

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TOXICOLOGIA

**Alterações de Enzimas de Biotransformação de Xenobióticos na Fase Inicial da
Esquistossomose Mansônica Murina**

Dayse Aline Manhães Rocha

Rio de Janeiro

2004

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TOXICOLOGIA

**Alterações de Enzimas de Biotransformação de Xenobióticos na Fase Inicial da
Esquistossomose Mansônica Murina**

Dayse Aline Manhães Rocha

Dissertação Apresentada à Escola
Nacional de Saúde Pública – Fundação
Oswaldo Cruz para Obtenção do Grau de
Mestre em Saúde Pública – Área de
Concentração em Toxicologia.

Rio de Janeiro

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Manhães-Rocha, Dayse Aline

Alterações de Enzimas de Biotransformação na Fase Inicial da Esquistossomose Mansônica Murina / Dayse Aline Manhães Rocha – 2004

xviii, 113p.; tab, graf

Orientador: Francisco José Roma Paumgartten

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública.

1. Biotransformação de xenobióticos. 2. Esquistossomose mansônica murina. I. Francisco José Roma Paumgartte. II. Alterações de Enzimas de Biotransformação na Fase Inicial da Esquistossomose Mansônica Murina.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TOXICOLOGIA

Alterações de Enzimas de Biotransformação de Xenobióticos na Fase
Inicial da Esquistossomose Mansônica Murina

Dayse Aline Manhães Rocha

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em _____ de Abril de 2004 pela banca examinadora:

Prof. Dr. _____
Luiz Felipe Ribeiro Pinto

Prof^a. Dr^a. _____
Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques

Prof. Dr. _____
Francisco José Roma Paumgarten

Prof. Dr. _____
Israel Felzenswalb (suplente)

Prof^a. Dr^a. _____
Ana Gisele da Costa Neves Ferreira (suplente)

Rio de Janeiro

2004

À minha querida família.

AGRADECIMENTOS

Ao **Deus** Forte, meu Ajudador, pelo Dom da vida, e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais, que muito contribuíram para a realização desta importante etapa em minha vida.

À minha amada **mãe**, Maria Manhães, pelo carinho, aceitação e amor incondicional que me dedica a cada dia.

À minha querida **avó**, Diones, pela dedicação com que tem cuidado de mim todos estes anos.

Ao meu **pai**, José Rocha, que me ensinou, desde cedo, a batalhar pelos meus ideais.

Ao querido **Luiz**, companheiro de muitas horas difíceis, sempre disposto a ajudar. Obrigada por todo este carinho.

Ao querido **Ricardo**, pelas palavras de apoio e incentivo, que me ajudam a seguir em frente, e que firmaram meus passos nesta carreira científica. Obrigada por acreditar em mim.

Ao professor e orientador **Francisco José Roma Paumgarten**, pelo apoio e competência com que vem orientando minha carreira científica.

À professora **Ana Cecília A. X. de Oliveira**, que vem me orientando desde a iniciação científica, com quem muito tenho aprendido todos estes anos.

Ao querido **Fernando**, meu braço direito.

Aos grandes amigos **Antonio Augusto**, **Rosângela** e **Cristiano**, por terem dispensado horas na execução deste estudo.

À querida amiga **Laísa**, com quem tenho compartilhado, desde os tempos da faculdade, todas as alegrias e tristezas desta, por vezes, arduosa capacitação profissional.

À querida amiga **Barbara**, pela contagiante alegria e simpatia, sempre pronta a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental, **Regina**, **Igor**, **Flávia Morone**, **Kátia** e **Thiago**, e todos os outros, pela cooperação demonstrada ao longo de toda a pesquisa.

Ao professor **Luiz Felipe** e todos os colegas do Departamento de Bioquímica / UERJ, pela orientação e cooperação na realização de parte dos experimentos.

A todos que torceram por mim, e que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*“Ainda que eu falasse as línguas dos
homens e dos anjos... e conhecesse todos os
mistérios e toda a ciência... e não tivesse
amor, nada seria.”*

I Cor. 13:1-2

Resumo

Estudos em seres humanos e animais de laboratório têm indicado que infecções e estímulos inflamatórios alteram as atividades e a expressão de várias isoformas de citocromo P450 (CYP), e de outras enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos, no fígado, nos rins e no cérebro. Sabe-se que o *clearance* de muitos fármacos depende do metabolismo hepático e da atividade dos CYPs. Por outro lado, algumas drogas (pró-drogas) são convertidas por estas enzimas em metabólitos farmacológica e toxicologicamente ativos (ativação metabólica). Assim sendo, os fatores que modulam a atividade ou a expressão dos CYPs e das UDP-glicuronosiltransferases (UGTs), afetam também – favorável ou negativamente – os efeitos terapêuticos e adversos dos fármacos e a toxicidade de outros xenobióticos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de alterações do conteúdo total de citocromo P450, e da atividade de enzimas hepáticas de biotransformação (CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2E e UGT) durante a fase inicial da esquistossomose mansônica (15 e 30 dias pós-infecção), antes da deposição de ovos e do aparecimento de granulomas no fígado dos camundongos. Camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, foram expostos a 100 cercárias de *Schistosoma mansoni* aos 10 dias de vida e mortos, por deslocamento cervical, 15 e 30 dias após a infecção. Os fígados foram retirados para a preparação da fração microsomal e determinação do conteúdo total de CYPs, bem como das atividades da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD), metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD), benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD), pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD), nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d), cumarina 7-hidroxilase (COH) e UGT. Os resultados obtidos mostraram que, 15 dias após a infecção com *S. mansoni*, o conteúdo total de CYPs e as atividades de CYP1A, 2A, 2B e 2E, assim como da UGT, não estão alteradas. Mais tarde, 30 dias após a infecção, foram notadas, em alguns casos, modificações discretas das atividades de CYP1A, 2B e 2E, cujo sentido dependeu da linhagem e sexo dos animais.

Palavras-chave: biotransformação, citocromo P450, UGT, esquistossomose mansônica.

Abstract

It has been shown that a variety of infectious diseases and inflammatory processes cause a down-regulation of CYPs and other xenobiotic-metabolizing enzymes in the liver, kidneys and brain. Since CYP isoforms take part in the clearance as well as in the metabolic activation of drugs and other xenobiotic compounds, factors that modulate their expression are of utmost pharmacological and toxicological importance. The same holds true for phase II enzymes because elimination of most phase I-produced metabolites depends on their conjugation to endogenous substrates. Within this context, it has been reported that inflammatory reactions (granulome) around *Schistosoma mansoni* eggs trapped in the liver of infected mice are associated with a down-regulation of several CYP isoenzymes. Studies by one research group, however, have found that, at an earlier stage, before granulomes are formed, activities of several monooxygenases are increased in the liver of *S. mansoni*-infected mice. The objective of this study was to investigate whether the total content of cytochrome P450 and the activities of CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2E and UDP-glucuronosyltransferase) are altered in the hepatic microsomal fraction during the earlier phase of schistosomiasis (15 and 30 days after infection), when granulomes are not found yet in the mouse liver. Male and female Swiss Webster and DBA/2 mice were exposed to 100 cercariae of *S. mansoni* on 10th day of life and killed, by cervical dislocation, 15 and 30 days afterwards. Livers were then removed for preparation of microsomal fractions. Total content of CYP, as well as activities of CYP1A (ethoxyresorufin-*O*-deethylase – EROD and methoxyresorufin-*O*-demethylase – MROD), CYP2B (benziloxyresorufin-*O*-debenzylase – BROD and pentoxyresorufin-*O*-depentylase – PROD), CYP2E1 (N-nitrosodimethylamine- demethylase – NDMA-d), CYP2A5 (coumarin 7-hydroxylase – COH) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) were measured in the liver microsomes. Results showed that, 15 days after infection, CYPs- total content and activities of CYP1A, 2A, 2B, 2E and UGT were not altered. Afterwards, 30 days after the infection, in a few cases, slight changes were noted in the activities of CYP1A, 2B and 2E, the direction of which varied depending on the mouse strain and gender. In conclusion, data provided by the present study indicated that, in contrast with previous reports in male Balb/c mice, no evidence was found that a general upregulation of liver microsomal enzymes occurs at an earlier stage of murine schistosomiasis, i.e., before granulomes appear in the infected mice.

Key words: biotransformation, cytochrome P450, UGT, schistosomiasis.

Lista de Gráficos

- Gráfico 4.1** – Alterações da concentração total de citocromos P450 hepáticos em camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni* e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção 49
- Gráfico 4.2** – Alterações da concentração total de citocromos P450 hepáticos em camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção 51
- Gráfico 4.3** – Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção..... 52
- Gráfico 4.4** – Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção ... 53
- Gráfico 4.5** – Atividade da metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD) em fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção..... 54
- Gráfico 4.6** – Atividade da metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção ... 55
- Gráfico 4.7** – Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) em fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção..... 57

Gráfico 4.8 – Atividade da benziloxiresorufina- <i>O</i> -desbenzilase (BROD) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2 machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção ...	58
Gráfico 4.9 – Atividade da pentoxiresorufina- <i>O</i> -despentilase (PROD) em fração microsomal hepática de camundongos <i>Swiss Webster</i> , machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.....	59
Gráfico 4.10 – Atividade da pentoxiresorufina- <i>O</i> -despentilase (PROD) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção ...	60
Gráfico 4.11 – Atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d) em fração microsomal hepática de camundongos <i>Swiss Webster</i> , machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.....	61
Gráfico 4.12 – Atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção ...	62
Gráfico 4.13 – Atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção	64
Gráfico 4.14 – Atividade da UDP-glicuronosiltransferase (UGT) em fração microsomal hepática de camundongos <i>Swiss Webster</i> , machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.....	65
Gráfico 4.15 – Atividade da UDP-glucuronosiltransferase (UGT) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com <i>S. mansoni</i> , e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção ...	66

Lista de Tabelas

- Tabela 4.1** – Índice de penetração (IP-%) de cercárias de *Schistosoma mansoni* em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, durante 20 minutos por via percutânea 44
- Tabela 4.2** – Peso corporal (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, no dia da infecção (10 dias de vida) 45
- Tabela 4.3** – Peso corporal (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, no dia do sacrifício (15 e 30 dias após a infecção) 46
- Tabela 4.4** – Ganho de peso corporal (Δp , g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados entre os dias de infecção (dia 10 de vida) e de sacrifício (15 e 30 dias após a infecção) 47
- Tabela 4.5** – Peso do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, no dia do sacrifício (15 e 30 dias após a infecção) 48
- Tabela 5.1** – Alterações das atividades de enzimas citocromo P450 na fração microsossomal hepática de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com 100 cercárias de *S. mansoni*, 30 dias após a infecção 77
- Tabela 5.2** – Alterações dos níveis totais e das atividades de enzimas citocromo P450 e da atividade da glutathiona-S-transferase em fígado de camundongos Balb/C, machos, infectados com 120 cercárias de *S. mansoni*, 33 dias após a infecção 77

Lista de Siglas e Abreviaturas

ACOH: *Acetanilide-4-hydroxylation*

Ah: *Aryl hydrocarbon*

AHH: *Aryl hydrocarbon hydroxylase*

ANOVA: Análise de Variância

BROD: Benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase

BSA: Albumina Sérica Bovina

CECAL: Centro de Criação de Animais de Laboratório

CO: Monóxido de Carbono

COH: Cumarina Hidroxilase

CYP: Citocromo P450

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DO: Densidade Óptica (absorvância)

ΔP : diferença de peso

e.g.: Por exemplo (*exempli gratia*)

EDTA: Edetado Dissódico de Cálcio

EROD: Etoxiresorufina-*O*-desetilase

et al.: e colaboradores (*et alii*)

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

HCl: Ácido Clorídrico

i.e.: isto é (*id est*)

ip.: Intraperitoneal

IP: Índice de Penetração

K_m: Constante de Michaelis-Menten

mg: miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

ml: mililitros

mM: milimolar

MROD: Metoxiresofufina-*O*-desmetilase

NaCl: Cloreto de Sódio

NaOH: Hidróxido de Sódio

NDMA-d: Nitrosodimetilamina-desmetilase

nmol: nanomoles
p/v: peso/volume
PB: Fenobarbital
pmol: picomoles
PN: Pós-natal
PROD: Pentoxiresorufina-*O*-despentilase
PY: Pirazol
qsp: quantidade suficiente para
RNA: Ácido Ribonucléico
UDPGA: Ácido uridina-disfosfo-glicurônico
UGT: Uridina-difosfo-glicuronosiltransferase
v/v: volume/volume
μl: microlitros
μM: micromolar

SUMÁRIO

Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Gráficos	x
Lista de Tabelas	xi
Lista de Siglas e Abreviaturas	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 – Biotransformação.....	1
1.1.1 – Noções gerais.....	1
1.1.2 – Principais funções da biotransformação	2
1.1.3 – Fases da biotransformação	3
1.2 – Citocromos P450.....	4
1.2.1 – Características gerais	4
1.2.2 – Estrutura básica.....	7
1.2.3 – Mecanismo geral de catálise	8
1.2.4 – Nomenclatura	10
1.2.5 – Principais famílias e subfamílias de CYP analisadas neste estudo.....	11
1.2.5.1 – CYP1A	11
1.2.5.2 – CYP2A	13
1.2.5.3 – CYP2B.....	14
1.2.5.4 – CYP2E.....	16
1.3 – Glicuronidação.....	17
1.3.1 – UDP-glicuronosiltransferases (UGTs).....	18
1.3.2 – Mecanismos de ação.....	19
1.4 – Enzimas de biotransformação e doenças infecciosas.....	20
1.5 – Modelo Experimental: esquistossomose mansônica murina.....	24
1.5.1 – Noções gerais	24
1.5.2 – A fase aguda da doença	28
2. Objetivos.....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1 – Animais.....	31

3.2 – Grupos experimentais.....	31
3.3 – Infecção	33
3.4 – Sacrifício e armazenamento dos órgãos.....	33
3.5 – Preparação da fração microsomal.....	34
3.6 – Determinação da concentração de proteínas totais na fração microsomal.....	35
3.7 – Quantificação dos níveis totais de citocromos P450.....	35
3.8 – Determinação de atividades de isoenzimas citocromo P450 na fração microsomal hepática.....	37
3.8.1 – Determinação das atividades das alcoxiresorufina- <i>O</i> -desalquilases: etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD), metoxiresorufina- <i>O</i> -desmetilase (MROD), benziloxiresorufina- <i>O</i> -desbenzilase (BROD) e pentoxiresorufina- <i>O</i> -despentilsase (PROD)	37
3.8.2 – Determinação da atividade da cumarina-7-hidroxilase (COH)	39
3.8.3 – Determinação da atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d).....	40
3.9 – Determinação da atividade da uridinadifosfo-glicuronosiltransferase (UGT).....	42
3.10 – Análise estatística.....	43
4. Resultados	44
4.1 – Índice de penetração de cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos <i>Swiss Webster</i> e DBA/2 no 10º dia de vida.....	44
4.2 – Alterações do peso do corpo e do fígado nos camundongos infectados com <i>Scihtosoma mansoni</i>	45
4.3 – Alterações dos níveis totais de citocromos P450 no fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	48
4.4 – Alterações das atividades de isoenzimas citocromo P450 na fração microsomal hepática de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e seus respectivos controles não infectados	50
4.4.1 – Atividade da etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (EROD).....	50
4.4.2 – Atividade da metoxiresorufina- <i>O</i> -desmetilase (MROD).....	53
4.4.3 – Atividade da benziloxiresorufina- <i>O</i> -desbenzilase (BROD).....	56
4.4.4 – Atividade da pentoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase (PROD).....	57
4.4.5 – Atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d).....	59

4.4.6 – Atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH).....	63
4.5 – Alterações das atividades das UDP-glicuronosiltransferases (UGTs) na fração microsomal hepática de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e seus respectivos controles não infectados.....	65
5. Discussão	67
5.1 – Índice de penetração de cercárias de <i>S. mansoni</i> em camundongos <i>Swiss Webster</i> e DBA/2 no 10º dia de vida	67
5.2 – Alterações do peso corporal e do peso do fígado em camundongos <i>Swiss Webster</i> e DBA/2 infectados com <i>S. mansoni</i>	68
5.3 – Alterações de isoenzimas citocromo P450 no fígado de camundongos <i>Swiss Webster</i> e DBA/2, 15 e 30 dias após infecção com <i>S. mansoni</i>	69
5.3.1 – Especificidade das reações enzimáticas examinadas como marcadoras de isoenzimas CYP450 em camundongos	69
5.3.2 – Alterações de CYP450 nos camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	70
5.3.3 – Influência do sexo, idade e linhagem dos camundongos utilizados neste estudo sobre as atividades de CYP450	71
5.4 – Alterações da atividade da UDP-glicuronosiltransferase no fígado de camundongos <i>Swiss Webster</i> e DBA/2, 15 e 30 dias após a infecção com <i>S. mansoni</i>	74
5.4.1 – Alterações da atividade de UDP-glicuronosiltransferase nos camundongos infectados com <i>S. mansoni</i>	74
5.4.2 – Influência do sexo, idade e linhagem dos camundongos utilizados neste estudo sobre a atividade de UDP-glicuronosiltransferase.....	75
5.4 – Confronto dos resultados deste estudo com dados da literatura sobre alterações de enzimas de biotransformação de xenobióticos em processos inflamatórios e infecciosos.....	76
6. Conclusões	84
7. Referência Bibliográficas.....	86
8. Anexo	101
8.1 – Soluções, padrões, substrato, sistema regenerador de NADPH e outras substâncias utilizadas neste estudo.....	101
8.1.1 – Soluções	101
8.1.2 – Padrões	108

8.1.3 – Substratos	110
8.1.4 – Sistema regenerador de NADPH.....	111
8.1.5 – Substâncias	114

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Biotransformação

1.1.1 – Noções gerais

Os seres humanos estão constantemente expostos a uma variedade de xenobióticos ou substâncias químicas não-nutrientes estranhas ao organismo. Os xenobióticos podem ser de origem natural ou sintética e incluem fármacos, aditivos alimentares, pesticidas, toxinas, substâncias químicas de uso industrial e poluentes ambientais de diversos tipos (Parkinson, 2001; Sipes & Gandolfi, 1991).

A eliminação de xenobióticos ocorre pela urina, bile, fezes, ar expirado e transpiração e, no caso de compostos não voláteis, depende em grande parte da solubilidade aquosa da molécula. Em princípio, as moléculas mais lipofílicas, *i.e.* aquelas que exibem alto coeficiente de partição lipídio:água, tendem a permanecer e acumular no organismo, uma vez que os meios usuais de eliminação (*e.g.* urina, fezes) são fundamentalmente aquosos. Assim, embora os xenobióticos mais hidrossolúveis possam ser eliminados de forma inalterada, comumente a depuração das moléculas mais lipofílicas absorvidas pelo organismo depende essencialmente dos processos de biotransformação. De um modo geral, o processo de biotransformação de xenobióticos lipofílicos dá origem a metabólitos finais mais hidrossolúveis encontrados nos principais meios de eliminação: urina e fezes. A biotransformação é um processo bioquímico catalisado por uma ampla diversidade de enzimas distribuídas em diferentes tecidos e encontradas tanto dentro como fora (*e.g.* esterases plasmáticas) das células, onde estão localizadas em vários compartimentos subcelulares.

Nos vertebrados, o fígado é o órgão onde se encontra a maior abundância e diversidade de enzimas de biotransformação. Estas enzimas existem em quase todos os órgãos, mas a atividade é maior no fígado e naqueles tecidos estrategicamente situados nas portas de entrada do organismo, tais como trato gastrointestinal (*e.g.* intestino), pele, pulmão e mucosa nasal. Órgãos como os rins, o pâncreas, o coração, o cérebro, os testículos, a placenta, os ovários e vários outros também exibem importante capacidade metabólica em termos de biotransformação de xenobióticos.

A nível subcelular, as enzimas de biotransformação estão localizadas primariamente no retículo endoplasmático (microsomas) ou na fração solúvel do

citoplasma (citosol), e em menores quantidades na mitocôndria, no núcleo e nos lisossomos. A presença destas enzimas no retículo endoplasmático pode ser explicada pelo fato dos substratos primários das enzimas de biotransformação (xenobióticos) serem moléculas lipofílicas que tendem a se concentrar, portanto, na matriz lipoprotéica de que são constituídas as membranas (bicamada lipídica) do retículo endoplasmático (Parkinson, 2001).

1.1.2 – Principais funções da biotransformação

A biotransformação dá origem a metabólitos com características físico-químicas que favorecem a eliminação (menor coeficiente de partição lipídio:água) pela urina e fezes. Se não houvesse biotransformação, os xenobióticos lipofílicos seriam excretados tão lentamente que – com a continuidade da exposição – haveria acumulação, o que poderia, eventualmente, comprometer a própria sobrevivência do organismo.

Uma possível exceção a esta regra geral (maior lipossolubilidade → eliminação mais lenta) seria o caso de compostos voláteis (rapidamente eliminados – na forma inalterada – pela expiração), cuja biotransformação daria origem a metabólitos não voláteis mais hidrossolúveis que seriam eliminados mais lentamente pela urina ou fezes.

Como a biotransformação, de modo geral, facilita a eliminação dos xenobióticos lipofílicos que podem causar efeitos adversos, ela é considerada um processo de desintoxicação (Parkinson, 2001; Vermeulen, 1996; Sipes & Gandolfi, 1991).

A modificação química de um xenobiótico pela biotransformação também pode alterar o seu efeito biológico (Parkinson, 2001; Vermeulen, 1996). Muitos fármacos precisam ser inicialmente biotransformados para exercerem o seu efeito terapêutico, da mesma forma que muitos xenobióticos só apresentam efeitos tóxicos depois de serem biotransformados (*i.e.* sofrerem ativação metabólica). A biotransformação pode dar origem a metabólitos intermediários altamente reativos que, diferentemente das moléculas parentais às quais o organismo foi originalmente exposto, são capazes de se ligar a proteínas e ácidos nucleicos causando citotoxicidade e genotoxicidade (Omura, 1999).

Em que pese os numerosos exemplos de ativação metabólica entre as substâncias de importância toxicológica, na maioria das situações, a biotransformação resulta na diminuição do efeito terapêutico ou do efeito tóxico dos xenobióticos. De fato, a duração e a intensidade do efeito farmacológico de muitas drogas, bem como a

toxicidade das substâncias químicas, são em grande parte inversamente relacionadas à sua taxa de biotransformação (Parkinson, 2001; Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991).

