

## AÇÃO HEPATOPROTETORA DO VERAPAMIL EM RATOS INDUZIDOS COM VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

**Alcione da Silva Barros<sup>1</sup>, Erika F. Ferrari<sup>1</sup>, Gustavo N. Teixeira<sup>1</sup>, Roberta S. Carreiro da Costa<sup>1</sup>, Natália M. Ribeiro<sup>2,3</sup>, Rodrigo A. L. Osório<sup>1</sup>, José Carlos Cogo<sup>1</sup>, Stella R. Zamuner<sup>1</sup>, Wellington Ribeiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, <sup>2</sup> Laboratório de Síntese Orgânica, <sup>3</sup> Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos/SP  
[alcionebarros\\_silva@yahoo.com.br](mailto:alcionebarros_silva@yahoo.com.br), [gton@univap.br](mailto:gton@univap.br)

**Resumo-** Os acidentes ofídicos peçonhentos no país constituem um problema de saúde pública principalmente pelas seqüelas deixadas nas vítimas. Este trabalho teve como objetivo verificar a ação hepatoprotetora do bloqueador de canais de cálcio, verapamil, frente ao veneno de cascavel (*Crotalus durissus terrificus* – Cdt). Foram utilizados ratos machos Wistar divididos em 4 grupos experimentais: controle; verapamil; veneno e verapamil + veneno. Após 12 horas, os animais foram anestesiados e eutanasiados, em seguida foram retiradas de amostras do fígado, para análise histológica. No grupo verapamil verificou-se a presença de infiltrado inflamatório, perda do conteúdo citoplasmático e aumento irregular dos hepatócitos. No grupo o veneno de Cdt foram observados perda do conteúdo citoplasmático, presença de células binucleadas e congestão dos capilares sinusoides. Os bloqueadores de canais de cálcio têm sido amplamente empregados na proteção do hepatócitos contra agentes xenobióticos hepatotóxicos porém ao compararmos o grupo verapamil + veneno *versus* grupo controle podemos verificar que o verapamil, na dose utilizada, não foi hepatoprotetor.

**Palavras-chave:** acidentes ofídicos, *Crotalus durissus terrificus*, cascavel, hepatotoxicidade, verapamil  
**Área do Conhecimento:** Ciências da Saúde

### Introdução

Os acidentes ofídicos são muito mais comuns do que aparentam e ocorrem em muitas regiões do globo terrestre. As estatísticas sobre acidentes ofídicos peçonhentos registrados no país têm causado grande preocupação no setor médico-científico, constituindo um problema real de saúde pública, dada a sua ocorrência, incidência no território nacional, gravidade dos acidentes e, principalmente, as seqüelas deixadas nas vítimas (BARRAVIEIRA *et al.*, 1995).

Contudo, ainda há a necessidade de mais divulgação das políticas de prevenção que retratam essa grave ocorrência. A inter-relação dos acidentes ofídicos com dados clínicos obtidos a partir dos prontuários médicos, bem como a gravidade da lesão de órgãos, como fígado e pulmões, ainda não foram estudados detalhadamente.

As serpentes peçonhentas no Brasil pertencem a duas famílias, *Elapidae* e *Viperidae* (subfamília *Crotalinae*). O único gênero representante da família *Elapidae*, no Brasil é a *Micrurus*, conhecida popularmente por coral verdadeira. Os representantes da superfamília *Crotalinae* pertencem aos gêneros *Crotalus* (cascavel), *Bothrops* (jararaca) e *Lachesis* (Surucucu)

(GRANTSAU, 1991; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

O gênero *Crotalus* correspondem às cascavéis, que distribuem-se exclusivamente por todo continente Americano. Na América do Sul a espécie predominante é a *Crotalus durissus*. No Brasil são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e raramente na faixa litorânea, não ocorre também nas florestas subtropicais e pantanal (BARRAVIEIRA, 1999; PUERTO, 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Pires (2004) observou que no período de 1999 a 2003 foram notificados 140 acidentes no Hospital Municipal de São José dos Campos, SP. Destes 56% foram considerados leves e 27% moderados, sendo que a maior parte dos acidentados, 76% ocorreram em zonas rurais e 22% em zonas urbanas. 59% dos casos registrados foram atribuídos às serpentes do gênero *Bothrops*, 17 ao gênero *Crotalus*, 8% por serpentes não-peçonhentas e 3% ao gênero *Micrurus*.

