepatectomy in the rat: serum changes. Br. J. Exp. Path. 60(5):447-452, 1979.
116. SELINGER,M.; MATLOFF,D.; KAPLAN,M.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: serum elevation is independent of hepatic GGTP activity. Clinica Chimica Acta 125(3):283-290, 1982.
117. SELVARAJ,F. & BALASUBRAMANIAN,K. Comparative structural and lectin-binding studies on  $\gamma$ -glutamyltransferase from human adult liver, fetal liver and primary hepatoma. Europ. J. biochem. 153(3):485-490,1985
118. SESSA,A.; DESIDERIO,M.; PERIN,A. Diamine oxidase activity induction in regenerating rat liver. Biochem. biophys. Acta. 698(1):11-14, 1982.
119. SHAW,L.M. et alii International Federation of Clinical Chemistry IFCC methods for measurement of enzymes. Part. 4. IFCC method for  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -glutamyl)-peptide: amino acid  $\gamma$ -glutamyltransferase E C 2.3.2.2 Clinica chimica acta 135(3):315F-338F, 1983
120. SHEPHERD,D.M. & WOODCOCK,B.G. Histamine formation in normal, regenerating and malignant liver tissue of the rat. Biochem. pharmac. 17:23-30, 1968.
121. SHOLLEY,M. et alii Mechanisms of neovascularization. Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. Lab. Invest. 51(6):624-634,1984.

122. SOLT,D.; CALDERON-SOLT,L.; ODAJIMA,T. Rapid induction of carcinomas and  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase-rich clones in N-methyl-N- benzylnitrosamine-treated hamster buccal pouch. J. natn. Cancer Inst. 74(2):437-445, 1985.
123. SPANO,J.S. et alii Serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in healthy cats and cats with induced hepatic disease. Am. J. Res. 44(11):2049-2053, 1983.
124. SPLAWINSKI,J. Tumor-induced angiogenesis: a rapidly maturing idea. Drugs of today 24(11):821-835, 1988.
125. SULAKHE,S. The activity of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in regenerating rat liver. Febs Letters 204(2):302-306 1986.
126. SULAKHE,S. & LAUTT,W. The activity of hepatic  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in various animal species. Comp. biochem. physiol. 82B(2):263-264, 1985.
127. SULAKHE,S. & LAUTT,W. A characterization of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in normal, perinatal, premalignant and malignant rat liver. Int. J. Biochem. 19(1):23-32, 1987.
128. SZASZ,G.  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase. In: BERGMAYER,H. & GAWEHN,K. Methods of enzymatic analysis 2<sup>o</sup> ed,v.2 New York, Verlag Chemie Weinheim-Academic Press, 1974 p. 715-720.