1.1.3 – Fases da biotransformação

As reações catalisadas pelas enzimas de biotransformação podem ser esquematicamente agrupadas em duas fases seqüenciais: as reações de fase I e II. As reações de fase I consistem em reações de hidrólise, redução e oxidação, *i.e.* reações que introduzem – ou expõem – um grupo funcional quimicamente reativo (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH) na molécula do xenobiótico. Estas reações, que normalmente resultam apenas em aumento discreto da hidrossolubilidade em relação à molécula original do xenobiótico, fornecem os grupos funcionais que possibilitam as reações de fase II de conjugação a um composto endógeno. Os metabólitos conjugados são solúveis em água e encontrados na urina e fezes (Parkinson, 2001; Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991).

As reações de fase II, que podem ser precedidas ou não pelas reações de fase I, incluem glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com glutathione, aminoácidos e ácidos graxos (Parkinson, 2001; Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991). Nestas reações, o xenobiótico, ou o metabólito oriundo da fase I, é ligado covalentemente a uma macromolécula endógena (*e.g.*, ácido glicurônico, glutathione, sulfatos inorgânicos e aminoácidos), dando origem a um conjugado hidrossolúvel que pode ser eliminado pelas vias renal e biliar (Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991). Embora a seqüência típica seja a fase II sucedendo a fase I, caso o xenobiótico possua grupos funcionais adequados, a conjugação pode ocorrer sem ser precedida pela fase I e, em alguns casos excepcionais, produtos conjugados de fase II podem ser substratos para reações catalisadas pelas enzimas de fase I.

A biotransformação de xenobióticos é catalisada por enzimas cuja atividade pode variar em função de fatores como espécie, sexo, idade, estado de saúde, entre outros. Várias enzimas de biotransformação são induzíveis pela exposição prévia a determinados xenobióticos mas, em muitos casos, as enzimas são expressas constitutivamente.

O sistema enzimático mais importante na catálise das reações de fase I é o sistema citocromo P450, localizado nas membranas do retículo endoplasmático, ou

fração microsomal, de células de vários tecidos (principalmente no fígado, rins e intestino). Ao contrário do observado com os citocromos P450, enzimas ligadas à membrana microsomal, as enzimas de fase II são solúveis e encontradas livres na fração citosólica. Algumas enzimas de conjugação (fase II), no entanto, também estão localizadas na fração microsomal como, por exemplo, as UDP-glicuronosiltransferases (Parkinson, 2001; Gibson & Skett, 1994).

1.2 – Citocromos P450

1.2.1 – Características Gerais

Os citocromos P450 (CYPs) são hemoproteínas capazes de catalisar a oxidação de uma grande diversidade de moléculas orgânicas. Estas proteínas são encontradas em quase todos os organismos, desde protistas e plantas até mamíferos incluindo o homem (Mansuy, 1998; Lewis & Pratt, 1998; Stegeman & Livingstone, 1998; Nelson et al., 1996).

O grupamento prostético heme do citocromo P450 apresenta potencial redox e propriedades espectrais únicos. Quando reduzido, o citocromo P450 (Fe^{2+}) se liga ao monóxido de carbono formando um complexo cuja absorvância máxima ocorre a 450 nm. Esta propriedade espectral está presente somente quando o CYP está intacto e cataliticamente funcional. Quando desnaturado, o citocromo P450 deixa de exibir o pico espectral característico a 450 nm e, como outras hemoproteínas, apresenta a absorvância máxima a 420 nm (Sipes & Gandolfi, 1991; Stegeman & Livingstone, 1998).

O sistema enzimático citocromo P450 é constituído por duas enzimas: o citocromo P450 e uma flavoproteína. A flavoproteína é capaz de transferir um ou dois elétrons para o citocromo P450, e tem uma preferência pelo NADPH como co-fator, sendo chamada NADPH-citocromo P450 redutase. Há também um doador adicional de elétrons, o citocromo b5, ancorado ao retículo endoplasmático pela sua porção carboxi-terminal, que transfere elétrons do NADH e tem como função estimular a atividade dos CYPs. Dependendo da enzima e do substrato, o citocromo b5, que pode doar o segundo elétron que o citocromo P450 necessita, não só aumenta a velocidade de catálise do citocromo P450, como também pode aumentar a V_{max} e/ou diminuir o K_m aparente das reações catalisadas pelo CYP. Os microsossomos hepáticos contêm numerosas formas (ou isoformas / isoenzimas) de citocromo P450, mas exibem apenas uma forma de NADPH-

citocromo P450 redutase e citocromo b5. Para cada molécula de NADPH-citocromo P450 redutase presente em microsossomos hepáticos de ratos, existem – ao seu redor – de 5 a 10 moléculas de citocromo b5 e de 10 a 20 moléculas de citocromo P450 (Parkinson, 2001; Sipes & Gandolfi, 1991).

Os CYPs podem ser subdivididos em quatro classes – I, II, III e IV – dependendo de como os elétrons de NADPH são doados para o seu sítio catalítico. Os CYPs da classe I necessitam, como doadores de elétrons, tanto de uma redutase contendo FAD, quanto de uma redoxina contendo ferro e enxofre. As enzimas de classe II necessitam apenas da NADPH-citocromo P450 redutase. As moléculas de classe III são auto-suficientes neste aspecto e, portanto, não necessitam de doadores de elétrons. Os CYPs de classe IV recebem elétrons diretamente do NADPH. As enzimas citocromo P450 de classe I e II de todos os organismos participam de reações de desintoxicação e, em alguns casos, da ativação metabólica de xenobióticos (Werck-Reichart & Feyereisen, 2000).

Os CYPs de procariotos são proteínas solúveis que, freqüentemente, participam do catabolismo de substâncias químicas utilizadas como fonte de carbono e, também, da desintoxicação de xenobióticos. Outras funções conhecidas de CYPs em procariotos, incluem o metabolismo de ácidos graxos e a biossíntese de antibióticos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000).

Enzimas citocromo P450 de classe I de células eucarióticas são encontradas associadas a membranas mitocondriais e catalisam diversas reações envolvidas na biossíntese de hormônios esteróides e da vitamina D3 em mamíferos. Estas enzimas de classe I mitocondriais também são encontradas em insetos e nematódeos, mas até hoje nenhuma delas foi descrita em plantas (Werck-Reichart & Feyereisen, 2000).

As enzimas de classe II são as mais comuns nos eucariotos. Diferentemente do que ocorre com enzimas de classe II de procariotos, nos eucariotos o citocromo P450 e a NADPH-citocromo P450 redutase não estão ligados um ao outro, mas sim dissociados e ancorados independentemente, pelas âncoras amino-terminais hidrofóbicas, na face externa das membranas do retículo endoplasmático. As funções das enzimas de classe II são extremamente diversificadas. Em fungos, as enzimas de classe II catalisam a síntese de esteróides de membrana e micotoxinas e, além disso, estão envolvidas na metabolização de fitoalexinas e lipídeos. Em animais, as enzimas de classe II não só metabolizam substâncias exógenas, facilitando a sua excreção, como também participam da biossíntese ou biodegradação de muitos compostos endógenos, alguns dos

quais são tóxicos ou importantes reguladores endócrinos (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Mansuy, 1998; Stegeman & Livingstone, 1998; Gibson & Skett, 1994).

Entre as enzimas envolvidas na fase I da biotransformação de xenobióticos, os CYPs são as que apresentam maior versatilidade em termos catalíticos e são também as principais enzimas responsáveis pela desintoxicação e ativação metabólica de xenobióticos. Acredita-se que qualquer molécula orgânica hidrofóbica, seja ela fármaco, poluente ambiental ou produto natural, possa ser substrato para uma ou outra enzima citocromo P450. Estas enzimas desempenham, portanto, importante papel na carcinogênese química (ativação metabólica de pró-carcinógenos e desintoxicação de carcinógenos), e são determinantes também da tolerância a fármacos, pesticidas e poluentes ambientais (Parkinson, 2001; Werck- Reichhart & Feyereisen, 2000; Mostafa et al., 1990; Guengerich, 1988).

Os tipos e a quantidade de citocromo P450 variam de acordo com a espécie, o órgão, a idade, a saúde, o sexo, o estresse e a exposição a substâncias químicas (Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991). Os CYPs que metabolizam xenobióticos são, com frequência, induzíveis pela exposição prévia ao substrato ou a outras substâncias exógenas, ou inibidos por outros xenobióticos e por diversas condições. O aumento na atividade de enzimas citocromo P450 pode resultar de (1) duplicação gênica levando a uma super expressão de uma enzima citocromo P450, (2) a indução da síntese de citocromo P450 (aumento da transcrição ou estabilização de RNA mensageiro) por exposição a fatores ambientais, *e.g.* xenobióticos, ou (3) estabilização da enzima (apoproteína) já existente por exposição a um xenobiótico. Por outro lado, a diminuição da atividade das enzimas citocromo P450 pode resultar de (1) uma mutação que bloqueia a síntese de uma enzima CYP ou leva à síntese de uma enzima inativa ou cataliticamente comprometida, (2) exposição a um fator ambiental (como uma doença infecciosa ou um xenobiótico) que suprime a expressão da enzima citocromo P450, ou, (3) exposição a um xenobiótico que inibe ou inativa a enzima CYP pré-existente (Parkinson, 2001).

Cada isoforma de CYP aceita uma série de substratos com ampla diversidade de estruturas químicas. Por outro lado, uma mesma molécula pode ser substrato para várias isoenzimas citocromo P450. Assim sendo, no caso destas enzimas, pode-se dizer que a especificidade por determinado substrato é sempre relativa. É possível que duas ou mais isoformas de CYP possam contribuir para o metabolismo de um único

composto (Parkinson, 2001). A ampla e, freqüentemente, sobreposta especificidade por substratos impede que as enzimas citocromo P450 sejam denominadas de acordo com as reações que elas catalisam. Mais de 1000 diferentes isoformas de citocromos P450 foram identificadas e seqüenciadas até hoje (Nelson et al., 1996). Estas isoformas CYP foram classificadas em várias famílias e subfamílias com base na homologia dos genes correspondentes (Mansuy, 1998).

1.2.2 – Estrutura básica

As enzimas citocromo P450 possuem como grupo prostético o heme ou ferroprotoporfirina IX, em que o átomo de ferro ocupa posição central em um sulco hidrofóbico da apoproteína, acessível ao substrato.

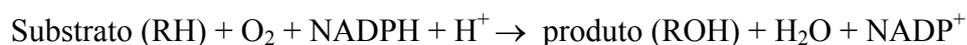
No heme, o ferro é capaz de fazer 6 ligações. Quatro destas ligações são feitas com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos. A quinta ligação do átomo de ferro é feita com o tiolato (S-), proveniente do resíduo de cisteína situado próximo à região C-terminal da cadeia polipeptídica da apoproteína, composta de 400 a 500 aminoácidos. Graças a sua eletrofilicidade, o enxofre da cisteína faz com que o átomo de ferro mantenha-se, normalmente, no estado férrico (Fe^{+3}) (Parkinson, 2001; Lewis, 1996). A existência desse quinto ligante confere aos citocromos P450, quando reduzidos ao estado ferroso (Fe^{2+}), uma grande afinidade por moléculas como oxigênio (O_2) e monóxido de carbono (CO). Como já comentamos, o complexo CO-CYP reduzido apresenta um espectro característico de absorção máxima a 450 nm, razão pela qual estas enzimas são denominadas de citocromo P450. (Parkinson, 2001; Omura & Sato, 1962). Este espectro de absorção máxima do complexo CO-CYP reduzido difere sutilmente entre diferentes isoformas e varia entre 447 nm e 452 nm. Todas as outras hemoproteínas que se ligam ao CO apresentam o espectro de absorção máxima a aproximadamente 420 nm (Parkinson, 2001). O sexto ligante pode ser a água (CYP no estado férrico), o monóxido de carbono ou o oxigênio molecular (CYP no estado ferroso).

Poucas regiões das enzimas citocromo P450 se mantêm conservadas de forma absoluta entre as diferentes isoformas. Em termos gerais, a identidade na seqüência de aminoácidos entre as proteínas CYPs é, com freqüência, extremamente baixa - podendo ser inferior a 20% (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000). A maior conservação estrutural é encontrada no cerne da proteína, em torno do resíduo de cisteína que forma

a ligação tiolada com a molécula heme, e reflete um mecanismo comum de transferência de elétrons e prótons e de ativação de oxigênio. Quando esta ligação tiolada é perturbada, o citocromo P450 é convertido a uma forma cataliticamente inativa chamada citocromo P420. As regiões mais variáveis estão associadas ao ancoramento das regiões amino-terminais ou ao direcionamento das proteínas ligadas às membranas, ou ainda ao reconhecimento e à ligação ao substrato. Estas regiões associadas ao reconhecimento de substratos e à ligação destes, determinam que estruturas químicas terão acesso ao centro ativo da enzima, ou seja, a seletividade pelo substrato de um CYP particular. Elas estão localizadas próximas ao canal de acesso do substrato e ao sítio de catálise, sendo freqüentemente referidas como sítios de reconhecimento do substrato ou SRSs (Parkinson, 2001; Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Stegeman & Livingstone, 1998).

1.2.3 - Mecanismo geral de catálise

Os citocromos P450 foram descobertos por volta de 1960 e, até pouco tempo, a única função catalítica destas hemeproteínas parecia ser a transferência de um átomo de oxigênio do O₂ para vários substratos. Para essa reação de monooxigenação, os citocromos P450 recebem elétrons do NADPH ou NADH via proteínas que transferem elétrons que normalmente estão ligadas ao citocromo P450 nas membranas celulares (Ortiz de Montellano, 1995). A ativação do oxigênio ou monooxigenação, na qual um átomo de oxigênio é incorporado ao substrato, designado RH, e o outro é reduzido a água, ocorre como descrito na equação abaixo:



Como mencionado anteriormente, durante a catálise, o citocromo P450 se liga diretamente ao substrato e ao oxigênio molecular, mas não interage diretamente com o NADPH ou NADH. O mecanismo pelo qual o citocromo P450 recebe elétrons do NAD(P)H depende da localização subcelular do citocromo P450. No retículo endoplasmático, onde se encontra o maior número de enzimas CYP envolvidas na biotransformação, os elétrons são transferidos do NADPH para o citocromo P450 via uma flavoproteína chamada NADPH-citocromo P450 redutase. Na mitocôndria, que abriga muitas enzimas CYP envolvidas na biossíntese de hormônios esteróides e no metabolismo da vitamina D, os elétrons são transferidos do NAD(P)H para o citocromo P450 via ferredoxina e ferredoxina redutase (Parkinson, 2001).

Em reações catalisadas pelo citocromo P450, o substrato (RH) se combina com a forma oxidada do citocromo P450 (Fe^{3+}), deslocando o sexto ligante, o que provoca alterações espectrais, no estado de “spin” e no potencial redox da hemeproteína (Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Sipes & Gandolfi, 1991). Acredita-se que a ligação do citocromo P450 ao substrato provoque uma alteração na conformação da enzima, possibilitando a interação com o componente redox (Lewis, 1996). Esse complexo substrato-citocromo P450 aceita um elétron, via NADPH-citocromo P450 redutase, que reduz o ferro na molécula heme do citocromo P450 ao estado ferroso. O complexo substrato-citocromo P450 reduzido (Fe^{2+}) combina com o oxigênio molecular que, então, aceita um outro elétron do NADPH. O complexo Fe^{2+}O_2 é convertido a um complexo Fe^{2+}OOH pela adição de um próton (H^+). Um segundo elétron é então doado a este complexo, via NADPH-citocromo P450 redutase, ou a partir do NADH, via citocromo b5. Em uma série de passos, que ainda não foram completamente esclarecidos, os dois elétrons são aparentemente transferidos para o oxigênio molecular. As espécies de oxigênio resultantes são altamente reativas e instáveis. Um átomo dessas espécies reativas de oxigênio é introduzido ao substrato, enquanto o outro é reduzido a água. Em seguida, o substrato oxigenado se dissocia, regenerando a forma oxidada do citocromo P450 (Parkinson, 2001; Werck-Reichhart & Feyereisen, 2000; Sipes & Gandolfi, 1991).

Outras funções catalíticas, além da monooxigenação, foram também relatadas para vários citocromos P450. Algumas dessas reações, que dependem de citocromos P450, são oxidações em que há clivagens de pontes C-C ou C=N e reduções. Reações como desalquilação, desidratação, desidrogenação, isomerização e dimerização também já foram descritas para algumas formas de citocromos P450 (Parkinson, 2001; Mansuy, 1998).

Muitos detalhes de como os CYPs catalisam outras reações nas quais estão envolvidos, principalmente as mais complexas, como as observadas em plantas, ainda não são bem conhecidos. Entretanto, a grande diversidade de reações catalisadas pelas enzimas citocromo P450 parece estar baseada em duas propriedades singulares destas hemeproteínas: (1) a capacidade do heme existir em diferentes estados de oxidação com diferentes reatividades e (2) a acessibilidade a uma grande variedade de substratos (Mansuy, 1998).

Desta forma, a propriedade comum a todos os citocromos P450 descobertos até o momento não é a ativação e a transferência de um átomo de oxigênio para o substrato,

mas sim a absorvância máxima a 450 nm, denominada pico “*Soret*”, do complexo formado pela forma reduzida do heme com o monóxido de carbono (Mansuy, 1998; Omura & Sato, 1964).

1.2.4 – Nomenclatura

As seqüências de aminoácidos de várias isoformas CYP têm sido determinadas, e estas seqüências formam hoje, a base para a classificação e a nomenclatura destas enzimas (Nelson et al., 1993). O sistema corrente de nomenclatura dos CYPs foi proposto por Nebert et al., 1991. Enzimas que apresentam mais de 40% de similaridade são agrupadas na mesma família, que é indicada por um algarismo arábico (*e.g.*, CYP1, CYP2, CYP3). Aquelas que possuem mais de 55% de similaridade em suas seqüências são agrupadas na mesma subfamília, que é representada por uma letra após o número arábico indicativo da família (*e.g.*, CYP2A, 2B, 2C, 2D, 2E). Cada membro da subfamília (isoenzima) é representado por um outro número arábico que vem em seguida à letra indicativa da subfamília (*e.g.*, CYP2A1, 2A2, 2A3). Quando em itálico, a sigla refere-se ao gene que codifica a proteína em questão (*e.g.*, *CYP1A2*). Por convenção, números relativos a família menores que 100 são reservados para enzimas provenientes de organismos eucarióticos, e aqueles maiores que 100 caracterizam enzimas oriundas de microorganismos procarióticos (Parkinson, 2001; Sipes & Gandolfi, 1991).

Em mamíferos, foram identificadas, até a presente data, mais de 14 famílias e 26 subfamílias de citocromos P450 (Nelson et al., 1996). No entanto, embora já tenham sido descritos cerca de 30 – 50 genes de CYP diferentes em ratos, camundongos e humanos, nem todas as famílias estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos. Em humanos, um número relativamente pequeno de isoformas CYP está envolvida no metabolismo de fármacos: 1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 (Spatzenegger & Jaeger, 1995). Das famílias de citocromo P450 presentes em mamíferos, CYP1, 2, 3 e 4 consistem de citocromos P450, hepáticos e extra-hepáticos, envolvidos na fase I da biotransformação de xenobióticos. Por outro lado, as famílias CYP11, 17, 19 e 21 são constituídas de citocromos P450 extra-hepáticos que participam do metabolismo de compostos endógenos (Sipes & Gandolfi, 1991).

As enzimas citocromo P450 microssomais hepáticas envolvidas na biotransformação de xenobióticos pertencem a três principais famílias: CYP1, CYP2 e

CYP3. Os microsossomos hepáticos também contêm enzimas da família CYP4, que têm como substratos vários ácidos graxos e eicosanóides, mas relativamente poucos xenobióticos. As enzimas citocromo P450 microsossomais hepáticas de cada uma dessas famílias geralmente pertencem a uma única subfamília (*e.g.*, CYP1A, CYP3A e CYP4A). Uma exceção notável é a família CYP2 que contém 5 subfamílias (*e.g.*, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D e CYP2E). O número de enzimas CYP em cada subfamília difere de uma espécie para outra (Parkinson, 2001).

Podem ocorrer diferenças nas propriedades catalíticas e na regulação entre os membros de diferentes subfamílias e, também, entre os membros de uma mesma subfamília. Além disso, em um determinado tecido podem estar presentes formas distintas de CYPs que, na maioria das vezes, podem diferir das encontradas em outros tecidos (Guengerich & MacDonald, 1990).

1.2.5 – Principais famílias e subfamílias de CYP analisadas neste estudo

Microsossomos hepáticos podem conter diferentes enzimas citocromo P450, de diferentes famílias e subfamílias, que metabolizam xenobióticos e/ou compostos endógenos (Guengerich, 1994; Wrighton & Stevens, 1992).

Algumas subfamílias são constituídas por enzimas presentes em várias espécies de mamíferos. Estas enzimas, cujas funções e regulação são altamente conservadas entre espécies, recebem o mesmo nome em todas as espécies nas quais ocorrem. Em outros casos, as relações funcionais e evolutivas não são tão aparentes e então, as enzimas citocromo P450 são nomeadas de uma maneira espécie-específica, e os nomes são atribuídos numa ordem cronológica (Parkinson, 2001).

1.2.5.1 - CYP1A

A família CYP1 é composta por duas subfamílias: CYP1A e CYP1B. Apesar dos cDNAs e genes destes dois membros já terem sido isolados em várias espécies, como camundongo, rato, coelho e homem, pouco se sabe sobre as propriedades funcionais e estruturais da subfamília CYP1B, que foi descoberta recentemente. A subfamília CYP1A possui duas enzimas em todas as espécies de mamíferos, conhecidas como CYP1A1 e CYP1A2, que compartilham uma alta similaridade em suas estruturas

primárias, bem como em suas características físico-químicas (Parkinson, 2001; Kawajiri & Hayashi, 1996).