Em 1990 foi proposto pela primeira vez um estudo clínico sobre alterações hepáticas pelo pesquisador Benedito Barravieira (1990, 1999) onde demonstrou a presença de extensas necroses em exame anatomopatológicos no fígado de pacientes que vieram a falecer.

Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento do bloqueador de canais de cálcio – verapamil, e outros bloqueadores nas lesões hepáticas experimentais induzidas por agentes como calor e hipóxia ou por drogas hepatotóxicas nas quais tem sido relatado efeito hepatoprotetor em algumas condições (MATSUDA, 1991; DIMOVA *et al.*, 1995).

Este trabalho teve como objetivo verificar a ação hepatoprotetora de uma única dose de bloqueador de canais de cálcio, verapamil, frente ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt).

### Metodologia

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D II) da Universidade do Vale do Paraíba (Univap), São José dos Campos, São Paulo, após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Univap sob protocolo nº A035/CEP/2006.

O veneno de Cdt, cascavel da região do Vale do Paraíba foi fornecido pelo Serpentário da Univap sendo extraído, liofilizado e mantido a 4°C.

Foram utilizados ratos machos Wistar com peso entre 180-200 g, fornecidos pelo biotério da Anilab – Campinas, SP. Os animais foram mantidos acondicionados em gaiolas em ambiente higienizado, com controle de temperatura e luminosidade, ciclo de claro-escuro de doze horas, e acesso à água e ração *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=6/grupo): controle (administrados salina i.p.); verapamil (administrado dose única – aguda, de 25 mg/kg de cloridrato de verapamil i.p.); veneno (injeção de 200µg/kg de veneno de Cdt i.m. no músculo tibial anterior) e verapamil + veneno (administração de cloridrato de verapamil 25 mg/kg i.p. uma hora antes da injeção de veneno de Cdt 200µg/kg i.m.).

Após o período de 12 horas, os animais foram analgesiados com 5 mg/Kg de Cloridrato de Xilazina 2% e anestesiados com 75 mg/Kg de Cloridrato de Ketamina por via intraperitoneal (i.p.) e posteriormente eutanasiados com overdose de anestésicos. Após a eutanásia, foi realizada uma incisão no abdome para a retirada de amostras do fígado.

As amostras de fígado foram imediatamente lavadas em solução salina 0,9% e fixadas em formol 4% por um período que variou de 24 horas a 48 horas. Em seguida foram processados para técnica de rotina histológica. As lâminas foram montadas, coradas em hematoxilina e eosina (H.E.), analisadas e fotografadas em microscópio ótico (Nikon Eclipse E200) sistema Cool Pix 5400.

Para todos os dados obtidos foram realizados cálculos de média e erro padrão da média. As diferenças entre grupos controle e tratados foram

analisadas pelo teste de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey-Kramer para comparação múltipla e foram considerados valores significativos para  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ .

### Resultados

Na figura 1 temos uma visão geral do órgão, onde se observa tecido hepático normal, composto por hepatócitos, capilares sinusóides e células de kupffer.

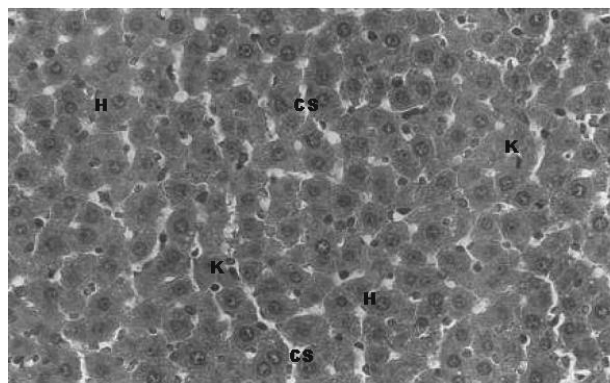


Figura 1: Fotomicrografia de tecido hepático de rato wistar grupo controle. (H) hepatócitos; (CS) sinusóides; (K) células de kupffer. (H.E. 400X).

Na figura 2 foi observado degeneração celular e alteração celular nos hepatócitos, tratando-se possivelmente de uma esteatose.