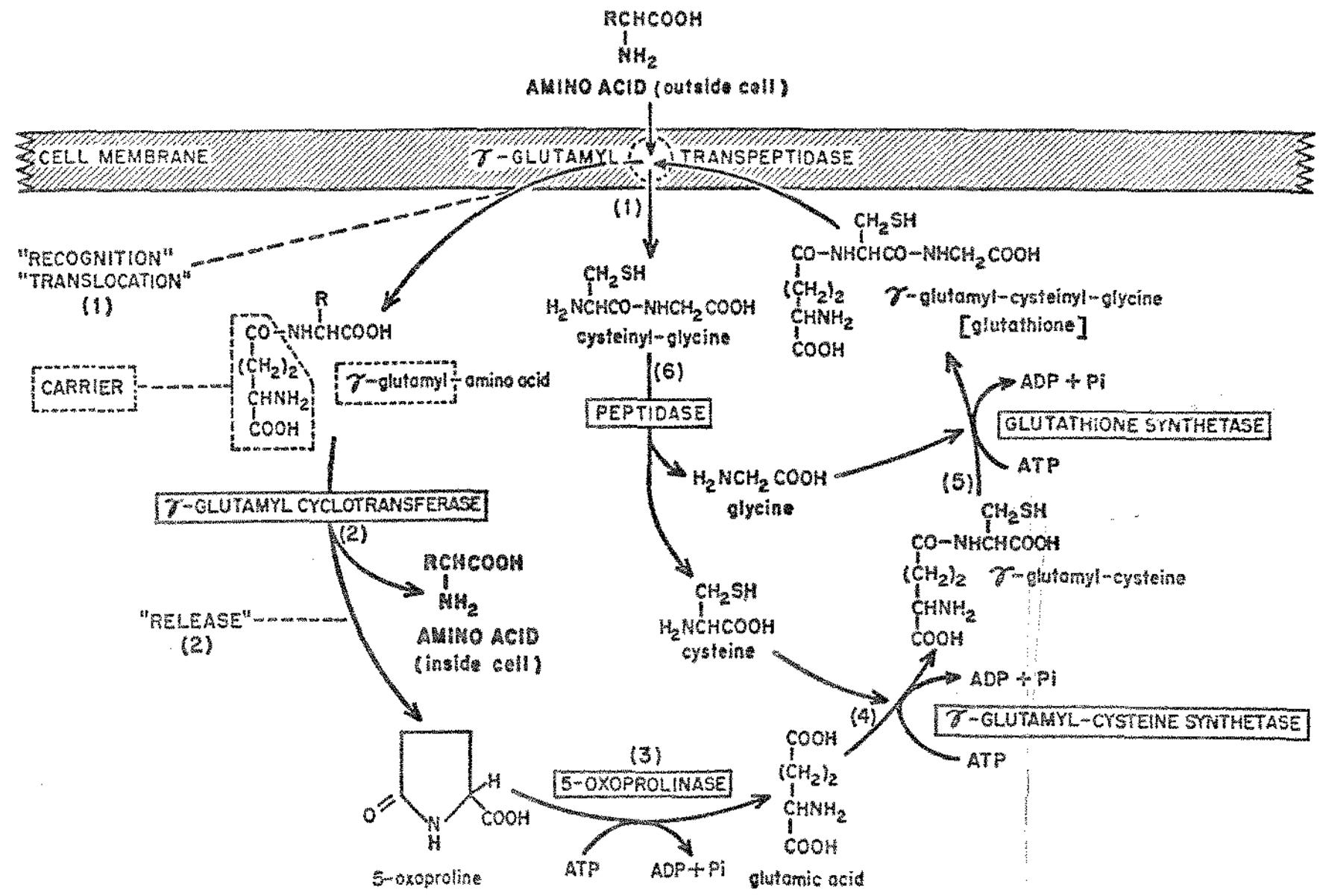
129. TAGUCHI, Y. et alii Purification of histidine decarboxylase from the liver of fetal rats and its Immunochemical and Immunohistochemical characterization. J. biol. Chem. 259(8):5214-5221, 1984.
130. TASAKA, K. & CODE, C. Histamine leukocytosis. Fedn. Proc. 23(2 pt 1):471, 1964.
131. TASAKA, K. & 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.
132. TATE, S. & MEISTER, A. Subunit structure and isozymic forms of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Proc. natl. acad. sci. USA 73(8):2599-2603, 1976.
133. TAYLOR, D.; YOFFE, J.; WOOLLEY, D. Histamine  $H_2$  receptors on foetal-bovine articular chondrocytes. Biochem. J. 212(2):517-520, 1983.
134. THORNALLEY, P. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. Biochem. J. 269(1):1-11, 1990.
135. TILLY, B. et alii Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through  $Ca^{2+}$ -mobilizing  $H_1$  receptors. J. Cell biol. 110(4):1211-1215, 1990.

136. TRUMMEL, C. Histamina e antagonistas da histamina. In: NEIDLE, E.; KROEGER, D.; YAGIELA, J. Farmacologia e terapêutica para dentistas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1983. cap. 23 p. 327-340.
137. VIEIRAS, S. Introdução à Bioestatística 3 ed. Rio de Janeiro, Campus, 1985. 294 p.
138. WADJA, J.; GINSBURG, M.; WAELSCH, H. Incorporation of histamine into liver protein in vivo. Nature 191 (4794):1204-1205, 1961.
139. WEINREICH, D. Neurobiology of a histaminergic neuron in the CNS of the mollusk *Aplysia californica* in: GANELLIN, C. & SCHWARTZ, J. Frontiers in histamine research. Advances in the Biosciences 51:205-214, 1985.
140. WENHAM, P.; HORN, D.; SMITH, A. In vitro studies upon the release of  $\gamma$ -glutamyltransferase from human liver. Clinica chimica acta. 160(3):223-233, 1986.
141. WHITFIELD, J. et alii Serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. GUT 13:702-708, 1972.
142. WOODWARD, J. & MUNRO, N. Terfenadine, the first non-sedating antihistamine. Arzneim-Forsch. / Drug.Res. 32(9a):1154-1156 Suppl II, 1982.
143. YAMADA, S.; WILSON, J.; LIEBER, C. The effects of ethanol and diet on hepatic and serum  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase activities in rats. J. Nutr. 115(10): 1285-1290, 1985.

144. YAMATODANI, A. et alii Tissue distribution of histamine in a mutant mouse deficient in mast cells - clear evidence for the presence of non-mast-cell histamine. Biochem. Pharmac. 31(3):305-309, 1982.