A subfamília 1A é nitidamente bem conservada entre as espécies, embora existam algumas diferenças em relação à inducibilidade e ao perfil de especificidade para substratos (Parkinson, 2001). Até o momento, dez espécies moleculares de CYP1A1 (de peixes a mamíferos) foram clonadas e seqüenciadas. A isoenzima CYP1A1 de camundongos e de ratos, quando comparada à proteína humana, mostra uma similaridade de 79%. Quando comparadas, as duas isoformas, CYP1A1 e CYP1A2, apresentam um percentual de similaridade de aproximadamente 71% em camundongos e 69% em ratos (Kawajiri & Hayashi, 1996).

As duas formas da subfamília CYP1A são induzidas pelo 3-metilcolantreno, β -naftoflavona, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina e por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Parkinson, 2001; Ioannides & Parke, 1990). Embora a regulação da transcrição destes dois genes, *CYP1A1* e *CYP1A2*, seja mediada por mecanismos comuns, como a ativação do receptor Ah em resposta a indutores, diversas diferenças têm sido observadas quanto à inducibilidade. O isosafrole, por exemplo, indutor seletivo de CYP1A2 hepático, tem efeito discreto sobre CYP1A1 (Kawajiri & Hayashi, 1996).

Esta subfamília parece desempenhar uma importante função no metabolismo de xenobióticos. Existem inúmeros relatos a respeito do papel da subfamília CYP1A em vários processos de ativação metabólica, incluindo mutagênese ou carcinogênese em animais experimentais. Apesar das isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2 possuírem especificidades distintas para os substratos, pode haver em algumas ocasiões, uma certa superposição. Em camundongos, por exemplo, CYP1A1 e CYP1A2 catalisam a *O*-desalquilação da 7-etoxiresorrufina em níveis comparáveis. Em ratos, CYP1A1 catalisa preferencialmente a *O*-desalquilação da 7-etoxiresorrufina, enquanto CYP1A2 catalisa preferencialmente a *O*-desalquilação da 7-metoxiresorrufina (Burke et al., 1985). De um modo geral, a subfamília CYP1A está envolvida no metabolismo oxidativo de substâncias exógenas como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas e aminas aromáticas (Parkinson, 2001; Lewis, 1996).

A distribuição tissular dos níveis de expressão de mRNAs e proteínas, em animais induzidos, difere entre CYP1A1 e CYP1A2. A isoenzima CYP1A1 é expressa no fígado, mas também pode ser encontrada em vários tecidos extra-hepáticos, como pulmão e rim. Por outro lado, a expressão de CYP1A2 parece estar limitada ao fígado.

Em seres humanos, a CYP1A1 parece ser enzima primariamente extra-hepática, uma vez que grandes quantidades de mRNA e proteínas foram detectadas nos pulmões, linfócitos e placenta de fumantes ativos, enquanto na maioria desses indivíduos os níveis hepáticos de mRNA e proteínas tenham permanecido indetectáveis (Parkinson, 2001; Kawajiri & Hayashi, 1996).

1.2.5.2 - CYP2A

A família CYP2 é, sem dúvida, a maior de todas as famílias de citocromo P450, com 5 subfamílias (CYP2A, 2B, 2C, 2D e 2E). A subfamília CYP2A contém ao menos 12 membros distintos. CYP2A1, CYP2A2 e CYP2A3 são encontrados em ratos; CYP2A4, CYP2A5 e CYP2A12 em camundongos; CYP2A6 e CYP2A7 no homem; CYP2A8 e CYP2A9 em hamsters, e CYP2A10 e CYP2A11 em coelhos. Mesmo com 55% de similaridade entre as proteínas, estas isoformas variam, consideravelmente, quanto à regulação, especificidade para substrato, distribuição tissular e ontogenia (Chang & Waxman, 1996).

As isoenzimas que pertencem à subfamília CYP2A exibem acentuada diferença entre as espécies quanto à função catalítica. Por exemplo, as duas enzimas da subfamília CYP2A expressas em fígado de rato, a CYP2A1 e a CYP2A2, catalisam primariamente a 7 α - e 15 α - hidroxilação da testosterona, respectivamente. Em contraste, a isoforma da subfamília CYP2A expressa no fígado humano, a CYP2A6, catalisa a 7-hidroxilação da cumarina (Yamano et al., 1990). Assim como as enzimas CYP2A1 e 2A2 de ratos têm pequena ou nenhuma capacidade de hidroxilar a cumarina na posição 7 (formando a 7-hidroxycumarina), a CYP2A6 de humanos tem pequena ou nenhuma capacidade de hidroxilar a testosterona (Parkinson, 2001).

Microsossomos hepáticos de camundongos contêm 3 enzimas da subfamília 2A: a CYP2A12, que hidroxila a testosterona na posição 7 α , a CYP2A4, que hidroxila a testosterona na posição 15 α e a CYP2A5, que hidroxila a cumarina na posição 7. A CYP2A5 foi isolada a partir do fígado de camundongos DBA/2J e C57BL/6N e DBA/2N. Esta enzima não é capaz de hidroxilar a testosterona, assim como CYP2A12 e CYP2A4 não podem hidroxilar a cumarina. Entretanto quando, na estrutura da CYP2A5, a fenilalanina da posição 209 é substituída por leucina, a enzima adquire a capacidade de 15 α -hidroxilar os esteróides, sugerindo que o resíduo 209 está localizado no sítio de ligação ao substrato ou próximo a ele sendo, portanto, crítico

para a determinação da especificidade destas isoformas para o substrato (Negishi et al., 1996; Lindberg & Negishi, 1989).

As várias isoformas da subfamília CYP2A também apresentam diferenças importantes quanto à inducibilidade. Enquanto a CYP2A4 é relativamente refratária à indução, a CYP2A5 é induzível por um grande número de substâncias estruturalmente diversas, como o pirazol e o fenobarbital (Lang et al., 1989). Esta capacidade de resposta a indutores depende da linhagem, do sexo e da idade do animal (Chang & Waxman, 1996). A CYP2A5 e seu ortólogo no homem (CYP2A6) metabolizam diferentes substratos e fármacos estruturalmente diversos como a cumarina, o halotano e a losigamona. A CYP2A5 também atua no metabolismo de substâncias de importância toxicológica como nitrosaminas, aflatoxinas e nicotina (Posti et al., 1999; Chang & Waxman, 1996).

A atividade da cumarina-7-hidroxilase é um excelente marcador para CYP2A5, já que anticorpos anti-CYP2A5 inibem quase completamente (mais de 99%) esta atividade em microsossomos hepáticos isolados de camundongos machos e fêmeas das linhagens DBA/2 e AKR não tratados e, também, dos tratados com fenobarbital ou pirazol. O metabolismo da cumarina apresenta diferenças marcantes entre linhagens distintas. No camundongo da linhagem DBA/2, a atividade de cumarina-7-hidroxilase é relativamente alta sendo, por outro lado, consideravelmente menor nas linhagens AKR/J, C57BL/6N, C3H/HeJ e BALB/c (Iersel et al., 1994). A CYP2A5 apresenta, além da grande variação de atividade enzimática entre as linhagens, uma expressão sexo-específica, observando-se, em geral, maior atividade entre as fêmeas. A expressão de CYP2A4 e CYP2A5 é claramente maior no fígado das fêmeas. Nos machos, a CYP2A4 é expressa principalmente nos rins mas, entre as fêmeas, apenas a CYP2A5 está presente no tecido renal (Pearce et al., 1992). Os mecanismos hormonais subjacentes a estas diferenças da expressão de CYP2A5 relacionadas ao sexo, bem como os mecanismos responsáveis por diferenças de expressão relacionadas a outros fatores, ainda não são bem conhecidos (Chang & Waxman, 1996).

1.2.5.3 - CYP2B

Em várias espécies, a subfamília CYP2B é a que contém o maior número de isoformas citocromo P450 induzíveis pelo fenobarbital e, baseado em análises genéticas, pode-se dizer que esta é – em termos de número de isoenzimas – uma das

maiores subfamílias de citocromo P450 conhecidas (Honkakoski et al., 1992; Sipes & Gandolfi, 1991).

A indução de CYP2B também é observada em ratos expostos a outros xenobióticos, como pesticidas halogenados (*e.g.* DDT), uma grande variedade de agentes farmacêuticos, substâncias produzidas por plantas, hidrocarbonetos voláteis como cetonas, xilenos e piridina, e várias bifenilas poli-halogenadas (Nims & Lubet, 1996; Sipes & Gandolfi, 1991).

A subfamília CYP2B tem sido intensamente estudada em ratos, nos quais algumas isoformas, como a CYP2B1, a CYP2B2 e a CYP2B3, já foram descritas (Nelson et al., 1993). Embora a CYP2B1 e a CYP2B2 apresentem 91% de similaridade entre si, as formas de expressão e a regulação destas duas isoenzimas são diferentes. A CYP2B1 é altamente induzível pelo fenobarbital, enquanto a CYP2B2 é constitutiva e apenas moderadamente induzível. A CYP2B3 apresenta 77% de homologia com CYP2B1 e CYP2B2, sendo fracamente induzível. No homem, dois ortólogos para a CYP2B de rato são conhecidos: a CYP2B6 e a CYP2B7, expressas no fígado e nos pulmões, respectivamente. As enzimas CYP2B6 e CYP2B7 humanas possuem 76% e 93 % de homologia com a CYP2B1 de rato, respectivamente (Lewis, 1996).

Em camundongos, dezesseis genes *CYP2B* já foram identificados mas não se sabe ainda quais destes genes são ativos. No entanto, duas isoenzimas já foram identificadas nesta espécie: a CYP2B9 e a CYP2B10 (Honkakoski et al., 1992). Mesmo com 83% de homologia entre si, tais isoformas apresentam grandes diferenças em sua regulação. A CYP2B9 é constitutiva e fracamente induzível, sendo controlada estritamente por hormônios. Por outro lado, a CYP2B10 é altamente induzível pelo fenobarbital, é controlada pelos hormônios sexuais e é a primeira isoenzima induzida por substâncias químicas como clordano e por bifenilas halogenadas (Yoshioka et al., 1990; Leighton & Kemper, 1984). A isoenzima CYP2B10 possui 95% de similaridade com CYP2B1 quanto à seqüência de aminoácidos e a CYP2B9, 80 a 85% de similaridade com a mesma isoforma (Nims & Lubet, 1996). Além de CYP2B9/10, os camundongos expressam também CYP2B12, mas apenas nas glândulas sebáceas, e CYP2B13, CYP2B19 e CYP2B20, ainda pouco estudadas (Nelson, 1999; Friedberg et al., 1992).

As várias isoenzimas da subfamília CYP2B apresentam uma grande diversidade em termos de especificidade para substratos, o que varia de acordo com a espécie, a linhagem e o sexo, entre outros aspectos. Aminopirona, etilmorfina e zoxazolamina são

substratos utilizados como provas catalíticas para CYP2B, mas não são específicos porque são metabolizados também por outros CYPs. No rato, a testosterona (que é hidroxilada na posição 16- β) é considerada um substrato de alta especificidade para a ação catalítica de CYP2B. No entanto, a 16- β hidroxilação da testosterona não é prova útil para seres humanos e camundongos já que, nessas duas espécies, outras isoenzimas citocromo P450 também catalisam esta reação de hidroxilação. Já foi demonstrado que duas alcoxifenoxazonas, a pentoxiresorufina e a benziloxiresorufina, são substratos preferenciais e relativamente específicos para isoformas CYP2B em ratos, camundongos e coelhos, mas pouco específicos em hamsters e seres humanos (Parkinson, 2001; Nims & Lubet, 1996; Nerukar et al., 1993; Burke et al., 1985).

A participação da subfamília CYP2B na ativação metabólica de xenobióticos e na carcinogênese química é difícil de determinar. Sabe-se, entretanto, que enzimas desta subfamília atuam na ativação metabólica de substâncias de importância toxicológica como o bromobenzeno, o tetracloreto de carbono, a cocaína, o paration e o tricloroetileno (Nims & Lubet, 1996).

1.2.5.4 – CYP2E

A isoenzima CYP2E1, da subfamília CYP2E, é a principal forma de citocromo P450 induzível pelo etanol, além de ser induzida também pelo tratamento com isoniazida, acetona e pirazol. A função e a regulação da CYP2E1 são altamente conservadas entre as espécies de mamíferos e, por isso, estas recebem o mesmo nome em todas elas (Parkinson, 2001; Sipes & Gandolfi, 1991).

A CYP2E1 é uma das enzimas CYP450 que requer citocromo b5, que diminui o K_m para muitos substratos desta isoforma. Esta isoenzima é responsável pela monooxidação de um grande número de alcanos halogenados (Guengerich et al., 1991). A CYP2E1 metaboliza também o acetaminofenol, a cafeína, o benzeno, o clorofórmio, a anilina, o *p*-nitrofenol, a teofilina e as nitrosaminas (Parkinson, 2001).

Os níveis de CYP2E1 não são constantes entre os indivíduos, mas também não exibem a acentuada variação interindividual característica de outras enzimas citocromo P450. As diferenças sexuais na expressão de CYPs ocorrem em pequena extensão entre os camundongos. Em ratos, os níveis de expressão de CYP2E1 são maiores nas fêmeas do que nos machos (Parkinson, 2001). Estas diferenças relacionadas ao sexo na expressão de enzimas citocromo P450 se devem, em grande parte, a diferenças sexuais

no padrão de secreção do hormônio de crescimento, que é pulsátil nos machos e mais ou menos contínua nas fêmeas (Waxman, 1992).

1.3 - Glicuronidação

A glicuronidação é uma das principais vias de biotransformação de xenobióticos em todos os mamíferos, com exceção dos felinos (Miners & Mackenzie, 1992; Mackenzie et al., 1992). A ampla distribuição entre as espécies em que ocorre, a grande variedade de substratos que aceita, a relativa abundância do co-substrato e a diversidade na natureza dos grupos receptores tornam a conjugação com o ácido glicurônico uma das mais importantes reações de fase II da biotransformação. A glicuronidação converte substâncias exógenas e endógenas lipofílicas em compostos mais polares e hidrossolúveis. (Guéraud et al., 2003; Parkinson, 2001; Guéraud & Paris, 1998; Guéraud et al., 1997; Gibson & Skett, 1994; Miners & Mackenzie, 1991; Sipes & Gandolfi, 1991; Bock et al., 1983).

A glicuronidação requer como co-substrato o ácido uridina difosfato-glicurônico (UDP-ácido glicurônico), e a reação é catalisada pelas UDP-glicuronosiltransferases. Ao contrário das outras enzimas de fase II, que são fundamentalmente citosólicas, as UDP-glicuronosiltransferases localizam-se no retículo endoplasmático das células hepáticas e de outros tecidos, como rins, intestino, pele, cérebro, baço e mucosa nasal. A localização das UDP-glicuronosiltransferases na membrana microsomal confere a elas acesso direto aos produtos formados pela ação das enzimas citocromo P450, na fase I da biotransformação (Parkinson, 2001; Martin & Black, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991).

A formação do glicuronato pode ocorrer com álcoois, fenóis, hidroxilaminas, ácidos carboxílicos, aminas, sulfonamidas e tióis. Além de inúmeros xenobióticos e metabólitos oriundos da fase I, também são substratos para glicuronidação vários compostos endógenos potencialmente tóxicos, como a bilirrubina, além de hormônios esteróides e tireoidianos. Os glicuronatos resultantes são polares, hidrossolúveis e podem ser excretados pela urina ou bile, dependendo do tamanho da molécula (Parkinson, 2001; Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991). É importante notar que a glicuronidação forma um ácido carboxílico que existe na forma ionizada em pH fisiológico. Estes conjugados promovem a excreção não somente pela hidrossolubilidade que conferem, mas também porque podem participar da excreção

biliar e dos sistemas de transporte de ânions renais que reconhecem estes metabólitos (Sipes & Gandolfi, 1991).

1.3.1 - UDP-glicuronosiltransferases (UGTs)

As enzimas que catalisam as reações de glicuronidação são as uridina difosfato glicuronosiltransferases, uma superfamília de enzimas que catalisam a reação entre um nucleotídeo de alta energia, UDP-ácido glicurônico (UDP-GA) e o grupo funcional do substrato. O sítio de glicuronidação geralmente é um heteroátomo nucleofílico (O, N, ou S). Os substratos para glicuronidação contêm, portanto, grupos funcionais como álcoois e fenóis (que formam éteres de *O*-glicuronatos), aminas aromáticas e alifáticas primárias e secundárias (que formam *N*-glicuronatos) e grupos sulfidrilas livres (que formam *S*-glicuronatos). Acredita-se que alguns átomos de carbono nucleofílicos também possam formar *C*-glicuronatos (Parkinson, 2001; Gibson & Skett, 1994; Sipes & Gandolfi, 1991).

As UDP-glicuronosiltransferases são divididas em duas famílias, e um total de três subfamílias (Burchell et al., 1991). As diferentes isoformas de UGTs apresentam uma sobreposta especificidade por xenobióticos, mas uma especificidade distinta para os substratos endógenos. As isoformas pertencentes à primeira família (UGT1) são responsáveis pela glicuronidação da bilirrubina e de compostos fenólicos planos como 4-nitrofenol. A família UGT2, que é dividida em duas subfamílias (UGT2A e UGT2B), é responsável pela glicuronidação de alguns xenobióticos e compostos endógenos como hormônios esteróides (Guéraud & Paris, 1998; Guéraud et al., 1997).

A heterogeneidade enzimática explica em parte o aumento diferencial nas atividades das enzimas em relação aos diversos substratos após o tratamento com agentes indutores microsossomais conhecidos, a diminuição diferenciada na atividade com respeito à inibição, e as diferenças entre espécies que levam a defeitos na glicuronidação de apenas alguns substratos. Segundo Martin & Black (1994) e Sipes & Gandolfi (1991), há hoje, evidências de que existem pelo menos 11 formas de UDP-glicuronosiltransferases. Quatro destas formas foram clonadas, seqüenciadas e expressas em culturas de células de mamíferos. Estas várias formas respondem a diferentes agentes indutores e exibem uma seletividade em relação a alguns substratos, embora algumas vezes ocorra uma sobreposição em termos da especificidade.

Baseado na ontogenia e inducibilidade, as atividades das UDP-glicuronosiltransferases em microsossomos hepáticos de ratos foram classificadas em 4 grupos. A atividade de enzima(s) no primeiro grupo atinge o máximo 1 a 5 dias antes do nascimento, e é induzível por 3-metilcolantreno e outros indutores de CYP1A. A atividade da(s) enzima(s) do segundo grupo atinge o máximo aproximadamente 5 dias após o nascimento e é induzível por fenobarbital e outros indutores de CYP2B. A atividade de enzima(s) do terceiro grupo atinge o máximo em torno do início da puberdade (aproximadamente um mês) e é induzível por PCN e outros indutores de CYP3A. A atividade da(s) enzima(s) do quarto grupo também atinge o máximo na época da puberdade e é induzível por indutores de CYP4A (Parkinson, 2001; Martin & Black, 1994).

In vitro, a glicuronidação de xenobióticos pelos microsossomos hepáticos pode ser estimulada por detergentes que destroem a bicamada lipídica do retículo endoplasmático, permitindo o acesso das UDP-glicuronosiltransferases ao UDP-ácido glicurônico. Altas concentrações de detergente, no entanto, podem inibir as UDP-glicuronosiltransferases, provavelmente por comprometerem a interação desta com os fosfolipídios, o que é importante para a sua atividade catalítica (Parkinson, 2001; Martin & Black, 1994).

1.3.2 - Mecanismos de ação

O UDP-ácido glicurônico, co-substrato para a glicuronidação, é sintetizado a partir da glicose-1-fosfato e é encontrado em todos os tecidos do corpo. As enzimas envolvidas nesta reação estão localizadas no citosol. O terminal *C* de todas as UDP-glicuronosiltransferases contém um domínio que ancora a enzima no retículo endoplasmático. A enzima fica no lúmen do retículo endoplasmático, facilitando sua interação com xenobióticos lipofílicos e metabólitos oriundos da fase I da biotransformação. A orientação das UDP-glicuronosiltransferases no lúmen representa um problema porque o co-substrato, UDP-ácido glicurônico, é hidrossolúvel e sintetizado no citoplasma. Acredita-se que um transportador introduza este co-substrato no lúmen do retículo endoplasmático, bem como transfira a UDP de volta para o citoplasma para a síntese de novos UDP-ácidos glicurônicos (Parkinson, 2001).

Uma vez que as UDP-glicuronosiltransferases estão embebidas na membrana microsossomal, sua atividade depende da quantidade de isoenzimas, bem como da relação

entre as enzimas e o ambiente lipídico. Esta relação entre o estado funcional das UGTs e a fluidez da membrana ainda não está bem compreendida. No entanto, sabe-se que em hepatócitos ou microsossomos intactos, a atividade de glicuronidação pode ser aumentada pela adição de agentes formadores de poros ou detergentes aos microsossomos (Guéraud et al., 2003).

O ácido glicurônico tem uma α -configuração que o protege contra a hidrólise pela enzima β -glicuronidase. Este co-fator sofre uma inversão durante as reações de conjugação, formando glicuronatos de xenobióticos com uma β -configuração. Esta inversão da configuração ocorre porque os glicuronatos são formados por um ataque nucleofílico ao UDP- ácido glicurônico, e este ataque ocorre no lado oposto da ligação entre o ácido glicurônico e a UDP-glicuronosiltransferase. Desta forma, ao contrário do co-substrato, UDP- ácido glicurônico, os xenobióticos conjugados com ácido glicurônico são substratos para a β -glicuronidase, que além de estar presente nos lisossomos de alguns tecidos de mamíferos, pode ser encontrada - de forma importante - na microflora intestinal. Em consequência da ação desta enzima, alguns substratos podem ser liberados e reabsorvidos levando a re-circulação entero-hepática. Os compostos envolvidos neste ciclo tendem a ter um tempo de vida maior no corpo e devem sofrer uma biotransformação mais extensiva antes de serem excretados. Devido à suscetibilidade de certos glicuronatos à degradação enzimática e química, os glicuronatos podem servir também para transportar compostos potencialmente reativos do fígado para órgãos alvos (Parkinson, 2001; Sipes & Gandolfi, 1991).