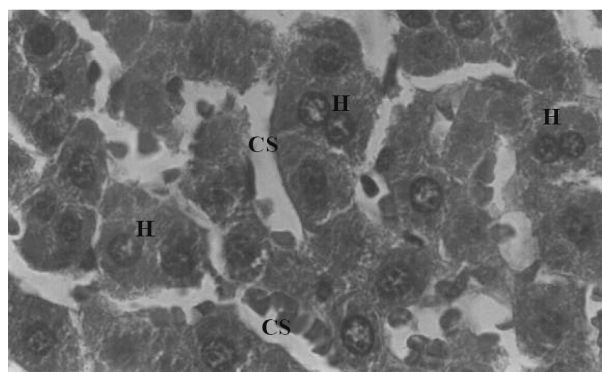


Figura 2: Fotomicrografia de tecido hepático de rato wistar grupo verapamil. (H) hepatócitos; (CS) capilares sinusóides (H.E. 400X).

Na figura 3 pode-se observar capilares sinusóides congestionados e também atividade inflamatória caracterizada pelo infiltrado de células inflamatórias que se encontravam formando uma ligação entre dois espaços porta-hepáticos.

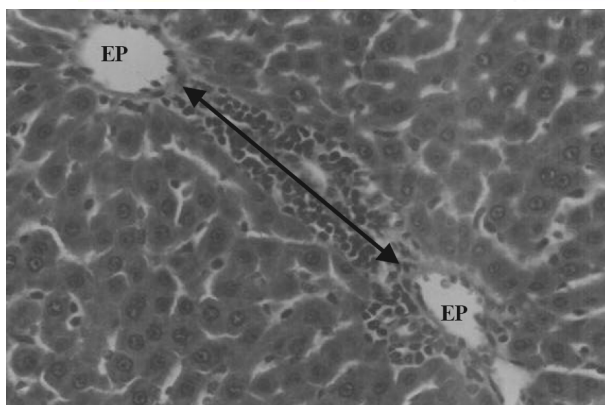


Figura 2: Fotomicrografia de tecido hepático de rato wistar grupo veneno de *Crotalus durissus terrificus* na dose de 200 µg/Kg i.m. Presença de capilares sinusóides dilatados, processo inflamatório evidenciado pelo infiltrado inflamatório (↔) presentes no espaço porta (EP) (H.E. 400X).

Na figura 4 podem-se observar poucas alterações no parênquima hepático e nos capilares sinusóides, os hepatócitos apresentaram pequenas alterações celulares, atividade inflamatória no espaço porta-hepático caracterizada por infiltrado de células inflamatórias dentro e ao redor do endotélio dos vasos.

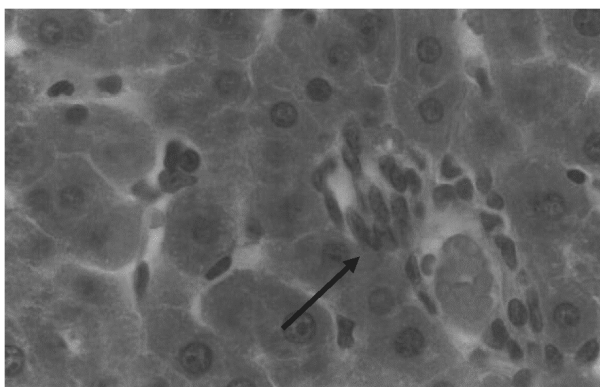


Figura 4: Fotomicrografia de tecido hepático de rato wistar após a administração prévia de verpamil 25 mg/kg i.p. e administração de veneno de *Crotalus durissus terrificus* na dose de 200 µg/Kg i.m. Presença de células inflamatórias no espaço porta (→) (H.E. 400X).

### Discussão

No estudo histomorfológico do fígado do grupo controle não foram observadas alterações do tecido hepático, que se manteve íntegro e estruturalmente bem caracterizado demonstrando volume citoplasmático, tamanho do núcleo e coloração uniformes e presença de células de Kupffer.

A maioria das lesões hepáticas produzidas por drogas ou traumatismos são cálcio dependentes e envolvem a interação com o citocromo P-450

promovendo formação de metabólitos e radicais livres que podem ser altamente reativos e tóxicos para as células, promovendo peroxidação lipídica, densintegração do citoesqueleto, alteração da morfofuncionalidade mitocondrial e modificação do cálcio intracelular (RECKNAGEL *et al.*, 1989; KAPLAN, 1993).