11 - APENDICE

Ciclo  $\gamma$ -glutamyl  
(MEISTER, 1973)



APPENDICE 1

# RAÇÃO PROBIOTÉRIO (G)

# 49

Registro Registrado na DIFISA sob n.º 700

**MODO DE USAR:**

Formar, a livre escolha, a canturdingos, ovinos, caprinos, etc.

Este produto foi formulado especialmente para o atendimento das necessidades nutricionais dos principais animais de laboratório para crescimento, manutenção, gestação e lactação.

Visto não interferir nos experimentos conduzidos pelos pesquisadores com o emprego de animais de laboratório, este produto não contém suplementação sintética e ou microbiana. O único aditivo participante é a estrocinona em dosagem suficiente para a prevenção de oxidação das vitaminas adicionadas.

Água de boa qualidade deverá estar disponível constantemente.

**NÍVEIS DE GARANTIA:**

Umidade	Máximo	12,00 %
Proteína Bruta	Mínimo	23,00 %
Extrato Etéreo	Máximo	3,50 %
Materia Fibrosa	Máximo	10,00 %
Materia Mineral	Máximo	7,50 %
Calcio	Máximo	1,40 %
Fósforo	Mínimo	0,70 %

**COMPOSIÇÃO BÁSICA:** Milho, Lecitina de Soja, Farinha de Soja, Concentrado Proteico de Milho, Farinha de Carne, Farinha de Peixe, Farinha de Trigo, Farinha de Aroz Solvente, Favela Proteico de Milho, Carbonato de Cálcio, Fosfato Gálico, Farinha de Ovos, Catechu e Sal.

**ENRIQUECIMENTO POR KG DE PRODUTO:**

Vitamina A	1.200.000 U.I.
Vitamina D3	300.000 U.I.
Vitamina E	18.000 U.I.
Vitamina K	1.40 mg
Vitamina B2	4.50 mg
Ácido Nicotínico	30.000 mg
Ácido Pantotênico	5.500 mg
Ferro	19.000 mg
Cobalto	0,10 mg
Cobre	5,00 mg
Manganês	40,00 mg
Zinco	80,00 mg
Iodo	0,75 mg

## ANÊNDICE 3

Fatores de correção de temperatura.

Temperatura °C	Fator
20	1.32
21	1.25
22	1.17
23	1.11
24	1.05
25	1.00
26	0.95
27	0.90
28	0.85
29	0.80
30	0.75
31	0.70
32	0.66
33	0.62
34	0.58
35	0.54
36	0.51
37	0.48

( REACTOCLIN 1989 )

## APÊNDICE 4

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo controle 6 hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l <sup>*</sup>
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
32	57C <sub>1</sub>	0.465 34.5	0.470 34.0	0.470 34.0	0.475 33.5	4,57
32	62C <sub>1</sub>	0.630 23.5	0.620 24.0	0.630 23.5	0.640 23.0	4.57
32	67C <sub>1</sub>	0.670 21.5	0.680 21.0	0.680 21.0	0.680 21.0	4.57
32	72C <sub>1</sub>	0.420 38.0	0.420 38.0	0.430 37.5	0.430 37.0	4.57
30	77C <sub>1</sub>	0.560 27.5	0.560 27.5	0.570 27.0	0.570 27.0	5.19
30	82C <sub>1</sub>	0.395 40.0	0.405 39.5	0.410 39.0	0.420 38.0	12.98
33	87C <sub>1</sub>	0.345 45.0	0.350 44.5	0.355 44.5	0.355 44.5	4.29

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmittância

## APÊNDICE 5

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Terfenadina 6 hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
31	63A <sub>1</sub>	0.820 15.0	0.840 14.5	0.840 14.5	0.840 <sup>A</sup> <sub>T</sub> <sup>***</sup> <sup>**</sup> 14.5	9.69
32	68A <sub>1</sub>	0.540 29.0	0.540 29.0	0.540 29.0	0.545 28.5	2.28
33	73A <sub>1</sub>	0.515 30.5	0.515 30.5	0.520 30.0	0.520 30.0	2.14
32	78A <sub>1</sub>	0.550 28.5	0.570 27.0	0.580 26.5	0.580 26.5	13.70
32	83A <sub>1</sub>	0.465 34.0	0.470 34.0	0.475 33.5	0.480 33.0	6.85
33	88A <sub>1</sub>	0.310 49.0	0.305 49.5	0.310 49.0	0.320 48.0	4.29

\*  $U/l = 2077 \times \Delta_A / \text{min} \times \text{Fator de correção de temperatura}$