1.4 - Enzimas de biotransformação e doenças infecciosas

Tem sido observado que, em seres humanos e em animais de laboratório, infecções e estímulos inflamatórios causam alterações das atividades e dos níveis de expressão de várias isoformas de citocromo P450 e de outras enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos no fígado, nos rins e no cérebro. Sabe-se que a depuração (*clearance*) de muitos fármacos depende do metabolismo hepático e da atividade dos CYPs. Por outro lado, algumas drogas (pró-drogas) são convertidas por estas enzimas em metabólitos farmacológica e toxicologicamente ativos (ativação metabólica) e precisam sofrer conjugação com macromoléculas endógenas para serem eliminadas. Assim sendo, os fatores que modulam a atividade ou a expressão dos CYPs e das UDP-glicuronosiltransferases, afetam também – favorável ou negativamente – os

efeitos terapêuticos e tóxicos dos fármacos. Digno de nota, é o fato destas enzimas participarem também do metabolismo de compostos endógenos, podendo levar à formação ou eliminação de metabólitos tóxicos oriundos destes compostos. Neste sentido, a modulação da formação destes metabólitos pela inflamação ou pela infecção poderia estar relacionada a mecanismos homeostáticos e fisiopatológicos desencadeados por estas condições (Paton & Renton, 1998; Sheweita et al., 1998; Morgan, 1997).

Em animais, infecções por vírus (Paton & Renton, 1998; Renton, 1986), bactérias (Paton & Renton, 1998; Azri & Renton, 1991; Batra, 1987) e outros parasitas (Habib et al., 1996; Sheweita & Mostafa, 1995; Tekwani, 1990) têm sido associadas à diminuição da depuração (*clearance*) de fármacos. Tem sido observado também que, em alguns modelos experimentais de inflamação e infecção, estas condições patológicas protegem os animais da toxicidade de agentes que necessitam de bioativação para exercerem os seus efeitos nocivos (Morgan, 1997). Todavia, tem sido demonstrado que infecções também podem resultar em aumento da atividade de algumas isoformas de citocromo P450 e de enzimas de fase II, como é o caso da hepatite causada pela bactéria *Helicobacter hepaticus*, que causou um aumento da atividade de CYP1A2 e CYP2A5, bem como da atividade das glutationa-S-transferases (Chomarat et al., 1997).

Embora a maioria dos exemplos relatados na literatura envolvam uma redução da atividade de enzimas citocromo P450, existem também alguns casos nos quais uma forma específica de CYP está induzida durante os processos infecciosos e inflamatórios. A modulação de enzimas de biotransformação durante a ativação dos processos de defesa do hospedeiro é uma consequência multifatorial da infecção e da inflamação, e tem o potencial de modificar a disposição dos xenobióticos (Renton, 2001). Neste sentido, tem sido descrito que ratos infectados com o protozoário *Plasmodium berghei* exibem um decréscimo no metabolismo microsomal de diversos substratos para enzimas citocromo P450, como o metronidazol e a cafeína, mas não apresentam alterações do metabolismo da antipirona (McCarthy, et al., 1970; Kokwaro et al., 1993). Estes estudos sugerem um efeito seletivo da malária sobre algumas formas de CYP (Morgan, 1997). A infecção experimental de roedores pelo helminto *Ancylostoma ceylanicum*, por outro lado, causou uma redução do conteúdo microsomal hepático de CYPs e da atividade da aminopirona-*N*-desmetilase, embora não tenha alterado a atividade da “*aryl hydrocarbon hydroxylase*” (Tekwani et al., 1990). Foi demonstrado também que a infecção de ratos e ovelhas com o parasita *Fasciola hepatica* provocou

uma redução do conteúdo de CYPs hepáticos, bem como do metabolismo e da depuração *in vivo* de fármacos. Nos animais infectados com *F. hepatica* foi constatada uma redução do metabolismo da anilina, aminopirona, etilmorfina, benzo[*a*]pireno e benzfetamina, mas não da eritromicina (Morgan, 1997).

Alguns estudos relataram a ocorrência de uma acentuada diminuição da atividade de várias monooxigenases hepáticas em camundongos infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni* (Ebeid et al., 2000; Siwela et al., 1990; Cha & Bueding, 1978; Cha & Edwards, 1976). Esta inibição da atividade de enzimas microssomais parece ser proporcional - até certo ponto - à carga parasitária (Sheweita et al., 1998). Naik & Hasler (1995), sugerem que uma infecção com cinco casais de *S. mansoni* é suficiente para produzir uma diminuição da atividade de enzimas citocromo P450. Por outro lado, a atividade das enzimas microssomais não foi alterada quando a infecção foi unissexual (*i.e.* por trematódeos de um único sexo), situação em que não há produção de ovos e, portanto, lesões hepáticas. Vários estudos sugerem que a depressão das enzimas microssomais é conseqüente ao processo de inflamação granulomatosa em torno dos ovos depositados no fígado, o que explicaria o fato de não ter sido observada em camundongos atímicos (*'athymic nude mice'*) onde não há formação de granulomas (Cha et al., 1980).

Tem sido relatado que infecções produzidas por *S. mansoni* podem causar um aumento dos níveis totais de citocromos P450 num estágio inicial da doença, seguido por uma diminuição da biotransformação conforme a doença avança (Sheweita et al., 1998; Sheweita & Mostafa, 1995; ; El-Mouelhi et al., 1987; El-Bassiouni et al., 1984; Cha & Edwards, 1976). Tem sido demonstrado que camundongos infectados exibem uma diminuição na concentração de proteínas microssomais hepáticas, bem como de citocromos P450 somente a partir da sexta semana após a infecção, quando os esquistossomos se tornam vermes adultos e tem início a oviposição (Sheweita et al., 1998; Habib et al., 1996; Sheweita & Mostafa, 1995).

Em todos os estudos que encontraram um aumento da atividade de enzimas microssomais hepáticas, este aumento ocorreu apenas durante o estágio inicial (pré-granuloma) da doença. Awney et al., (2001) mostraram que a atividade da “*aryl hydrocarbon hydroxylase*” está aumentada 33 dias após a infecção com diferentes números de cercárias (carga parasitária) de *S. mansoni*. Da mesma forma, Sheweita et al., (1998) verificaram que o conteúdo total de CYPs hepáticos, bem como a atividade da “*aryl hydrocarbon hydroxylase*” estão aumentados 33 dias após a infecção com

diferentes cargas parasitárias. A atividade da glutiona-*S*-transferase, por sua vez, estava aumentada somente nos camundongos infectados com 60, 120 e 180 cercárias. Os animais infectados com 300 e 600 cercárias exibiram o efeito inverso, *i. e.* uma redução da atividade desta enzima.

Assim como a carga parasitária parece influenciar a modulação das atividades microsossomais de fase I e II da biotransformação, o estágio da doença também parece estar envolvido nesta modulação. Por exemplo, foi relatado que as atividades da NADPH-citocromo P450 redutase, da “*aryl hydrocarbon hydroxylase*”, da anilina hidroxilase, da nitrosodimetilamina *N*-desmetilase, bem como da etilmorfina e aminopireno desmetilase aumentam num estágio inicial da esquistossomose murina (aproximadamente 30 dias pós-infecção), mas diminuem em estágios mais avançados da doença (75 dias) (Sheweita & Mostafa, 1995; Mostafa et al., 1993; El-Bassiouni et al., 1984).

Não é claro, entretanto, se as diferentes subfamílias de citocromos P450, além de outras enzimas de biotransformação, estariam igualmente alteradas na esquistossomose mansônica murina. Também é obscura a relação destas alterações enzimáticas com a espécie, a linhagem e o sexo do modelo animal utilizado. É possível que, na esquistossomose murina, a atividade de algumas enzimas hepáticas esteja deprimida e a de outras aumentada, e que estes efeitos sofram modificações ao longo da evolução da doença.

Estas modificações das atividades de enzimas de metabolismo de fármacos que ocorrem na esquistossomose são importantes para a resposta de um órgão do animal infectado a carcinógenos químicos (Sheweita et al., 1998). Como estas enzimas desempenham um papel fundamental na biotransformação de xenobióticos, as alterações causadas pela esquistossomose, ou por outras doenças que desencadeiam processos inflamatórios, podem modificar a cinética de fármacos e a ativação metabólica e eliminação de carcinógenos químicos. Estes achados de relatos experimentais têm ressaltado a importância da investigação das alterações da expressão e das atividades das enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos e na eliminação e ativação de substâncias tóxicas - incluindo carcinógenos químicos - durante processos inflamatórios e infecciosos.

1.5 – Modelo experimental: esquistossomose mansônica murina

1.5.1 – Noções gerais

As esquistossomoses, também denominadas bilharzioses, são doenças produzidas por trematódeos do gênero *Schistosoma* cujas principais espécies de interesse médico são o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonium* (Rey, 1991). A gravidade da doença, que depende da carga parasitária, e o acentuado déficit orgânico que produz, torna as esquistossomoses um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo (Rey, 1991). A esquistossomose é endêmica em 76 países e estima-se que mais de 200 milhões de indivíduos residentes em áreas rurais e agrícolas estejam infectados e que mais de 600 milhões estejam sob o risco de infecção (WHO, 1985; 1993). No Brasil, onde só ocorre o *S. mansoni*, admite-se que existem mais de seis milhões de indivíduos infectados (Rey, 1991). Entre os sinais e sintomas da esquistossomose mansônica estão a fraqueza, a diarreia e a hepatosplenomegalia. O aparecimento de neoplasias também tem sido associado às esquistossomoses como, por exemplo, o carcinoma intestinal e, de forma mais consistente, no caso da doença causada pelo *S. haematobium*, o câncer de bexiga urinária (El-Bolkainy et al., 1981; Sherif, 1975; Cheever & Andrade, 1967; Sherif, 1975; Dimmette, 1956).

O *S. mansoni* ocorre de forma endêmica na África, na América do Sul e nas Antilhas, onde determina uma doença denominada esquistossomose mansônica ou intestinal, pela localização preferencial dos parasitos nas vênulas da parede do intestino grosso, sigmóide e reto, com sintomas predominantemente intestinais. A forma hepato-esplênica da esquistossomose mansônica surge pela retenção de ovos no fígado dando origem aos granulomas que, com o tempo e dependendo do número de ovos retidos, podem levar a um grau acentuado de fibrose, hipertensão portal, varizes esofageanas e hepatoesplenomegalia. Esta última pode ser considerada como a forma mais grave da doença podendo levar ao êxito letal.

A distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil está condicionada à de algumas espécies de moluscos de água doce, do gênero *Biomphalaria*, que são seus hospedeiros intermediários (Rey, 1991). Os trematódeos do gênero *Schistosoma* são parasitos que requerem dois hospedeiros para completar sua evolução: um molusco aquático (do gênero *Biomphalaria*, no caso de *S. mansoni*) e um vertebrado.

Tipicamente, estes helmintos passam por cinco estágios larvários (além do ovo), embora algumas espécies passem por menos. No caso do *Schistosoma mansoni*, podem ser destacadas as seguintes fases de desenvolvimento, além dos vermes adultos e de seus ovos: a) **miracídio**, forma de vida livre que, após a eclosão do ovo em meio líquido, nada durante algumas horas em busca do molusco hospedeiro adequado ao seu desenvolvimento; b) **esporocistos primários e secundários**, produtores de cercárias, no interior do molusco; c) as formas de vida livre denominadas **cercárias**, que abandonam o molusco e constituem a forma infectante para o homem e outros vertebrados (Pereira, 1997; Rey, 1991).

Sabe-se que a suscetibilidade dos vertebrados que são hospedeiros definitivos varia de forma ampla, decrescendo dos mais suscetíveis, como o homem, o camundongo e o hamster, aos mais resistentes, como o rato, o cão e o gato (Ghandour & Webbe, 1976). Os camundongos são animais muito suscetíveis ao *S. mansoni* e desenvolvem a doença de forma similar, mas não idêntica, ao padrão observado no homem (Brunet et al., 1998).

Quando saem do molusco em que se formaram, as cercárias permanecem nadando na água, onde têm uma expectativa de vida de um ou dois dias. Seu poder infectante, no entanto, cai rapidamente em poucas horas, sendo praticamente nulo ao fim de 8 horas (Pereira, 1997; Rey, 1991).

O contato com o hospedeiro vertebrado parece ocorrer ao acaso, dependendo do tempo de permanência deste no foco (coleção hídrica) e da extensão da superfície corpórea exposta. Entretanto, uma vez estabelecido o contato, a cercária adere à pele por meio de suas ventosas e logo inicia o processo de penetração, que se dá através da ação lítica (glândulas de penetração) e da ação mecânica (movimentos vibratórios intensos) (Pereira, 1997; Rey, 1991).

A penetração na pele dura cerca de 15 minutos e durante este processo a cercária perde a cauda. Em seguida, a larva transforma-se em esquistossômulo e sofre nova reorganização, que altera tanto a sua morfologia como a sua fisiologia. Nesta fase evolutiva, a larva perde seu glicocálix, alonga-se e adquire aspecto vermiforme. O parasito não pode mais viver em meio aquático hipotônico, mas agora resiste ao poder lítico do soro, que é capaz de destruir as cercárias (Pereira, 1997; Rey, 1991).

Depois de permanecerem na pele por tempo variável, entre alguns minutos a um dia inteiro, os esquistossômulos, se não forem destruídos pelos mecanismos de ataque imunológico do hospedeiro, penetram nos vasos cutâneos e, através dos vasos

sangüíneos ou linfáticos, são levados passivamente até o coração direito e, em seguida, aos pulmões, onde também podem ser destruídos ou retidos. A perda da vulnerabilidade ao intenso ataque imunológico, humoral e celular, do hospedeiro parece ocorrer por volta de dois ou três dias após a penetração (Pereira, 1997; Rey, 1991). Em animais de laboratório, infectados experimentalmente, os esquistossômulos podem ser encontrados no pulmão a partir do quarto dia e alcançam concentrações máximas neste órgão por volta do quinto dia (hamster e rato), ou do sexto dia (camundongo), após a infecção. Esta concentração de vermes no pulmão não se explica por simples transporte passivo, desconhecendo-se a razão da demora neste local (Pereira, 1997; Rey, 1991).

Do pulmão, os esquistossômulos vão para o coração esquerdo e daí são enviados pela circulação sistêmica a todas as partes do organismo. Somente quando alcançam o sistema porta intra-hepático, a partir do 8º dia após a penetração, podem completar seu desenvolvimento, não se sabendo como se orientam para isso. O acúmulo de esquistossômulos no fígado atinge o platô depois de 20 a 40 dias, após a invasão cercariana. Dá-se então, aproximadamente 5 semanas após a penetração, o amadurecimento sexual dos machos e o acasalamento, que é indispensável para que as fêmeas completem rapidamente seu próprio desenvolvimento. Nesta fase da doença, o fígado mostra um processo de hepatite que não guarda relações topográficas com a presença de vermes e que se agravará mais tarde, quando começarem a aparecer aí os ovos de *S. mansoni* (Cheever, et al., 2002; Rey, 1991).

Vermes machos e fêmeas, bem unidos, deslocam-se ativamente contra a corrente circulatória do sistema porta, tendo preferência pela veia mesentérica inferior e seus ramos, alcançando muitos dos casais o plexo hemorroidário superior e as áreas vizinhas. No homem, os esquistossomos localizam-se, habitualmente, nas vênulas da parede do reto, do sigmóide e do intestino grosso. Nos animais de laboratório, podem ser encontrados em qualquer região do sistema porta, inclusive na luz da veia porta (Pereira, 1997; Rey, 1991; Cheever & Andrade, 1967).

Em seu hábitat definitivo, a fêmea fecundada começa a por ovos, insinuando-se nas vênulas mais estreitas da mucosa ou da submucosa e enchendo-as de fiadas de ovos, produzidos um a um. A circulação nesses vasos chega a interromper-se, propiciando sua desorganização e a extrusão dos ovos para o tecido circundante.

O *S. mansoni* desloca-se freqüentemente, percorrendo diariamente distâncias relativamente grandes ao longo dos intestinos delgado e grosso de seus hospedeiros, de modo que dispersa consideravelmente os ovos - cerca de três centenas - que produz a

cada dia. Estes ovos imaturos lançados pelas fêmeas na luz dos capilares da mucosa ou da submucosa, seja do reto, seja do sigmóide ou de regiões mais altas do intestino, devem percorrer um caminho, ainda que curto, para chegar até a cavidade intestinal e serem expulsos com as fezes. Os primeiros ovos são vistos nas fezes cerca de 40 dias após a infecção do hospedeiro e, quando caem em local apropriado (corpo hídrico), eclodem dando continuidade ao ciclo (Pereira, 1997; Rey, 1991).

No mesentério, os ovos atravessam as paredes intestinais podendo dar origem a lesões inflamatórias, fibrose e polipose. Os ovos que não migram para a luz intestinal alcançam o fígado, o baço e eventualmente os pulmões, ocasionando também nestes locais lesões inflamatórias. Entretanto, o fígado é o principal órgão alvo durante a infecção. Com o tempo, este órgão acumula um grande número de ovos, cada um dos quais induz ao seu redor uma reação granulomatosa, principal característica histopatológica da doença no fígado (Brunet et al., 1998; Pereira, 1997; Andrade, 1987).

Inicialmente aparecem em torno de cada ovo numerosos macrófagos, seguidos de eosinófilos, linfócitos e alguns plasmócitos. Macrófagos bem unidos, ficam em contato direto com o parasito ou com os restos ovulares, podendo resultar na formação de massas sinciciais multinucleadas, que abarcam total ou parcialmente os ovos mortos e empreendem a digestão lenta dos restos parasitários (Weinstock & Boros, 1983a; Pereira, 1997; Rey, 1991). Neste conjunto reacional, formado quase que exclusivamente por células, com predominância de macrófagos e linfócitos, começam a depositar-se fibras reticulares que se dispõem de modo a formar uma trama ou rede aproximadamente esférica, na periferia do granuloma. Alguns macrófagos (histiócitos) transformam-se em fibroblastos que se orientam igualmente em camadas concêntricas, em toda a espessura do granuloma, e fabricam abundante quantidade de colágeno até que, ao término de sua função, passem a fibrócitos. Na medida em que aumentam os fibroblastos, as demais células vão desaparecendo e, por fim, o granuloma esquistossomótico apresenta-se como cicatriz fibrosa de estrutura lamelar (Cheever, et al., 2002; Rey, 1991).

A simultaneidade do processo inflamatório em torno de muitos ovos e a contínua produção de mais ovos pelos casais de vermes levam os nódulos fibróticos a confluir, formando extensas áreas cicatriciais que, pouco a pouco, vão alterando a arquitetura dos tecidos onde se encontram (Rey, 1991).

1.5.2 – A fase aguda da doença

A inflamação aguda é resposta fisiológica normal do organismo frente a qualquer lesão produzida por parasitos, ou outros agentes patogênicos, e tende a manter a integridade dos tecidos, limitando ou reparando os danos produzidos. A reação de fase aguda é um conjunto de manifestações locais (produção de compostos que causam vasodilatação e edema, bem como migração celular e coagulação) e manifestações gerais (febre, leucocitose, aumento de algumas proteínas plasmáticas, etc) que habitualmente resultam de reações em cascata com a presença no soro das chamadas “proteínas de fase aguda”, sintetizadas pelos hepatócitos em resposta a um sinal produzido pelos macrófagos, no local da inflamação (Rey, 1991).

As manifestações agudas da infecção esquistossomótica em seres humanos geralmente são discretas (Cheever et al., 2002). Humanos infectados pela primeira vez com *S. mansoni*, geralmente desenvolvem manifestações agudas, caracterizadas por febre, mal estar, diarreia, intensa eosinofilia e ocasionalmente, reações alérgicas (Cheever et al., 2002). A penetração das cercárias pode acompanhar-se de exantema, prurido e outras manifestações alérgicas locais. Algumas horas depois, observa-se infiltração de polimorfonucleares ao redor dos parasitos e nas proximidades dos vasos. Mais tarde surgem linfócitos e macrófagos. A reação mantém-se por dois ou três dias e regride, desaparecendo por último os elementos mononucleares. Os fenômenos são mais intensos nas reinfecções e nos indivíduos hipersensíveis. Este mesmo processo pode ter lugar no pulmão durante a migração dos esquistossômulos, ou ao chegarem estes ao fígado. A morte de alguns vermes produz obstrução embólica do vaso e reação inflamatória. A desintegração do parasito costuma provocar necrose do tecido em torno, mais tarde substituída por tecido cicatricial.

Dependendo do número de parasitos e da sensibilidade do paciente, pode desenvolver-se um quadro descrito como forma toxêmica da esquistossomose, que se inicia por volta do 15º ao 25º dia da exposição infectante, quando não existem senão formas juvenis do parasito. Há febre, eosinofilia, linfadenopatia, esplenomegalia e urticária. O fígado mostra um processo de hepatite que não guarda relações topográficas com a presença de vermes e que se agravará mais tarde, quando começarem a aparecer aí os ovos de *Schistosoma* (Cheever et al., 2002; Rey, 1991).

É o acúmulo de ovos do parasito no fígado e em outros órgãos que desencadeia os sintomas mais graves da doença (forma hepatoesplênica), e a menos que o

hospedeiro seja exposto a um grande número de cercárias, a morbidade no período anterior à maturação sexual do parasito é mínima. Assim, a gravidade da doença depende da carga parasitária, enquanto o curso da doença depende do tipo de reações locais e gerais havidas na fase da invasão, das mudanças trazidas pelo amadurecimento dos vermes e pela oviposição que se segue, bem como da maneira como o organismo do hospedeiro reage à presença dos ovos de *Schistosoma* (Rey, 1991; Brunet et al., 1998).

2 – OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a ocorrência de alterações de enzimas hepáticas de biotransformação durante a fase inicial da esquistossomose mansônica, antes da deposição de ovos e do aparecimento de granulomas em larga escala no fígado dos camundongos.

Os objetivos específicos deste estudo foram os seguintes:

- 1) Verificar se ocorrem alterações de conteúdo total de citocromos P450, enzimas da fase I da biotransformação, em camundongos machos e fêmeas, das linhagens *Swiss Webster* (cepa não consanguínea) e DBA/2 (cepa consanguínea que expressa bem CYP2A5), 15 e 30 dias após a infecção com 100 cercárias de *S. mansoni*.
- 2) Verificar se ocorrem alterações de enzimas citocromo P450 das sufamílias 1A, 2A, 2B e 2E, em camundongos machos e fêmeas, das linhagens *Swiss Webster* e DBA/2, 15 e 30 dias após a infecção com 100 cercárias de *S. mansoni*.
- 3) Verificar se ocorrem alterações da atividade das UDP-glicuronosiltransferases (enzimas de fase II da biotransformação), em camundongos machos e fêmeas, das linhagens *Swiss Webster* e DBA/2, 15 e 30 dias após a infecção com 100 cercárias de *S. mansoni*

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos, machos e fêmeas, das linhagens *Swiss Webster* e DBA/2, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL-FIOCRUZ). Este trabalho foi submetido à Comissão de Ética em Uso de Animais da FIOCRUZ (processo nº.: 114-02), e todos os procedimentos que envolveram a manipulação animal foram realizados com base nas normas desta comissão.