No grupo administrado a dose de verapamil (25 mg/kg) considerada hepatoprotetora durante a realização dos experimentos verificou-se a presença de infiltrado inflamatório, perda do conteúdo citoplasmático e aumento irregular dos hepatócitos. Segundo Geoffrey (2002), alguns autores constataram que alguns bloqueadores de cálcio, como o diltiazem, verapamil e nifedipina possam causar esteatose hepática não alcoólica.

Diante do acidente ofídico o atendimento médico é fator fundamental no prognóstico dos doentes. Os atendimentos realizados após 6 horas do acidente geral costumam apresentar os piores prognósticos. Como alterações histológicas específicas temos: necrose tecidual, esteatose não alcoólica e presença de células inflamatórias (BARRAVIEIRA 1999; ARAÚJO, 2000).

Na histomorfologia do fígado dos animais inoculados com o veneno de Cdt foram observados perda do conteúdo citoplasmático, presença de células binucleadas e congestão dos capilares sinusóides, confirmado pelo extravasamento sanguíneo, possivelmente relacionado com edema resultante da ação do veneno crotálico (ZÖLLNER *et al.*, 2000).

Os bloqueadores de canais de cálcio têm sido amplamente empregados na proteção do hepatócitos contra agentes xenobióticos hepatotóxicos ( FARGHALI *et al.*, 2000), porém ao compararmos o grupo verapamil + veneno *versus* grupo controle podemos verificar que o verapamil, na dose utilizada, não foi hepatoprotetor.

### Conclusão

De acordo com os resultados deste trabalho podemos concluir que:

- 1) a dose empregada de verapamil não exerceu ação hepatoprotetora em relação à peçonha crotálica estudada;
- 2) Nos estudos histomorfológicos observou-se que o verapamil causou alterações hepáticas e deflagrou processos inflamatórios.

### Referências

- ARAÚJO, M. Ofidismo. In: PITTA, G.B.B.; CASTRO, A.A.; BURIHAN, E. **Angiologia e cirurgia vascular – guia ilustrado**. Maceó: UNICISAL/ECMAL, 2000.



- BARRAVIEIRA, B. Acidentes por serpentes do Gênero *Crotalus*. **Arq. Bras. Med.**, v. 64, n. 1, p. 14-20, 1990.
- BARRAVIEIRA, B. *et al.* Liver dysfunction in patients bitten by *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) snakes in Botucatu (state of São Paulo, Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 17, n. 1, p. 63-69, 1995.
- BARRAVIEIRA, B. **Venenos – Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. Rio de Janeiro: EPUB. 1999. 411p.
- DIMOVA, S. *et al.* Effect of nifedipine, diltiazem and trifluoperazine on acetaminophen toxicity in mice. **Arch. Toxicol.**, n. 70, p. 112-118, 1995.
- FARGHALI H., *et al.* Evaluation of calcium channel blockers as potential hepatoprotective agents in oxidative stress injury of perfused hepatocytes. **Physiol Res.**, v. 49, n. 2, p. 261-268, 2000.
- GEOFFREY, F. Drugs and steatohepatitis. **Semin. Liver. Dis.**, v. 22, p. 185-94, 2002.
- GRANTSAU, R. **As cobras venenosas do Brasil**. Editora Bandeirante. 1991.101p.
- KAPLAN, M.M. **Laboratory Test – Diseases of the liver**. 7 ed. Philadelphia: Lippincott. 1993.
- MATSUDA, S. Protective effects of calcium antagonists (nitredipine) on calcium ionophore A 23187-induced liver cell injury. **Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.**, n. 38, p. 35-44, 1991.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Fundação Nacional da saúde. 2001. 131p.
- PIRES, L.S. **Estudo epidemiológico de acidentes ofídicos na cidade de São José dos Campos (SP) e municípios adjacentes**. 2004.73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisas e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2004.
- PUORTO, G. Serpentes brasileiras de importância médica. In: SCHVARTSMAN, S. **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. São Paulo: Sarvier. 1992. 288p.
- RECKNAGEL, R.O., GLENDE JR., E.A. Carbon tetrachloride hepatotoxicity – Na<sup>2+</sup> example of lethal cleavage. **CRC. Crit. Ver. Toxicol.**, v. 2, p. 263-267, 1973.
- ZÖLNNER, M.S.A. *et al.* **Patologia Gerla Prática**. Taubaté: Cabral Editora Universitária. 2000.