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmittância

## APÊNDICE 6

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Cimetidina 6 hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
32	59B <sub>1</sub>	0.455 35.0	0.460 34.5	0.460 34.5	0.470 <sup>A</sup> 34.0 <sup>T</sup>	6.85
32	64B <sub>1</sub>	0.595 25.5	0.595 25.5	0.600 25.0	0.600 25.0	2.28
32	69B <sub>1</sub>	0.390 40.5	0.400 40.0	0.400 39.5	0.400 40.0	4.57
33	74B <sub>1</sub>	0.395 40.5	0.400 40.0	0.410 39.0	0.405 39.5	4.29
32	79B <sub>1</sub>	0.510 31.0	0.510 31.0	0.520 30.5	0.520 30.5	4.57
32	84B <sub>1</sub>	0.510 31.0	0.520 30.5	0.530 30.0	0.530 29.5	9.14
31	89B <sub>1</sub>	0.425 37.5	0.430 37.0	0.430 37.0	0.435 36.5	4.85

\* U/l = 2077 x  $\Delta A/\text{min}$  x Fator de correção de temperatura

<sup>xx</sup>A = Absorbância

<sup>xxx</sup>T = Transmittância

## APÊNDICE 7

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Terfenadina + Cimetidina 6 hs após hepatectomia  
parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
32	60AB <sub>1</sub>	0.470 34.0	0.475 33.5	0.485 33.0	0.490 <sup>A</sup> 32.5 <sup>T</sup>	9.14
31	65AB <sub>1</sub>	0.480 33.0	0.495 32.0	0.500 32.0	0.500 32.0	9.69
32	70AB <sub>1</sub>	0.420 38.0	0.430 37.5	0.425 37.5	0.425 37.5	2.28
33	75AB <sub>1</sub>	0.560 27.5	0.560 28.0	0.570 27.0	0.570 27.0	4.29
30	80AB <sub>1</sub>	0.650 22.5	0.660 21.5	0.680 21.0	0.670 21.0	10.38
32	85AB <sub>1</sub>	0.560 27.5	0.550 28.0	0.570 27.0	0.570 27.0	4.57
33	90AB <sub>1</sub>	0.425 37.5	0.425 37.5	0.430 37.0	0.430 37.0	2.15

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmitância

## APÊNDICE 8

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Controle 24hs após hepatectomia parcial

Temperatura Animal °C		Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
28	50 <sub>2</sub>	0.385	0.385	0.390	0.390	A**
		41.0	41.0	40.5	40.5	T***
28	100 <sub>2</sub>	0.490	0.490	0.485	0.500	5.88
		32.5	32.5	33.0	31.5	
29	150 <sub>2</sub>	0.455	0.455	0.460	0.470	8.30
		35.0	35.0	34.5	34.0	
30	190 <sub>2</sub>	0.410	0.420	0.420	0.430	10.38
		38.5	38.0	38.0	37.0	
28	240 <sub>2</sub>	0.360	0.360	0.365	0.370	5.88
		44.0	43.5	43.1	43.0	
29	290 <sub>2</sub>	0.415	0.420	0.425	0.430	8.30
		38.5	38.0	37.5	37.0	

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmitância

## APÊNDICE 9

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Terfenadina 24hs apos hepatectomia parcial

temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
28	6A <sub>2</sub>	0.675	0.670	0.660	0.680	A**
		21.0	21.5	22.0	21.0	T*** 2.94
28	11A <sub>2</sub>	0.650	0.650	0.660	0.660	
		22.5	22.5	22.0	22.0	5.88
29	20A <sub>2</sub>	0.500	0.510	0.515	0.510	
		31.5	31.0	30.5	31.0	5.54
28	25A <sub>2</sub>	0.625	0.630	0.630	0.630	
		23.7	23.5	23.5	23.5	2.94

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmitância

## AFÊNDICE 10

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Cimetidina 24hs após hepatectomia parcial

Temperatura do Animal	Tempo					U/l*
		$\Lambda_0$	$\Lambda_1$	$\Lambda_2$	$\Lambda_3$	
28	2B <sub>2</sub>	0.440	0.450	0.455	0.450	$\Lambda^{**}$
		36.0	36.0	35.1	35.5	$T^{***}$ 5.88
29	7B <sub>2</sub>	0.610	0.620	0.620	0.620	5.54
		24.5	24.0	24.0	24.0	
28	17B <sub>2</sub>	0.550	0.560	0.570	0.560	5.85
		28.0	27.8	27.0	27.5	
28	26B <sub>2</sub>	0.365	0.370	0.370	0.375	5.88
		43.0	42.5	42.5	42.0	
29	31B <sub>2</sub>	0.435	0.440	0.445	0.440	2.77
		37.0	36.5	36.0	36.5	