Assim que chegaram ao laboratório, os camundongos adultos machos das duas linhagens foram alojados individualmente, e as fêmeas em grupos de cinco, em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco durante uma semana, para aclimatação. Após este período, cada fêmea foi transferida para a gaiola de um macho de sua linhagem para o acasalamento. A partir do 18º dia após o início do cruzamento, os casais de camundongos foram monitorados diariamente para o registro do dia do nascimento da prole. As ninhadas foram desmamadas no 21º dia após o nascimento, quando os filhotes eram separados de seus pais e alojados, em grupos de cinco, em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável, separados por sexo, linhagem e grupo experimental (infectado ou não infectado) ao qual pertenciam.

Todos os animais receberam água de torneira para beber e ração comercial para camundongos (Nuvilab® - Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná) *ad libitum* e foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Toxicologia Ambiental – FIOCRUZ, à temperatura de 23±2 °C, com umidade relativa do ar em torno de 70 % e ciclo claro-escuro constante (período claro de 08 às 20 horas). As trocas das camas de maravalha, ração e água foram realizadas três vezes por semana (segundas, quartas e sextas) pela manhã.

3.2 – Grupos experimentais

Os camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, foram divididos ao acaso em dois grupos:

- 1) grupo morto 15 dias após a infecção, a partir do qual foram constituídos seis *pools* de homogeneizados de fígados de sete filhotes (total de 42 filhotes);

- 2) grupo morto 30 dias após a infecção, a partir do qual foram constituídos seis *pools* de homogeneizados de fígados de três filhotes (total de 18 filhotes).

Cada um destes grupos era composto por animais infectados e seus respectivos controles não infectados, pareados quanto à idade no dia do sacrifício. Os grupos eram compostos, preferencialmente, por animais de ninhadas diferentes.

Os animais do grupo infectado foram expostos a 100 cercárias de *Schistosoma mansoni* no 10º dia de vida e mortos 15 e 30 dias após a infecção. Os controles não infectados, mantidos em condições semelhantes, foram mortos com a mesma idade dos animais dos grupos infectados, ou seja, com 25 e 40 dias de vida.

Desta forma, este estudo foi constituído pelos seguintes grupos experimentais:

Swiss Webster

<u>Infectado macho</u>	<u>Controle macho</u>
- 15 dias de infecção	- 25 dias de vida
- 30 dias de infecção	- 40 dias de vida
<u>Infectado fêmea</u>	<u>Controle fêmea</u>
- 15 dias de infecção	- 25 dias de vida
- 30 dias de infecção	- 40 dias de vida

DBA/2

<u>Infectado macho</u>	<u>Controle macho</u>
- 15 dias de infecção	- 25 dias de vida
- 30 dias de infecção	- 40 dias de vida
<u>Infectado fêmea</u>	<u>Controle fêmea</u>
- 15 dias de infecção	- 25 dias de vida
- 30 dias de infecção	- 40 dias de vida

3.3 – Infecção

As cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa BH, Brasil) utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz, da Fundação Oswaldo Cruz, que mantém a cepa em seus laboratórios.

Os caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados com miracídios originários de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de camundongos *Swiss Webster* infectados, são mantidos em aquários e expostos à luz artificial para a liberação das cercárias. Um certo volume de água contendo grande quantidade de cercárias foi transportado para o laboratório de Toxicologia Ambiental, onde a infecção dos animais do grupo infectado teve lugar.

Os camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, no 10º dia de vida, foram separados da mãe e colocados em placas de *Petri* de plástico, com 3 ml de água destilada contendo 100 cercárias de *S. mansoni*. Além da cauda, toda a parte ventral do camundongo permaneceu exposta às cercárias. Após 20 minutos de exposição, os lactentes foram devolvidos à mãe e a água de cada placa de *Petri* foi examinada ao estereomicroscópio (OLYMPUS® SZX-12) para contagem das cercárias que não penetraram e determinação do índice de penetração. Foram utilizados neste estudo somente animais cujo índice de penetração foi maior ou igual a 97%.

Todo o período de exposição ocorreu sob iluminação artificial fornecida por lâmpada de tungstênio (60 W) de modo que os filhotes e a água contendo as cercárias permaneceram aquecidos.

3.4 – Sacrifício e armazenamento dos órgãos

Os camundongos infectados foram mortos 15 e 30 dias após a infecção. Os animais controles foram mortos com a mesma idade dos animais infectados, ou seja, com 25 e 40 dias de vida. Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Imediatamente após o sacrifício, foi feita uma ampla incisão longitudinal e outra transversal na parede abdominal do animal sendo o fígado rapidamente retirado e pesado em banho de gelo. Os fígados foram embalados individualmente em papel alumínio, congelados e armazenados em nitrogênio líquido até o momento da preparação da fração microsomal.

3.5 - Preparação da fração microsomal

Os fígados congelados foram retirados do reservatório de nitrogênio líquido e colocados, ainda embalados, em placas de *Petri* para descongelar em banho de gelo. A partir deste momento, todo o procedimento ocorreu à temperatura entre 0 e 4°C.

Após o descongelamento e antes da homogeneização, foram constituídos *pools* de sete fígados, para os grupos mortos 15 dias após a infecção, e *pools* de três fígados para os grupos mortos 30 dias após a infecção. Os órgãos foram lavados em solução de sacarose 250 mM, secos em papel filtro, pesados em banho de gelo e transferidos para homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. A primeira homogeneização (1 parte de *pool* de fígados : 4 partes de solução de sacarose 250 mM) foi feita através de movimentos ascendentes e descendentes do homogeneizador e respectivo pistilo de teflon a uma velocidade angular de aproximadamente 1200 rpm. A partir do momento em que foi constatada visualmente a homogeneização do tecido, foram realizados 10 ciclos adicionais de movimentos ascendentes e descendentes para garantir uma adequada homogeneização.

O homogeneizado obtido foi transferido para tubos de centrifuga e centrifugado a 9000 g e a 4 °C durante 30 minutos (Centrifuga refrigerada Eppendorf ® 5804R). O sobrenadante foi então filtrado em gaze e submetido à ultracentrifugação a 100.000 g durante 60 minutos a 4 °C (Ultracentrifuga Hitachi ® CP70MX).

Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo a fração microsomal foi ressuspensionado em solução tampão (solução de tris-HCl 100 mM / KCl 150 mM, pH 7,4) e novamente homogeneizado, através de movimentos ascendentes e descendentes do homogeneizador e pistilo, a uma velocidade angular de aproximadamente 250 rpm. A partir do momento em que foi constatada visualmente a homogeneização do *pellet*, foram realizados mais 10 ciclos de movimentos ascendentes e descendentes.

O homogeneizado obtido foi novamente ultracentrifugado a 100.000 g durante 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante desta segunda ultracentrifugação foi desprezado e o *pellet* contendo a fração microsomal foi ressuspensionado em solução tampão própria para congelamento (solução tampão fosfato de potássio 100 mM com 20% v/v de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4), completando um volume final de 4 ml, e homogeneizado a 250 rpm. A fração microsomal assim obtida foi dividida em alíquotas, distribuídas em criotubos devidamente identificados, e armazenada em nitrogênio líquido.

3.6 – Determinação da concentração de proteínas totais na fração microsomal

A concentração de proteínas totais na preparação microsomal foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Bradford et al., (1976), utilizando a albumina sérica bovina como proteína padrão, o corante Azul de Coomassie G-250 e leitura de densidade ótica (DO) a 595 nm (espectrofotômetro Shimadzu ® UV- 1601). Todas as leituras de DO foram realizadas em cubetas de plástico descartáveis.

As curvas de calibração foram realizadas com albumina sérica bovina – BSA *Sigma Chemical Co* – diluída em solução tampão fosfato (KH_2PO_4 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2) de modo a obter as seguintes concentrações de proteína: 70; 140; 350; 700 e 1400 $\mu\text{g/ml}$. A curva padrão foi obtida da seguinte maneira: 3 ml do corante Azul de Coomassie G-250, foram adicionados a tubos de ensaio contendo 100 μl das diferentes concentrações de BSA. A formação do complexo proteína-corante é rápida e estável no período de 5 a 60 minutos. Por isso, foi adotado um intervalo constante de aproximadamente 30 minutos entre a adição do corante às proteínas diluídas e a leitura da absorbância. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

Para a determinação da concentração de proteínas totais na fração microsomal, as amostras foram diluídas 1:20 em solução tampão KH_2PO_4 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2. Foram adicionados 3 ml do corante a tubos – em duplicata – contendo uma mistura de 50 μl da solução diluída da preparação microsomal e 50 μl da mesma solução tampão, completando um volume final de 100 μl . Da mesma forma, foram adicionados 3 ml do corante a outros tubos, também em duplicata, contendo 100 μl da mesma solução diluída da preparação microsomal.

Cada valor de DO obtido foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão obtida no mesmo dia da análise. Feitas as correções para cada fator de diluição, as concentrações de proteína na fração microsomal foram calculadas como a média obtida (média final) a partir das médias de cada duplicata e expressas como mg de proteína / ml de preparação microsomal.

3.7 – Quantificação dos níveis totais de citocromos P450

A quantificação de citocromos P450 totais na fração microsomal foi realizada segundo o método descrito por Omura & Sato (1964). O princípio do método baseia-se

na capacidade de ligação da hemeproteína reduzida ao monóxido de carbono, apresentando um espectro de absorção característico com a absorção máxima em 450 nm.

A fração microsomal foi descongelada em banho de gelo, imediatamente antes da análise, e diluída com uma solução tampão fosfato de potássio 100 mM com glicerol 20% v/v pH 7,4, de modo a alcançar a concentração de 1 mg de proteínas microsomais / ml. A solução diluída foi mantida - a partir de então e até o momento das determinações - em banho de gelo.

À preparação microsomal diluída foi adicionada, com o auxílio de uma espátula, uma pequena quantidade de ditionito de sódio sólido ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), suficiente para reduzir o citocromo P450 das amostras. Foram adicionados 2 ml das amostras reduzidas às cubetas de referência e da amostra e, em seguida, a diferença das absorbâncias medidas nas duas cubetas (de referência e da amostra) foram corrigidas através do ajuste da linha de base. Esta correção foi feita para cada leitura.

A cubeta contendo a amostra foi então levemente borbulhada com monóxido de carbono por 1 minuto. Em seguida foi registrada a diferença de espectro de absorção entre 400 e 500 nm na cubeta da amostra (cubeta com solução de microsomos, ditionito de sódio e monóxido de carbono) e na cubeta de referência (cubeta com solução de microsomos e ditionito de sódio, apenas).

Para a determinação das concentrações de citocromos P450 totais, foram utilizadas cubetas de quartzo e espectrofotômetro Shimadzu ® UV160, em modo de varredura de 400 a 500 nm. O resultado obtido corresponde a média \pm DP de três leituras.

Os resultados (picomol / mg proteína microsomal) foram calculados a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\Delta A (450-490) \text{ nm} \times 1000 \times \text{vol. da amostra microsomal (ml)} + \text{vol. do tampão (ml)}}{X \quad 91 \quad \text{vol. da amostra microsomal (ml)}}$$

Onde:

$\Delta A (450 - 490) \text{ nm}$ = diferença entre a absorção máxima e a linha de base a 490 nm

X = concentração de citocromo P450 na fração microsomal

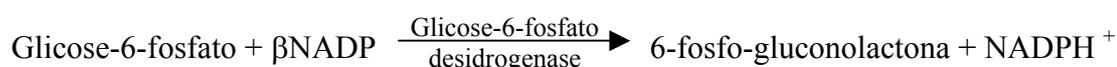
91 = Coeficiente de extinção determinado por Omura & Sato (1964), $91 \text{ cm}^2 / \text{nmol}$

3.8 – Determinação de atividades de isoenzimas citocromo P450 na fração microssomal hepática

3.8.1 - Determinação das atividades das alcoxioresorufinas-*O*-desalquilases: Etoxioresorufina-*O*-desetilase (EROD), Metoxioresorufina-*O*-desmetilase (MROD), Benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) e Pentoxioresorufina-*O*-despentilase (PROD)

Uma série de éteres da fenoxazona (*e.g.*, etoxioresorufina, metoxioresorufina, benziloxioresorufina e pentoxioresorufina) funcionam como substratos para reações de *O*-desalquilação mediadas por isoenzimas citocromo P450. Estes éteres da fenoxazona (alcoxioresorufinas) são substratos preferenciais para determinadas isoformas de citocromo P450. Assim, etoxioresorufina e metoxioresorufina parecem ser metabolizadas preferencialmente por isoenzimas da subfamília 1A, enquanto que isoenzimas da subfamília 2B parecem estar envolvidas na *O*-desalquilação da pentoxioresorufina e benziloxioresorufina (Parkinson, 2001; Nims & Lubet, 1996; Nerurkar et al., 1993). Estas reações, catalisadas por diferentes isoformas de CYP resultam na hidroxilação do anel da fenoxazona, levando à formação da hidroxifenoxazona ou resorufina, produto fluorescente comum a todas estas reações, que pode ser quantificado por espectrofluorimetria.

A determinação das atividades das alcoxioresorufina-*O*-desalquilases na fração microssomal foi realizada essencialmente como descrito por Burke et al., (1985), exceto pela substituição do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido) por um sistema regenerador de NADPH que funciona como co-fator para várias reações de biotransformação. O sistema regenerador de NADPH empregado envolve o uso da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que catalisa a reação entre a glicose-6-fosfato e o β NADP, produzindo a 6-fosfo-gluconolactona e o NADPH reduzido, como pode ser observado no esquema abaixo:



A determinação das atividades de EROD, MROD, BROD e PROD na fração microssomal hepática foi realizada como descrito a seguir:

As reações de *O*-desalquilação ocorreram em cubetas de quartzo no interior do espectrofluorímetro Shimadzu ® RF-5301 PC acoplado a um computador que dispunha de um Software que permitia monitorar, ao longo da reação, o acúmulo de resorufina (excitação 550 nm e emissão 582 nm; abertura da fenda, 5 nm; sensibilidade baixa). O espectrofluorímetro estava acoplado também a um banho-maria com bomba de circulação externa (banho termostático Shimadzu ® TB-85), de modo que era possível manter a temperatura na cubeta constante em 37 °C durante toda a reação.

Foram adicionados à cubeta de quartzo:

- solução tampão K₂HPO₄ 100 mM pH 7,8, em quantidade necessária para completar o volume final de 2000 µl;
- 10 µl do substrato específico (etoxiresorufina, metoxiresorufina, benziloxiresorufina ou pentoxiresorufina 1 mM em DMSO), que atingiam a concentração final de 5 µM na cubeta;
- preparação microsomal em volumes variáveis;
- sistema regenerador de NADPH (glicose-6-fosfato 5 mM; β-NADP 0,25 mM; solução de MgCl₂ 2,5 mM; glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,25 U/ml).

Após cinco minutos de pré-incubação da solução tampão a 37 °C, microsomos e substrato foram adicionados à cubeta para um período adicional de pré-incubação de 2 minutos. Transcorridos os sete minutos iniciais, a reação enzimática foi iniciada pela introdução do sistema regenerador de NADPH.

A reação foi monitorada durante setenta segundos e os valores da intensidade de fluorescência foram registrados. A correspondência entre intensidade de fluorescência e a quantidade de resorufina produzida (obtida através da curva padrão), foi utilizada para o cálculo da velocidade da reação (picomoles de resorufina produzida / mg de proteína na fração microsomal / minuto de reação).

Todas as determinações foram realizadas em triplicata para cada alíquota da fração microsomal, com aceitação de um coeficiente de variação máximo de 10%.

As curvas padrão foram construídas com diferentes quantidades de resorufina, obtidas a partir da diluição de uma solução de resorufina 1 µM em tampão fosfato K₂HPO₄ 100 mM pH 7,8. Volumes variáveis contendo diferentes quantidades de resorufina e da solução tampão, em volume suficiente para completar o volume final de 2 ml, foram introduzidos à cubeta. A intensidade de fluorescência correspondente a cada quantidade de resorufina foi registrada para a construção da curva padrão. As

quantidades de resorufina na cubeta empregadas para construir a curva padrão foram: 0; 10; 20; 50; 100 e 200 picomoles.

3.8.2 - Determinação da atividade da Cumarina-7-hidroxilase (COH)

A hidroxilação da cumarina produz a 7-hidroxicumarina, ou umbeliferona, que pode ser quantificada por espectrofluorimetria. A principal isoenzima citocromo P450 responsável por esta reação em fígado de camundongos parece ser a CYP2A5 (Parkinson, 2001; Honkakoski et al., 1992). A determinação da atividade da cumarina 7-hidroxilase foi realizada como descrito por Iersel et al., (1994) e Greenlee & Poland (1978), com algumas modificações.

Foram adicionados a tubos (em triplicata), mantidos em banho de gelo, as seguintes substâncias: 100 µl de tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4; água destilada na quantidade necessária para completar o volume final de 1 ml; 10 µl de uma solução de cumarina 1 mM em metanol, correspondendo à concentração final de 10 µM e volume da fração microssomal que continha 0,5 mg de proteína. Os tubos foram pré-incubados por 3 minutos a 37 °C em banho-maria (banho com agitação Heto ® Master Shake) com agitação constante de 80 movimentos por minuto. Após 3 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de 55 µl de uma solução contendo o sistema regenerador de NADPH (β -NADP 0,5 mM; glicose-6-fosfato 10 mM; glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U / ml e MgCl₂ 10 mM).

A reação ocorreu durante 10 minutos e foi interrompida com a adição de 100 µl de HCl 2 N. Cessada a reação, cada tubo foi novamente levado ao banho de gelo para a adição de 2 ml de clorofórmio – em capela química com exaustão – para a extração da umbeliferona. A separação das fases ocorreu durante aproximadamente 20 minutos e 1 ml da fase orgânica (inferior) foi, cuidadosamente, retirado com auxílio de uma micropipeta e transferido para outro tubo previamente gelado, contendo 1,5 ml de uma solução tampão com glicina 0,5 M e NaOH 0,01 N pH 10,5. Os tubos foram levados ao vórtex para agitação e retornaram novamente ao banho de gelo onde permaneceram quiescentes por aproximadamente 10 minutos para nova separação de fases. A fase alcalina (superior) foi retirada e transferida para tubos tipo *ependorf* com capacidade para 1,5 ml.

Imediatamente antes da leitura da intensidade de fluorescência, o conteúdo dos tubos *ependorfs* foi diluído 1:4 em solução tampão com glicina 0,5 M e NaOH 0,01 N

pH 10,5 e a fluorescência, correspondente à umbeliferona formada nas amostras, foi medida em espectrofluorímetro Shimadzu ® RF-5301 PC, com excitação a 368 nm, emissão a 465 nm e abertura de fenda igual a 3 nm. O volume final na cubeta da mistura da solução de umbeliferona, obtida a partir da reação e solução tampão com glicina 0,5 M e NaOH 0,01 N pH 10,5, foi de 2 ml.

As curvas padrão foram construídas a partir de uma solução de umbeliferona 1 µM em solução tampão com glicina 0,5 M e NaOH 0,01 N pH 10,5. Diferentes alíquotas da solução de umbeliferona 1 µM foram adicionadas à cubeta, bem como volumes da solução tampão com glicina 0,5 M e NaOH 0,01 N pH 10,5 para completar 2 ml na cubeta. As quantidades de umbeliferona adicionadas à cubeta para construir a curva padrão foram 0; 5; 10; 50; 100; 250 e 500 picomoles.

Os resultados obtidos correspondem à média de dois ensaios, sendo que em cada ensaio as determinações para cada *pool* foram avaliadas em triplicata, perfazendo um total de 6 determinações para cada *pool*. A atividade de CoH foi expressa como picomoles de umbeliferona / mg de proteína / minuto de reação.

Cubetas de quartzo foram utilizadas tanto para realização da curva padrão quanto para a leitura das amostras.

3.8.3 - Determinação da atividade da Nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d)

A desmetilação da nitrosodimetilamina produz o formaldeído, que pode ser quantificado por espectrofotometria. A principal isoenzima citocromo P450 responsável por esta reação em fígado de camundongos parece ser a CYP2E1 (Sipes & Gandolfi, 1991; Yang et al., 1991). A determinação da atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase foi realizada como descrito por Yong & Yang (1983), com algumas modificações.

Foram adicionados a tubos (em triplicata), mantidos em banho de gelo, as seguintes substâncias: 200 µl de tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4; água destilada em quantidade necessária para completar o volume final de 2 ml; 10 µl de uma solução de Nitrosodimetilamina 80 mM, correspondendo à concentração final de 0,4 mM (exceto ao branco), 100 µl de solução de KCl 3M e volume da fração microsomal que continha 1 mg de proteína. Os tubos foram pré-incubados por 2 minutos a 37 °C em banho-maria (banho com agitação Heto ® Master Shake) com agitação constante de 80 movimentos

por minuto. Após 2 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de 102 µl de uma solução contendo o sistema regenerador de NADPH (β -NADP 0,4 mM; glicose-6-fosfato 10 mM; glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U / ml e $MgCl_2$ 10 mM).

A reação ocorreu durante 30 minutos e foi interrompida com a adição de 500 µl de $ZnSO_4$ 25%, inclusive ao tubo contendo o branco da reação. Cessada a reação, cada tubo foi homogeneizado em vortex e levado novamente ao banho de gelo. Aproximadamente 15 minutos após o término da reação, foram adicionados a todos os tubos 500 µl de $Ba(OH)_2$ saturado. Os tubos foram novamente homogeneizados em vortex e levados de volta ao banho de gelo, onde permaneceram quiescentes por aproximadamente 15 minutos. Transcorridos os 15 minutos, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm e a 4°C (Centrífuga refrigerada Eppendorf ® 5804R) por 15 minutos. Após a centrifugação, 1 ml do sobrenadante foi transferido para tubos previamente gelados aos quais foram adicionados 2 ml do reagente de Nash (Nash, 1953) recém-preparado (acetato de amônio 2 M, ácido acético 0,05 M e acetilacetona 0,02 M). Os tubos foram então bem fechados e levados ao banho a 50 °C por 30 minutos (banho ultratermostático Fanem ® modelo 116).