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\*  $\Lambda$  = Absorbância

\*\*\* T = Temperatura

## APÊNDICE 11

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo Terfenadina + Cimetidina 24hs após hepatectomia parcial

Temperatura Animal		Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
29	3AB <sub>2</sub>	0.440	0.445	0.445	0.445	A**
		36.5	36.0	36.0	36.0	T***
29	13AB <sub>2</sub>	0.515	0.520	0.520	0.520	2.77
		30.5	30.0	30.0	30.0	
30	18AB <sub>2</sub>	0.440	0.440	0.440	0.450	5.19
		36.5	36.5	36.0	35.0	
28	22AB <sub>2</sub>	0.890	0.870	0.900	0.900	5.88
		13.0	13.5	13.0	13.0	
29	27A <sup>B</sup> <sub>2</sub>	0.425	0.425	0.430	0.430	2.77
		37.5	37.5	37.0	37.0	
30	32AB <sub>2</sub>	0.395	0.400	0.400	0.405	5.88
		40.5	40.0	40.0	39.5	

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmitância

## APÊNDICE 12

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Controle 360hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
30	39C <sub>3</sub>	0.400	0.410	0.400	0.410	A**
		40.0	39.0	40.0	39.0	T*** 5.19
28	42C <sub>3</sub>	0.760	0.750	0.760	0.770	5.88
		17.5	17.5	17.5	17.5	
28	50C <sub>3</sub>	0.540	0.540	0.550	0.550	5.88
		29.0	29.0	28.5	28.5	
28	54C <sub>3</sub>	0.750	0.760	0.760	0.770	11.76
		18.0	17.5	17.5	17.0	

\* U/l = 2077 x  $\frac{\Delta}{A}$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmittância

## APÊNDICE 13

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Terfenadina 360hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo					
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>		
28	34A <sub>3</sub>	0.375	0.385	0.395	0.400	A**	14.71
		42.0	41.1	40.5	39.9	T***	
33	43A <sub>3</sub>	0.385	0.405	0.400	0.400		6.44
		41.0	39.5	39.5	40.0		
38	47A <sub>3</sub>	0.750	0.775	0.780	0.775		13.85
		17.5	17.0	16.7	17.0		
42	51A <sub>3</sub>	0.650	0.660	0.670	0.680		17.65
		22.5	22.0	21.5	21.0		

\* U/l = 2977 x  $\Delta$ <sub>A</sub>/min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmittância

níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo  
Cimetidina 360hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	
28	36B <sub>3</sub>	0.390	0.390	0.400	0.400	A**
		40.5	40.5	40.0	40.0	T***
33	40B <sub>3</sub>	0.380	0.390	0.395	0.400	8.58
		42.0	40.5	40.0	40.0	
29	44B <sub>3</sub>	0.480	0.485	0.490	0.490	5.54
		33.0	32.8	32.5	32.5	
29	48B <sub>3</sub>	0.600	0.610	0.610	0.620	11.07
		25.0	24.5	24.5	24.0	
28	52B <sub>3</sub>	0.510	0.520	0.520	0.520	5.88
		31.0	30.0	30.0	30.0	
30	56B <sub>3</sub>	0.475	0.475	0.480	0.480	2.60
		33.5	33.5	33.0	33.0	

\* U/l = 2077 x  $\Delta_A$ /min x Fator de correção de temperatura

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmittância

Níveis de  $\gamma$ -GT (U/l) no soro de ratos do grupo Terfenadina + Cimetidina 360hs após hepatectomia parcial

Temperatura °C	Animal	Tempo				U/l*
		A <sub>0</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> <sup>a</sup>	A <sub>3</sub>	
30	35AB <sub>3</sub>	0.660	0.680	0.680	0.690 A**	15.58
		22.0	21.0	21.0	20.5 T***	
29	37AB <sub>3</sub>	0.645	0.660	0.660	0.670	13.85
		22.5	22.0	22.0	21.5	
30	41AB <sub>3</sub>	0.520	0.530	0.540	0.540	10.38
		30.0	29.5	29.0	29.0	
28	45AB <sub>3</sub>	0.900	0.920	0.920	0.925	14.71
		12.5	12.0	12.2	12.0	
30	53AB <sub>3</sub>	0.590	0.610	0.660	0.620	15.58
		25.5	24.5	25.0	24.0	

\*  $U/l = 0.077 \times \Delta A / \text{min} \times \text{Fator de correção de temperatura}$

\*\* A = Absorbância

\*\*\* T = Transmitância