Após o resfriamento, as soluções foram levadas à leitura de densidade ótica (DO) contra o branco a 412 nm (espectrofotômetro Shimadzu ® UV- 1601). Todas as leituras de DO foram realizadas em cubetas de plástico descartáveis.

As curvas padrão foram construídas a partir de uma solução de formaldeído 0,1 mM. Diferentes alíquotas da solução de formaldeído 0,1 mM foram adicionadas a tubos em triplicata (exceto ao branco), bem como volumes de água destilada para completar o volume final de 2 ml em todos os tubos, aos quais foram adicionados, inclusive ao branco, 2 ml do reagente de Nash recém-preparado (acetato de amônio 2 M, ácido acético 0,05 M e acetilacetona 0,02 M). Os tubos foram então muito bem fechados e levados ao banho a 50 °C por 30 minutos (banho ultratermostático Fanem ® modelo 116). Após o resfriamento dos tubos, a densidade ótica (DO) das soluções foi lida contra o branco a 412 nm (espectrofotômetro Shimadzu ® UV- 1601). As quantidades de formaldeído, nos tubos, empregadas para construir a curva padrão foram as seguintes: 2; 4; 8; 20 e 40 nanomoles. Todas as leituras de DO foram realizadas em cubetas de plástico descartáveis.

Os resultados obtidos são a média de dois ensaios, sendo que em cada ensaio as determinações para cada *pool* foram avaliadas em triplicata, perfazendo um total de 6

determinações para cada *pool*. A atividade de NDMA-d foi expressa como picomoles de formaldeído / mg de proteína / minuto.

3.9 - Determinação da atividade da Uridinadifosfato-glicuronosiltransferase (UGT)

A atividade da UGT, uma das principais enzimas de fase II da biotransformação, pode ser quantificada pela reação de glicuronidação do *p*-nitrofenol, que produz o glicuronato de *p*-nitrofenol. O *p*-nitrofenol não conjugado pode ser quantificado por espectrofotometria, e a partir do valor de DO registrado, a quantidade de glicuronato de *p*-nitrofenol produzido pode ser obtida através de cálculos que utilizam o coeficiente de extinção do *p*-nitrofenol descrito por Martin & Black (1994).

Segundo Martin & Black (1994), a UGT, que utiliza como co-substrato o ácido uridinadifosfoglicurônico (UDPGA), tem a atividade aumentada de 2 a 5 vezes quando os microsossomos são tratados com detergentes. Uma ativação ótima da UGT parece ocorrer em concentrações relativamente baixas de detergente (entre 0,01 e 0,15%).

Neste estudo, o ensaio foi realizado utilizando o detergente Triton X-100, como descrito por Bock et al., (1983), com algumas modificações.

Foram adicionados a tubos (em triplicata), mantidos em banho de gelo, as seguintes substâncias: 50 µl de Tris 1M pH 7,4; água destilada em quantidade suficiente para completar o volume final de 0,5 ml; 20 µl de Triton X-100 0,25%; 100 µl da fração microsossomal diluída de forma a obter 0,1 mg de proteínas em cada tubo; 50 µl da solução de *p*-nitrofenol 5 mM (exceto ao branco), correspondendo à concentração final de 0,5 mM e 50 µl de solução de MgCl₂ 50 mM. Além dos tubos em triplicata para cada amostra e do branco, foi incluído também um tubo de referência que recebeu todas as soluções, inclusive o *p*-nitrofenol.

Os tubos foram pré-incubados por 2 minutos a 37 °C em banho-maria (banho com agitação Heto ® Master Shaker) com agitação constante de 80 movimentos por minuto. Após 2 minutos de pré-incubação, a reação foi iniciada pela adição de 50 µl de UDPGA 30 mM, exceto ao branco e à referência. A reação ocorreu durante 30 minutos e foi interrompida com a adição de 1 ml de ácido tricloroacético 5 %. Cessada a reação, os tubos foram centrifugados a 2500 rpm e a 4 °C por 30 minutos para precipitação das proteínas (Centrífuga refrigerada Eppendorf ® 5804R). Após a centrifugação, 1 ml do sobrenadante foi transferido para outros tubos, aos quais foram adicionados 250 µl de

solução de NaOH 2 M. A densidade ótica (DO) das soluções foi lida contra o branco a 405 nm (espectrofotômetro Shimadzu ® UV- 1601). Da mesma forma, a referência foi lida contra o branco e a diferença de absorvância entre a referência e as amostras foi utilizada para o cálculo da concentração de glicuronato de ρ -nitrofenol, através do coeficiente de extinção do ρ -nitrofenol e da fórmula que se segue:

$$A = a c l$$

onde:

A = absorvância

a = coeficiente de extinção do ρ -nitrofenol ($14,9 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

c = concentração de glicuronato de ρ -nitrofenol

l = caminho ótico

Todas as leituras de DO foram realizadas em cubetas de plástico descartáveis.

Os resultados são a média das triplicatas, perfazendo um total de 3 determinações para cada *pool*. A atividade de UGT foi expressa como nmoles de glicuronato de ρ -nitrofenol / mg de proteína / minuto.

3.10 – Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi feito pela análise de variância de uma via (ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, quando os dados não se ajustavam a uma curva de distribuição normal. A existência de diferenças significativas entre dois grupos, foi estabelecida pelo teste *t* de Student para amostras independentes (*i.e.*, não-pareadas) ou, no caso de dados não-paramétricos, pelo teste *U* de Mann-Whitney. Os testes foram sempre bilaterais (*i.e.*, bicaudais) e foi respeitado, em todos os casos, o limite máximo de comparações estabelecido pelos graus de liberdade das análises de variância paramétrica ou não-paramétrica. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa estatístico MINITAB ® (MTB, University of Pensilvania, 1995).

4 – RESULTADOS

4.1 – Índice de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2* no 10º dia de vida

A eficiência da infecção nos camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, no 10º dia de vida foi avaliada através da determinação da taxa de penetração de cercárias nestes animais.

Como descrito anteriormente na Metodologia (seção 3.3), cada animal do grupo infectado foi exposto a 100 cercárias de *S. mansoni* em 3 mL de água destilada contidos em placa de *Petri*, por vinte minutos. Em seguida, o conteúdo da placa de *Petri* foi examinado ao estereomicroscópio para contagem das cercárias íntegras que restavam, ou seja, as que não penetraram nos animais. Desta forma, era obtido o índice (percentual) de penetração.

Confirmando o que é descrito na literatura, e o que havíamos observado em estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, o índice de penetração das cercárias foi bastante elevado, demonstrando a alta eficiência do parasito em penetrar através da pele do hospedeiro definitivo. Em ambos os sexos e nas duas linhagens de camundongos, o índice de penetração variou de 97 a 100 %. Nenhuma diferença estatisticamente significativa quanto ao índice de penetração foi observada entre os sexos ou entre as linhagens de camundongos, como pode ser observado na tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Índice de penetração (IP-%) de cercárias de *Schistosoma mansoni* em camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, durante 20 minutos por via percutânea.

Tempo pós- infecção:	<i>Swiss Webster</i>		<i>DBA/2</i>	
	15 dias*	30 dias**	15 dias*	30 dias**
Macho	99 (97 - 100)	100 (99 - 100)	100 (99 - 101)	100 (98 - 101)
Fêmea	100 (98 - 100)	100 (99 - 101)	100 (99 - 100)	99 (97 - 100)

Valores apresentados como mediana e, entre parênteses, valores mínimo e máximo da percentagem de cercárias que penetraram nos camundongos. O IP(%) foi analisado pelo Kruskal-Wallis, que não revelou diferenças entre os grupos ($p>0,05$). *n=42 por grupo; **n=18 por grupo.

4.2 – Alterações do peso do corpo e do fígado nos camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*

Como descrito na Metodologia (seção 3.2), camundongos machos e fêmeas, das duas linhagens, foram infectados com 10 dias de vida. Estes animais foram destinados, aleatoriamente, a dois grupos: um morto 15 dias após a infecção e outro, 30 dias após a infecção. O experimento incluiu também grupos de animais controles não infectados, pareados quanto à idade no dia do sacrifício.

O peso corporal de cada animal foi registrado, inicialmente, no dia da infecção, quando os animais tinham 10 dias de vida (peso na infecção), e no dia do sacrifício, 15 e 30 dias após a infecção, quando os animais tinham, respectivamente, 25 e 40 dias de vida (peso no sacrifício).

Como pode ser observado na tabela 4.2, os pesos corporais no dia da infecção foram razoavelmente homogêneos, não diferindo estatisticamente entre os grupos infectados e seus respectivos controles. Também não foram detectadas diferenças entre os sexos, assim como entre as duas linhagens.

Tabela 4.2 – Peso corporal (g) de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, no dia da infecção (10 dias de vida).

Tempo pós- infecção:	<i>Swiss Webster</i>		<i>DBA/2</i>	
	15 dias*	30 dias**	15 dias*	30 dias**
CM	5,46±0,39	5,36±0,81	5,12±0,41	5,19±0,33
IM	5,59±0,44	5,43±0,58	5,13±0,86	5,18±0,54
CF	5,11±0,61	5,05±0,64	4,99±0,72	4,96±0,39
IF	5,09±0,44	4,99±0,89	5,06±0,90	4,91±0,66

Valores apresentados como média ± DP dos pesos dos camundongos de cada grupo (CM = controle macho; IM = infectado macho; CF = controle fêmea e IF = infectado fêmea). Os pesos corporais foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). *n=42 por grupo; **n=18 por grupo.

Os pesos corporais dos camundongos machos e fêmeas, dos grupos controle e infectado das duas linhagens, registrados no dia do sacrifício são apresentados na tabela 4.3. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os animais infectados e seus respectivos controles. Em relação ao sexo, foi notada uma clara

diferença entre os controles machos e fêmeas das duas linhagens 15 e 30, dias após a infecção. Como esperado, em virtude do crescimento, no dia do sacrifício os animais do mesmo sexo e linhagem, mortos com 40 dias de vida, foram cerca de duas vezes mais pesados que aqueles mortos com 25 dias de vida. A diferença entre os controles não infectados *Swiss Webster* e DBA/2 foi estatisticamente significativa para machos e fêmeas, sendo os DBA/2 bem mais leves que os *Swiss Webster* da mesma idade. Como os pesos corporais de *Swiss Webster* e DBA/2 não diferiram aos 10 dias de vida (tabela 4.2), estes resultados mostram que a linhagem consangüínea DBA/2 ganha peso muito mais lentamente do que os *Swiss Webster*.

Tabela 4.3 – Peso corporal (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, no dia do sacrifício (15 e 30 dias após a infecção).

Tempo pós- infecção:	<i>Swiss Webster</i>		DBA/2	
	15 dias*	30 dias**	15 dias*	30 dias**
CM	16,25±0,99	32,97±1,37 ^c	8,96±0,81 ^d	15,58±1,59 ^{cd}
IM	16,39±0,92	33,39±2,09	8,89±0,92	15,07±1,41
CF	14,98±0,93 ^b	28,56±1,09 ^{bc}	8,05±0,81 ^{bd}	13,56±1,66 ^{bcd}
IF	14,99±0,99	28,81±1,05	8,27±1,12	14,35±1,80

Valores apresentados como média ± DP dos pesos dos camundongos de cada grupo (CM = controle macho; IM = infectado macho; CF = controle fêmea e IF = infectado fêmea). *n=42 por grupo; **n=18 por grupo. Os pesos corporais foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores que diferiram estatisticamente entre os diferentes grupos ($p < 0,05$) estão assinalados com as letras *a*, *b*, *c* e *d*. (*a* - diferenças entre infectados e seus respectivos controles não infectados; *b* - diferenças entre controles machos e fêmeas; *c* - diferenças entre controles com 25 e 40 dias de vida no momento do sacrifício e *d* - diferenças entre controles *Swiss Webster* e DBA/2 do mesmo sexo e da mesma idade no dia do sacrifício).

Os dados da tabela 4.4 mostram que, nesta etapa inicial da evolução da esquistossomose, a infecção não alterou o ganho de peso dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, de ambos os sexos. O ganho de peso dos camundongos controles não infectados, de ambas as linhagens, foi estatisticamente diferente entre os sexos (maior entre os machos), exceto para os *Swiss Webster* do grupo de 15 dias pós-infecção. A partir do 10º dia de vida, camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, ganharam ao longo de 30 dias aproximadamente 2,5 vezes mais peso do que ganharam durante o período de 15 dias. Também foi clara a diferença de ganho de peso entre os animais de linhagens diferentes, do mesmo sexo e com a mesma idade. De forma geral,

em período equivalente, os camundongos *Swiss Webster* apresentaram um ganho de peso 2,7 vezes maior do que os camundongos DBA/2.

Tabela 4.4 – Ganho de peso corporal (Δp , g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados entre os dias de infecção (dia 10 de vida) e de sacrifício (15 e 30 dias após a infecção).

Tempo pós- infecção	<i>Swiss Webster</i>		DBA/2	
	15 dias*	30 dias**	15 dias*	30 dias**
CM	10,8±1,98	27,61±3,58 ^c	3,94±0,29 ^d	10,59±1,56 ^{cd}
IM	10,8±0,97	27,96±3,72	3,77±0,52	10,09±1,14
CF	9,87±1,03	23,51±2,93 ^{bc}	3,06±0,29 ^{bd}	8,60±0,98 ^{bcd}
IF	9,9±0,99	23,82±4,51	3,21±0,86	9,44±1,28

Valores apresentados como média \pm DP dos ganhos de peso (Δp) dos camundongos de cada grupo (CM = controle macho; IM = infectado macho; CF = controle fêmea e IF = infectado fêmea). *n=42 por grupo; **n=18 por grupo. Os Δp s foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores que diferiram estatisticamente entre os diferentes grupos ($p < 0,05$) estão assinalados com as letras *a*, *b*, *c* e *d*. (*a* - diferenças entre infectados e seus respectivos controles não infectados; *b* - diferenças entre controles machos e fêmeas; *c* - diferenças entre controles com 25 e 40 dias de vida no momento do sacrifício e *d* - diferenças entre controles *Swiss Webster* e DBA/2 do mesmo sexo e da mesma idade no dia do sacrifício).

Da mesma forma que a infecção não alterou o ganho de peso dos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, dos dois sexos, ao longo de 15 e 30 dias após a infecção, o peso do fígado destes animais também não foi alterado nesta fase inicial da doença (esquistossomose mansônica). Com relação a possíveis diferenças entre os sexos, o peso do fígado dos camundongos controles machos não infectados, de ambas as linhagens e idades, foi ligeiramente maior do que o peso do fígado das fêmeas. O peso do fígado dos camundongos mortos 30 dias após a infecção (40 dias de vida) foi cerca de 2 vezes maior do que o peso do fígado dos que foram mortos 15 dias após a infecção (25 dias de vida), o que traduz as diferenças de idade e tamanho entre os animais. Em virtude das diferenças de tamanho e peso corporal, o fígado dos camundongos DBA/2 foram aproximadamente 2 vezes menores do que aqueles dos camundongos *Swiss Webster* do mesmo peso e idade. Os pesos do fígado dos animais são apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Peso do fígado (g) de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, no dia do sacrifício (15 e 30 dias após a infecção).

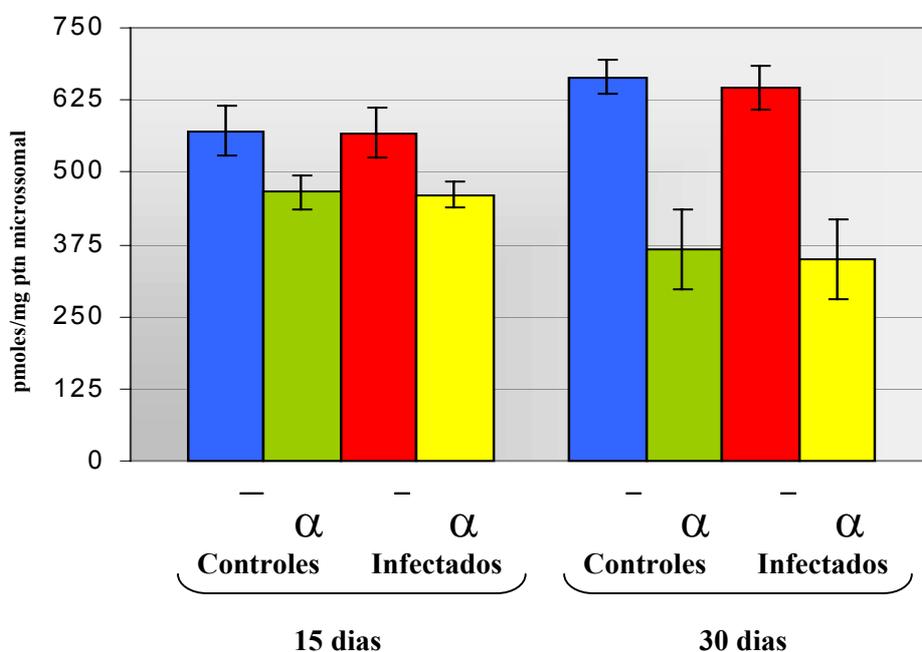
Tempo pós- infecção	<i>Swiss Webster</i>		DBA/2	
	15 dias*	30 dias**	15 dias*	30 dias**
CM	0,95±0,096	1,88±0,046 ^c	0,46±0,022 ^d	0,98±0,062 ^{cd}
IM	0,87±0,042	1,90±0,034	0,46±0,029	0,99±0,056
CF	0,87±0,042 ^b	1,72±0,14 ^{bc}	0,42±0,015 ^{bd}	0,89±0,028 ^{bcd}
IF	0,85±0,13	1,79±0,033	0,42±0,011	0,89±0,025

Valores apresentados como média ± DP do peso dos fígados dos camundongos de cada grupo (CM = controle macho; IM = infectado macho; CF = controle fêmea e IF = infectado fêmea). *n=42 por grupo; **n=18 por grupo. Os pesos dos fígados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores que diferiram estatisticamente entre os diferentes grupos ($p < 0,05$) estão assinalados com as letras *a*, *b*, *c* e *d*. (*a* - diferenças entre infectados e seus respectivos controles não infectados; *b* - diferenças entre controles machos e fêmeas; *c* - diferenças entre controles com 25 e 40 dias de vida no momento do sacrifício e *d* - diferenças entre controles *Swiss Webster* e DBA/2 do mesmo sexo e da mesma idade no dia do sacrifício).

4.3 – Alterações dos níveis totais de citocromos P450 no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni*

Como pode ser observado no gráfico 4.1, na fase inicial da esquistossomose (15 e 30 dias após a infecção), os níveis totais de citocromos P450 em camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, não foram alterados. Machos *Swiss Webster* controles e infectados apresentaram, 15 dias após a infecção, concentrações totais de CYP450 da ordem de 571,3±42,4 e 567,8±52,2 pmoles/mg de proteína microssomal ($p > 0,05$), respectivamente. Já as fêmeas controles e infectadas desta mesma linhagem e desta mesma idade, apresentaram concentrações de CYP450 totais da ordem de 465,8±38,7 e 461,0±42,9 pmoles/ mg de proteína microssomal ($p > 0,05$), respectivamente. Posteriormente, 30 dias após a infecção, os níveis totais de CYP450 nos camundongos machos e fêmeas também não diferiram entre controles e infectados ($p > 0,05$). Machos controles e infectados apresentaram concentrações totais de CYP450 da ordem de 664,7±59,2 e 646,0±39,4 pmoles/mg de proteína microssomal ($p > 0,05$), respectivamente. Já para as fêmeas controles, estes valores foram de 366,7±78,9 e para as infectadas, 349,7±72,3 pmoles/ mg proteína microssomal ($p > 0,05$).

Gráfico 4.1 – Alterações da concentração total de citocromos P450 hepáticos em camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni* e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média \pm DP da concentração total de citocromos P450 de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de CYP450/mg de proteína microssomal. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p>0,05$).

Assim como observado para os camundongos *Swiss Webster*, os níveis de CYP450 totais nos camundongos DBA/2 infectados, de ambos os sexos, não diferiram de seus respectivos controles não infectados 15 e 30 dias após a infecção, como pode ser visto no gráfico 4.2. Machos controles e infectados apresentaram, 15 dias após a infecção, concentrações de CYP450 totais da ordem de $511,7 \pm 55,3$ e $496,2 \pm 50,4$ pmoles/mg de proteína microssomal ($p>0,05$), respectivamente. Fêmeas controles e infectadas, neste mesmo momento de evolução da doença, apresentaram concentrações de CYP450 totais da ordem de $293,2 \pm 44,8$ e $334,0 \pm 38,2$ pmoles/mg de proteína microssomal ($p>0,05$), respectivamente. Nos grupos mortos 30 dias após a infecção, machos controles apresentaram níveis de CYP450 totais da ordem de $601,7 \pm 51,1$ e os

infectados da ordem de $611,8 \pm 45,7$ pmoles/mg de proteína microssomal ($p > 0,05$). Quanto às fêmeas, os níveis de CYP450 totais foram para as controles $349,0 \pm 39,3$ e para as infectadas $357,2 \pm 23,9$ pmoles/mg de proteína microssomal ($p > 0,05$).

Quando comparamos os níveis de CYP450 totais entre os sexos dos camundongos controles, de ambas as linhagens e idades, observamos que, de uma forma geral, os machos apresentaram maiores níveis de CYP450 do que as fêmeas. Com exceção dos camundongos *Swiss Webster* mortos 15 dias após a infecção, os controles machos não infectados apresentaram concentrações de CYP450 totais aproximadamente 2 vezes maiores que as fêmeas.

Considerando a mesma linhagem e o mesmo sexo, as diferenças entre as idades foram discretas, tendendo a um aumento nos camundongos controles não infectados mais velhos (40 dias de vida) em relação aos grupos mortos 15 dias após a infecção (25 dias de vida). A única exceção foram as fêmeas *Swiss Webster*, que exibiram um discreto declínio da concentração de CYP450 totais do grupo morto 30 dias após a infecção em relação ao grupo morto 15 dias antes.

Ao compararmos as diferenças nos níveis de CYP450 totais entre as duas linhagens de camundongos controles não infectados notamos que, de uma forma geral, os valores não diferiram entre *Swiss Webster* e DBA/2 de ambos os sexos e idades, exceto para as fêmeas mortas aos 25 dias de vida. Fêmeas *Swiss Webster* e DBA/2, do grupo morto 15 dias após a infecção, apresentaram concentrações de CYP450 totais da ordem de $465,8 \pm 28,7$ e $293,2 \pm 44,8$ pmoles/mg de proteína microssomal ($p < 0,05$).

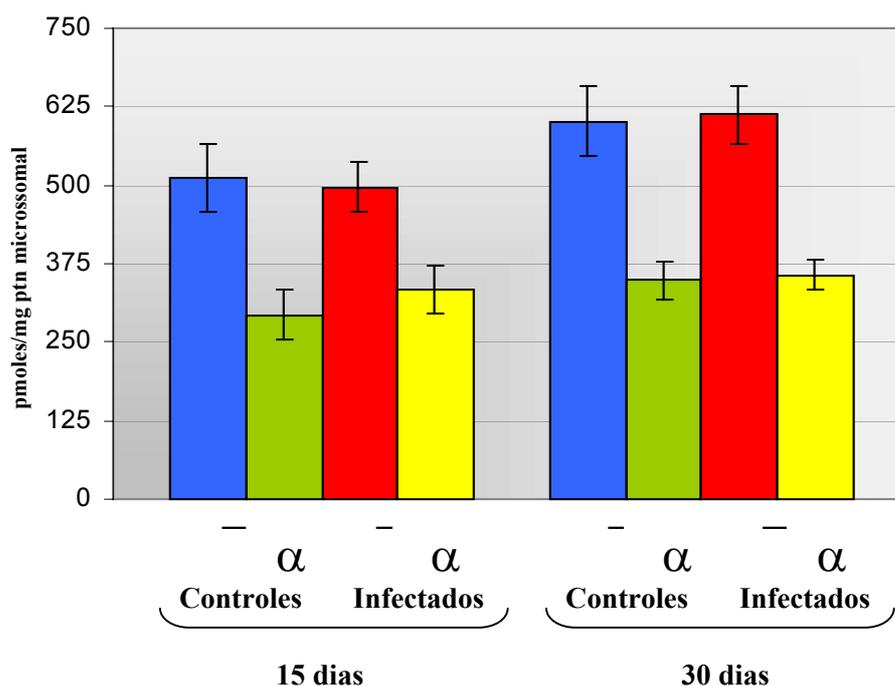
4.4 – Alterações das atividades de isoenzimas citocromo P450 na fração microssomal hepática de camundongos infectados com *S. mansoni* e seus respectivos controles não infectados

4.4.1 – Atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD)

A infecção com *S. mansoni* não causou alterações das atividades de EROD nos camundongos machos e fêmeas, de ambas as linhagens, mortos 15 dias após a infecção. Camundongos *Swiss Webster* infectados, machos e fêmeas, mortos 30 dias após a infecção, apresentaram atividade de EROD discretamente maior (1,5 e 1,7 vezes, respectivamente) do que seus respectivos controles não infectados (gráfico 4.3). No caso dos camundongos DBA/2, somente as fêmeas tiveram a atividade de EROD

alterada 30 dias após a infecção. Neste grupo, as fêmeas infectadas apresentaram atividade de EROD cerca de 1,4 vezes menor do que as controles não infectadas (gráfico 4.4).

Gráfico 4.2 – Alterações da concentração total de citocromos P450 hepáticos em camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.

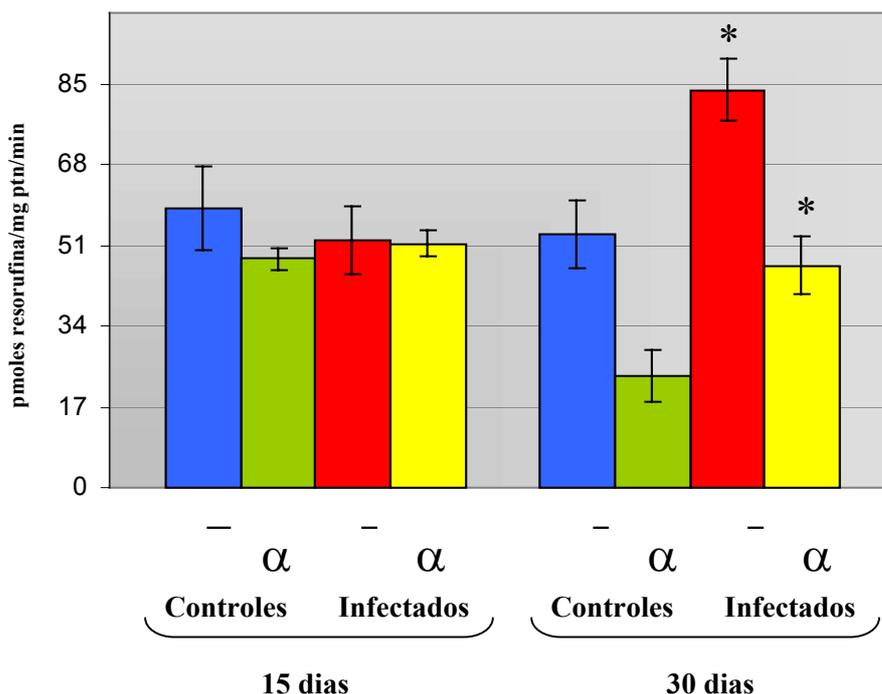


Os resultados correspondem a média±DP da concentração total de citocromos P450 de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de CYP450/mg de proteína microsomal. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p>0,05$).

Quanto às comparações entre os controles não infectados da linhagem *Swiss Webster*, machos com 25 e 40 dias de idade, apresentaram atividade de EROD maior do que as respectivas fêmeas. Machos e fêmeas do grupo morto 15 dias após a infecção (25 dias de vida) apresentaram atividade de 58,83±8,64 e 48,17±2,32 pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto ($p=0,0028$), respectivamente. Nos grupos mortos com 40 dias de vida (controles de 30 dias pós-infecção), machos e fêmeas exibiram

atividades de EROD da ordem de $53,33 \pm 7,20$ e $23,50 \pm 5,5$ pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto ($p < 0,05$), respectivamente.

Gráfico 4.3 – Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



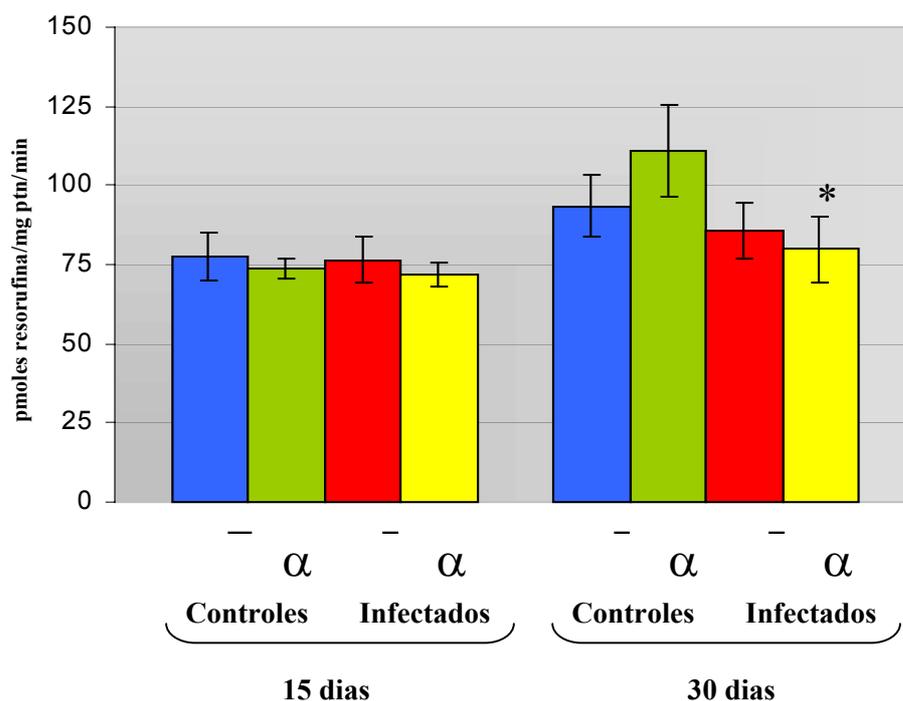
Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de EROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

Com exceção dos machos *Swiss Webster*, que não apresentaram alteração da atividade de EROD relacionada à idade, os outros grupos de camundongos não infectados apresentaram diferenças de atividade entre as idades (25 e 40 dias de vida). Fêmeas *Swiss Webster* com 40 dias de vida exibiram atividade de EROD 2,3 vezes menor do que as fêmeas com 25 dias de vida. No entanto, machos e fêmeas DBA/2 com

40 dias de vida tiveram atividades de EROD 1,2 e 1,5 vezes maiores, respectivamente, do que os camundongos do mesmo sexo com 25 dias de vida.

No que tange a diferenças de EROD entre as linhagens, observamos atividades discretamente maiores nos camundongos DBA/2, de ambos os sexos, dos grupos mortos 15 e 30 dias após a infecção, em relação aos *Swiss Webster*.

Gráfico 4.4 – Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) em fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



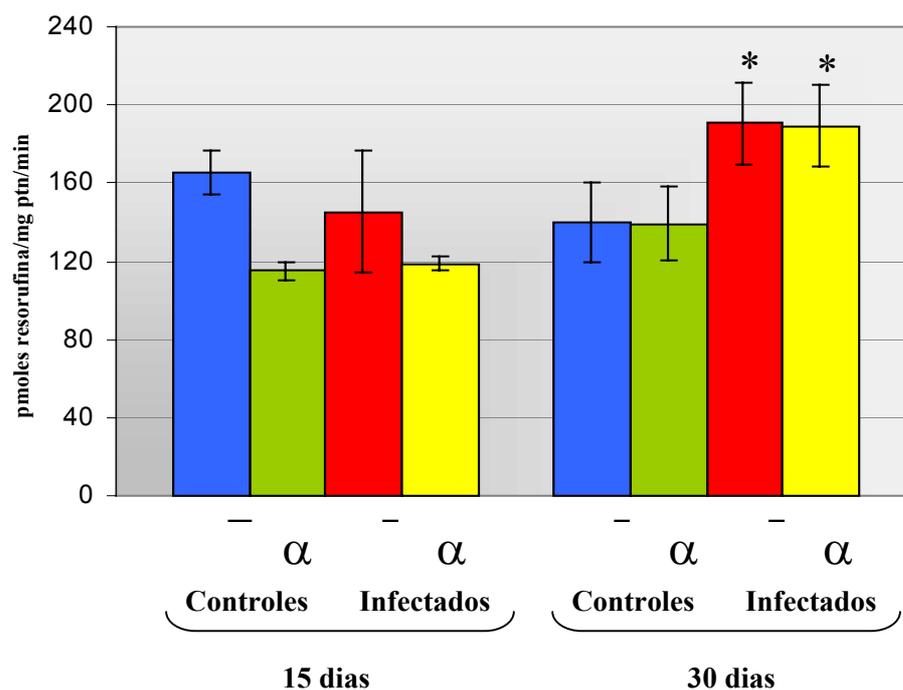
Os resultados correspondem a média±DP da atividade de EROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

4.4.2 – Atividade da metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD)

De forma semelhante ao que foi observado com EROD, a atividade da MROD também foi pouco modificada pela infecção com *S. mansoni*, na fase inicial da doença. É interessante notar que as alterações observadas na atividade da MROD, em

decorrência da infecção, foram essencialmente as mesmas constatadas em EROD. Neste sentido, não foram detectadas alterações de MROD nos camundongos machos e fêmeas, de ambas as linhagens, mortos 15 dias após a infecção. Camundongos *Swiss Webster* infectados, machos e fêmeas, mortos 30 dias após a infecção, apresentaram atividade discretamente maior (1,3 vezes em ambos os sexos) do que seus respectivos controles não infectados (gráfico 4.5). Nos camundongos DBA/2, somente as fêmeas tiveram a atividade de MROD alterada 30 dias após a infecção. Neste grupo, as fêmeas infectadas apresentaram atividade 1,5 vezes menor do que as suas respectivas controles não infectadas (gráfico 4.6).

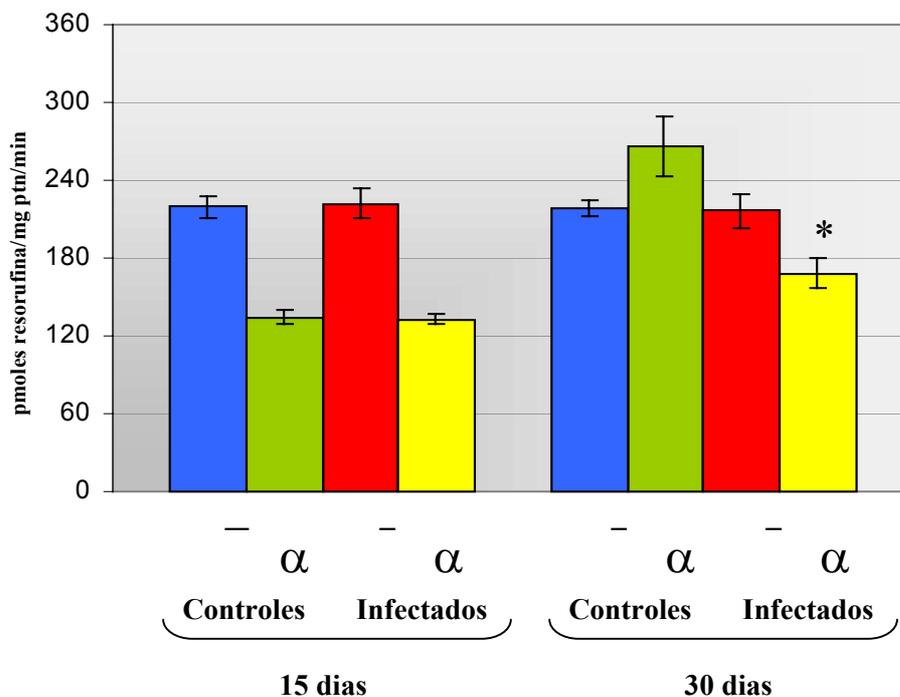
Gráfico 4.5 – Atividade da metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD) em fração microsossomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média±DP da atividade de MROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

Foram poucas também as diferenças de MROD entre os sexos, quando comparamos camundongos controles não infectados da mesma linhagem e da mesma idade. Machos *Swiss Webster* com 25 dias de vida (15 dias pós-infecção) apresentaram atividade de MROD da ordem de $165,5 \pm 11,3$ pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto, enquanto que nas fêmeas desta mesma idade a atividade foi $115,17 \pm 4,40$ pmoles de resorufina/mg proteína/minuto ($p < 0,05$). No grupo de camundongos desta mesma linhagem, mortos 30 dias após a infecção, não foram observadas diferenças significativas entre os sexos.

Gráfico 4.6 – Atividade da metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD) em fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de MROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste t de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

A atividade de MROD também diferiu com a idade, em alguns casos, entre os camundongos controles não infectados. Machos *Swiss Webster* com 25 e 40 dias de vida

(15 e 30 dias pós-infecção) apresentaram atividade de MROD da ordem de $165,5 \pm 11,3$ e $140,0 \pm 20,8$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto ($p=0,03$), respectivamente. Ao contrário do observado nos machos, as fêmeas desta linhagem exibiram pequena elevação da atividade com o aumento da idade. As atividades nas fêmeas com 25 e 40 dias de vida foram, respectivamente, $115,2 \pm 4,4$ e $139,3 \pm 19$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto ($p=0,015$). Um aumento um pouco mais expressivo foi observado nas fêmeas DBA/2. Fêmeas desta linhagem, com 25 e 40 dias de vida, apresentaram atividades de MROD da ordem de $134,5 \pm 4,93$ e $266,2 \pm 23,6$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto ($p < 0,05$), respectivamente.

Algumas diferenças entre as linhagens também foram detectadas. De um modo geral, controles não infectados DBA/2 machos, com 25 e 40 dias de vida, apresentaram atividades de MROD 1,3 e 1,5 vezes maiores, respectivamente, do que os *machos Swiss Webster* do mesmo sexo e da mesma idade. Entre as fêmeas, somente o grupo morto 30 dias após a infecção exibiu atividade maior (1,9 vezes) do que as fêmeas de *Swiss Webster*.

4.4.3 – Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD)

Como pode ser observado no gráfico 4.8, na fase inicial da esquistossomose, a atividade de BROD não foi alterada nos machos e fêmeas de DBA/2. Uma pequena elevação da atividade da BROD foi notada nas fêmeas de *Swiss Webster* 30 dias após a infecção (gráfico 4.7). As fêmeas infectadas deste grupo apresentaram atividade de BROD da ordem de $25,0 \pm 4,0$ picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto, enquanto nas fêmeas controles a atividade foi $16,17 \pm 3,06$.

Quanto à comparação entre as idades, a atividade de BROD diferiu apenas nos machos e fêmeas de DBA/2. Em ambos os sexos, a atividade diminuiu com o aumento da idade (1,7 vezes menor para machos e 1,2 vezes menor para as fêmeas). Em camundongos *Swiss Webster* de ambos os sexos, a atividade de BROD pareceu não sofrer alterações entre os 25 e 40 dias de vida.

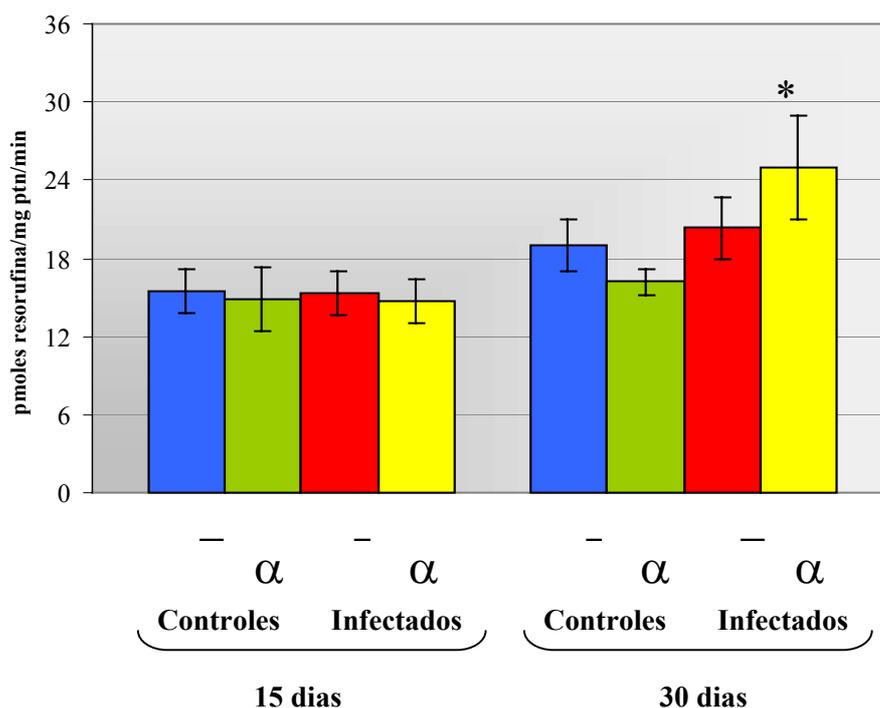
A diferença entre as linhagens esteve presente em ambos os sexos e idades. Controles *Swiss Webster* não infectados com 25 dias de vida, de ambos os sexos, exibiram atividade de BROD cerca de 2,3 vezes menor do que os DBA/2 de mesma idade. Nos grupos mortos 30 dias após a infecção, somente as fêmeas apresentaram

diferenças entre as linhagens. Fêmeas de *Swiss Webster* apresentaram atividade aproximadamente 1,8 vezes menor do que as fêmeas DBA/2 da mesma idade.

4.4.4 – Atividade da pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD)

A atividade de PROD não sofreu alterações, 15 e 30 dias após a infecção, nos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas (gráficos 4.9 e 4.10). A atividade de PROD pareceu não diferir entre os sexos, exceto pelo fato de *Swiss Webster* controles machos, com 40 dias de vida, terem exibido atividade 1,2 vezes maior do que as fêmeas controles desta linhagem com a mesma idade.

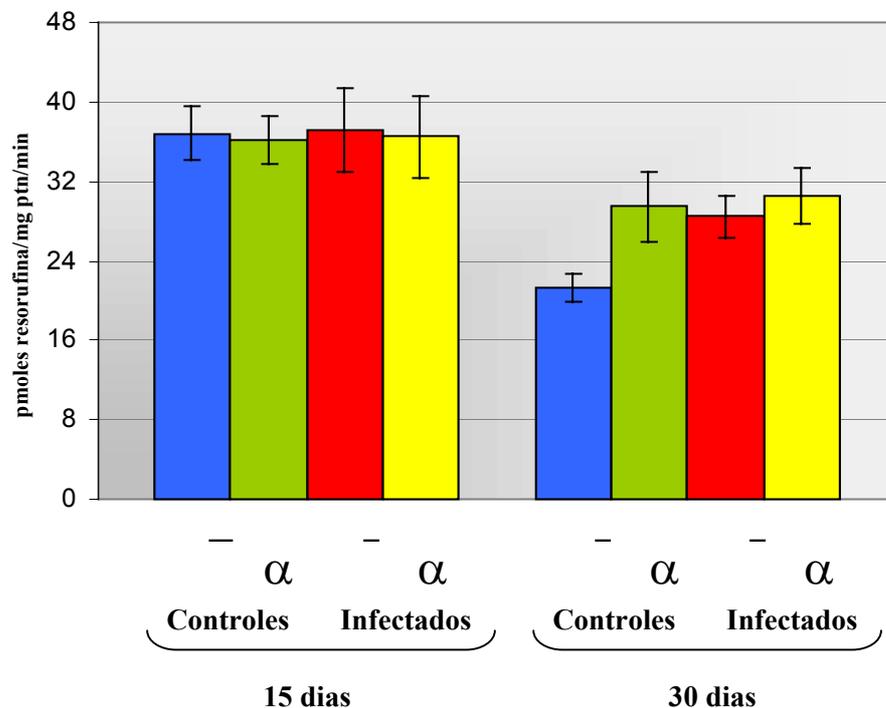
Gráfico 4.7 – Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) em fração microsossomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média±DP da atividade de BROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

Camundongos controles não infectados com 25 dias de vida apresentaram atividades de PROD bastante homogêneas. Nos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, esta atividade variou entre $6,65 \pm 0,76$ e $6,72 \pm 0,91$ pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto, respectivamente. Nos DBA/2 machos e fêmeas, com esta mesma idade, a atividade de PROD variou entre $7,62 \pm 0,54$ e $7,62 \pm 0,79$ pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto, respectivamente. Os camundongos controles não infectados com 40 dias de vida exibiram atividade de PROD um pouco maior do que os animais com 25 dias de vida. *Swiss Webster* machos, com 40 dias, apresentaram atividade de PROD 1,5 vezes maior do que os camundongos do mesmo sexo com 25 dias de vida ($p < 0,05$). As fêmeas *Swiss Webster* não exibiram diferenças de PROD entre as duas idades. Nos DBA/2 com 40 dias, machos e fêmeas, PROD foi cerca de 1,3 vezes maior do que nos animais do mesmo sexo com 25 dias de vida ($p < 0,05$).

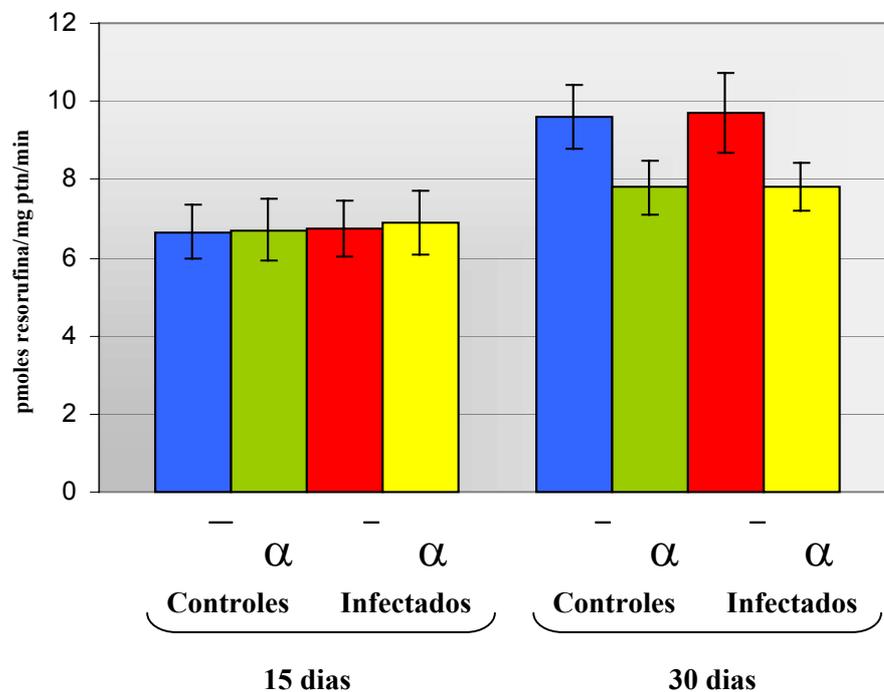
Gráfico 4.8 – Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) em fração microsossal hepática de camundongos DBA/2 machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de BROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p > 0,05$).

Diferenças entre as linhagens foram observadas somente entre as fêmeas com 40 dias de vida. Camundongos *Swiss Webster* fêmeas com esta idade exibiram atividade de PROD da ordem de $7,79 \pm 0,76$ pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Este valor foi aproximadamente 1,3 vezes menor ($p < 0,05$) do que a atividade encontrada nas fêmeas de DBA/2 ($9,93 \pm 0,56$ pmoles de resorufina/mg de proteína/minuto).

Gráfico 4.9 – Atividade da pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD) em fração microssomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



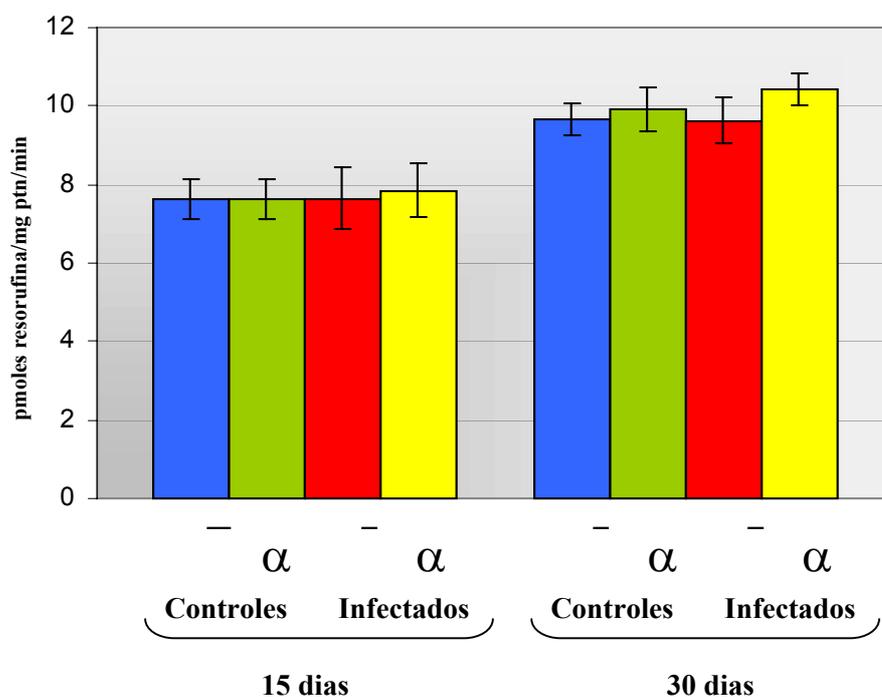
Os resultados correspondem a média±DP da atividade de PROD de 6 pools de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 pools de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste t de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p > 0,05$).

4.4.5 – Atividade da Nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d)

Assim como ocorreu com as atividades das alcoxiresorufinas-*O*-desalquilases citadas anteriormente, nenhuma alteração da atividade de NDMA-d foi constatada nos

camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, de ambos os sexos, 15 dias após a infecção com *S. mansoni*.

Gráfico 4.10 – Atividade da pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD) em fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.

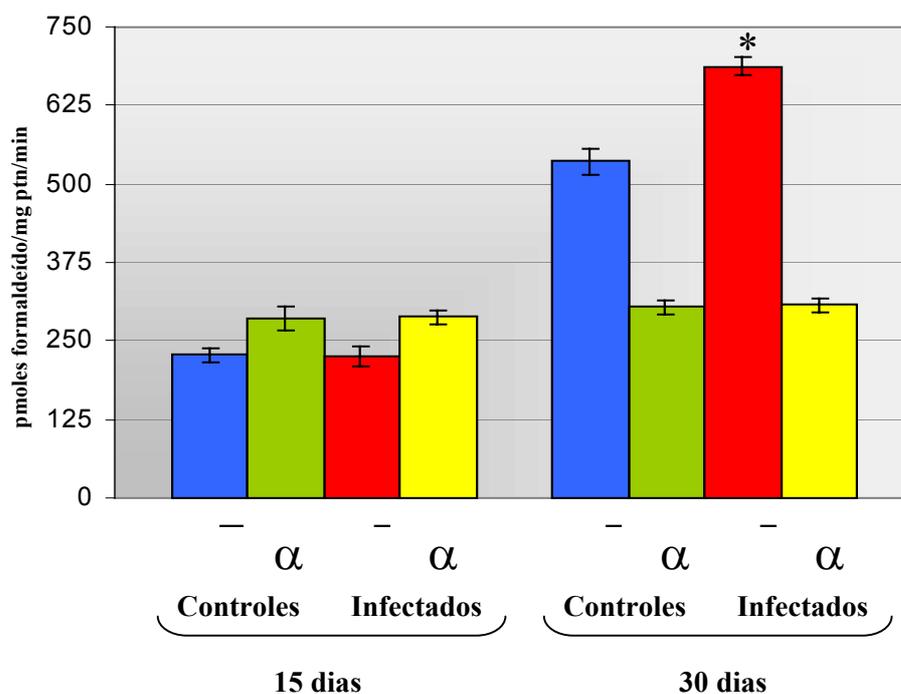


Os resultados correspondem a média±DP da atividade de PROD de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de resorufina/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p>0,05$).

Como pode ser observado no gráfico 4.11, 30 dias após a infecção, camundongos *Swiss Webster* machos apresentaram atividade de NDMA-d aproximadamente 1,3 vezes maior do que seus respectivos controles não infectados ($p<0,05$). A atividade de NDMA-d não diferiu entre as fêmeas infectadas e controles da mesma linhagem e com a mesma idade. Da mesma forma, fêmeas DBA/2 não mostraram alterações da atividade de NDMA-d 30 dias após a infecção, quando comparadas com seus respectivos controles (gráfico 4.12). Em contraste com estes

dados, os machos desta linhagem apresentaram, 30 dias após a infecção, esta atividade 1,2 vezes maior do que os seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$).

Gráfico 4.11 – Atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d) em fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.

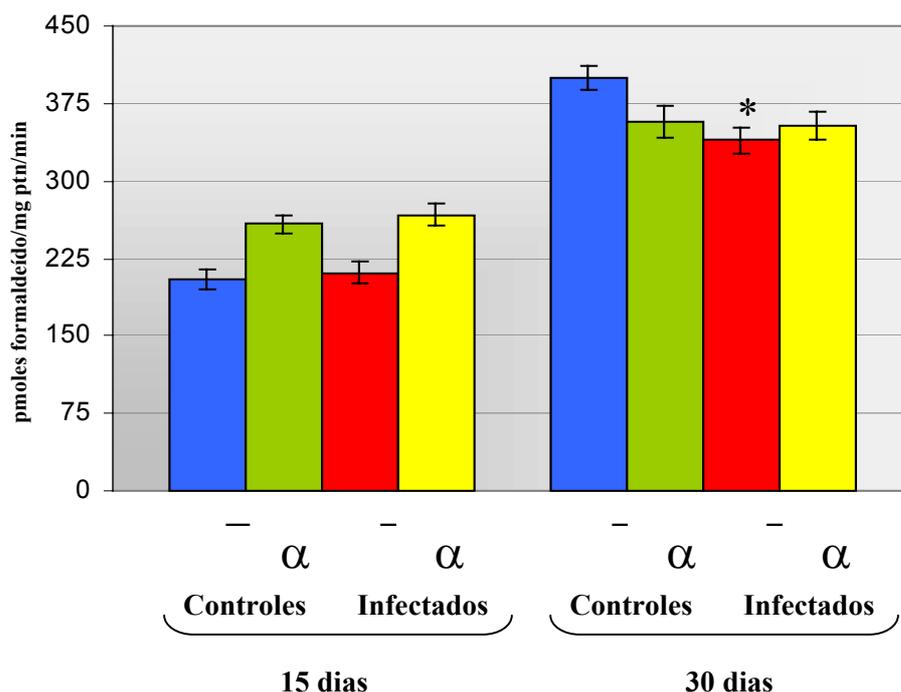


Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de NDMA-d de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

Nos grupos com 25 dias de idade, as fêmeas apresentaram maior atividade de NDMA-d do que os machos com a mesma idade, em ambas as linhagens. Machos *Swiss Webster* com 25 dias de vida, apresentaram atividade de NDMA-d da ordem de $227,3 \pm 10,7$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto, enquanto nas fêmeas, esta atividade foi da ordem de $285,83 \pm 5,15$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto ($p < 0,05$). Da mesma forma, em machos de DBA/2 esta atividade foi da ordem de $204,50 \pm 6,53$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto, enquanto nas

fêmeas a atividade de NDMA-d foi da ordem de $267,33 \pm 9,58$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto ($p=0,0004$). Por outro lado, nos grupos com 40 dias de vida, os machos apresentaram atividade maior do que as fêmeas em ambas as linhagens. Machos *Swiss Webster* com 40 dias de vida, apresentaram atividade de NDMA-d da ordem de $535,8 \pm 19,8$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto, enquanto nas fêmeas, esta atividade foi da ordem de $303,67 \pm 4,23$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto ($p < 0,05$). Em machos de DBA/2 a atividade de NDMA-d foi da ordem de $400,2 \pm 11,8$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto e nas fêmeas a atividade foi da ordem de $357,2 \pm 15,3$ picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto ($p=0,0004$).

Gráfico 4.12 – Atividade da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de NDMA-d de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de formaldeído/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Os valores dos animais infectados que diferiram estatisticamente dos seus respectivos controles não infectados ($p < 0,05$) estão assinalados com um asterisco.

A atividade de NDMA-d também diferiu com a idade entre os camundongos controles não infectados. Machos *Swiss Webster* com 40 dias de vida tiveram atividade de NDMA-d 2,4 vezes maior do que os machos com 25 dias de vida ($p<0,05$). A atividade de NDMA-d não diferiu, com a idade, entre as fêmeas desta linhagem. Machos DBA/2 com 40 dias de vida apresentaram atividade aproximadamente 2 vezes maior do que os machos com 25 dias de vida da mesma linhagem ($p<0,05$). Entre as fêmeas, esta diferença foi de 1,3 vezes ($p<0,05$).

Com relação a comparações entre as linhagens, DBA/2 machos e fêmeas, com 25 dias de vida, exibiram, de um modo geral, atividade discretamente menor do que os *Swiss Webster*. Esta diferença foi mais evidente nos animais com 40 dias de vida. Neste grupo etário, a atividade de NDMA-d em machos *Swiss Webster* foi aproximadamente 1,2 vezes maior do que em DBA/2.

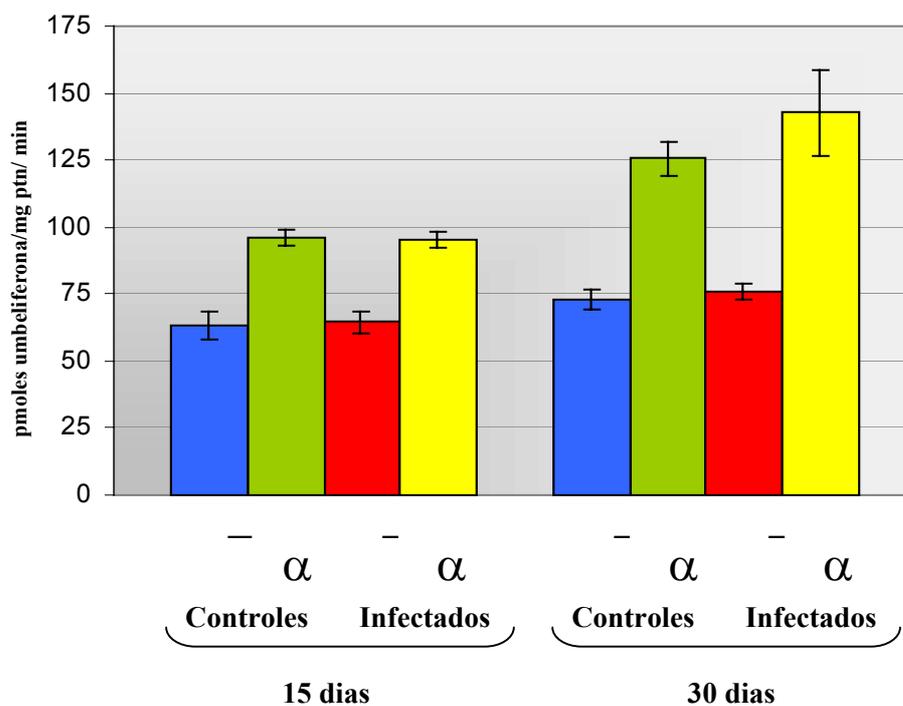
4.4.6 – Atividade da cumarina-7-hidroxiase (COH)

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, notamos que a atividade COH, um bom marcador para CYP2A5 em camundongos DBA/2, foi relativamente baixa em camundongos *Swiss Webster* machos e fêmeas com 65 dias de vida. Neste estudo, ao tentarmos analisar a atividade desta mesma enzima em camundongos *Swiss Webster*, com 25 e 40 dias de vida, encontramos dificuldades em detectar os níveis de umbeliferona produzidos na reação. Isto sugere que a atividade de COH nestes animais, ainda muito jovens, é extremamente baixa. Por este motivo, e também por suspeitarmos que a atividade de COH pode não ser um marcador específico de CYP2A5 em *Swiss Webster*, neste estudo analisamos a atividade de COH somente nos camundongos da linhagem DBA/2.

Como pode ser observado no gráfico 4.13, 15 e 30 dias após a infecção com *S. mansoni* a atividade de COH não apresentou alterações em ambos os sexos. Quando comparamos esta atividade entre os sexos, verificamos que controles não infectados machos de ambas as idades apresentaram atividade menor do que as fêmeas. Machos com 25 dias de vida mostraram atividades da ordem de $63,50\pm 5,14$ picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto, enquanto as fêmeas exibiram atividades da ordem de $96,14\pm 3,92$ picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto ($p<0,05$). Nos grupos mortos com 40 dias de vida, os machos apresentaram atividade da ordem de $73,00\pm 4,98$

picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto e as fêmeas, atividades da ordem de $125,50 \pm 27,3$ picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto ($p < 0,05$).

Gráfico 4.13 – Atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH) em fração microsomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



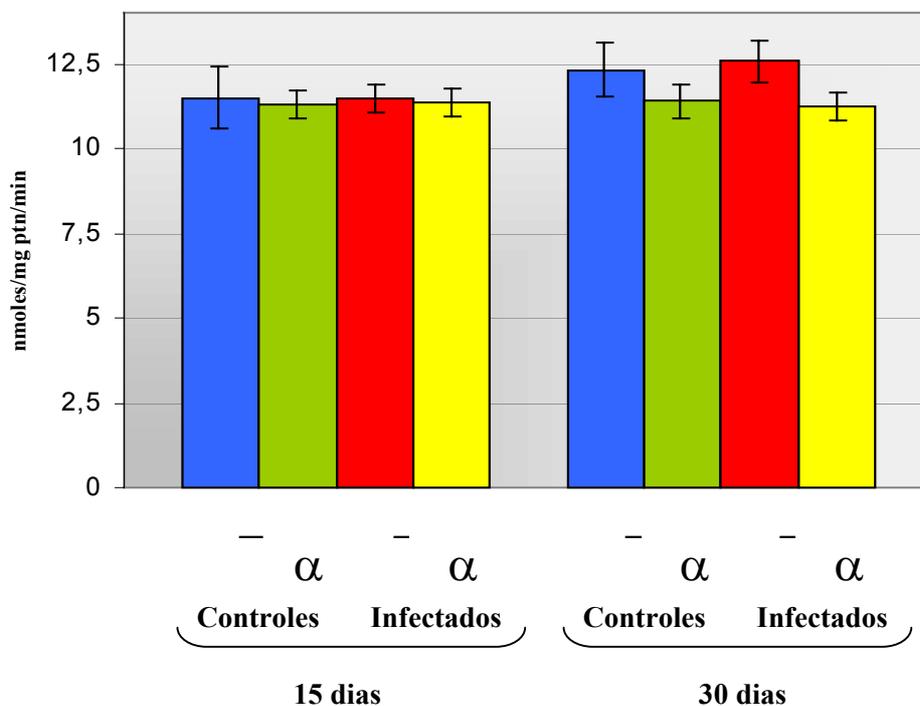
Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de CoH de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em picomoles de umbeliferona/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p > 0,05$).

Quando comparamos as atividades de COH entre animais com 25 e 40 dias de vida, verificamos que houve um aumento somente entre as fêmeas. A atividade de COH foi 1,3 vezes maior nas fêmeas com 40 dias de vida do que naquelas com 25 dias de vida. Esta alteração na atividade de COH, com a idade, não foi observada entre os machos.

4.5 – Alterações das atividades das UDP-glicuronosiltransferases (UGT) na fração microsomal hepática de camundongos infectados com *S. mansoni* e seus respectivos controles não infectados

Assim como visto, na maioria dos casos, com as atividades de isoenzimas citocromo P450 analisadas, a atividade de UGT na fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, não sofreu alteração 15 e 30 dias após a infecção (gráficos 4.14 e 4.15).

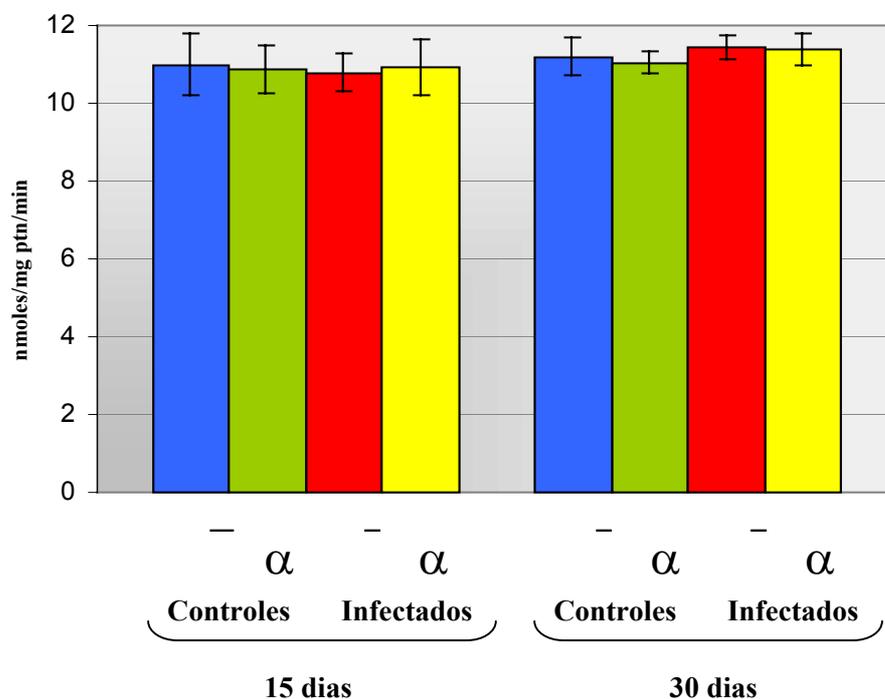
Gráfico 4.14 – Atividade da UDP-glicuronosiltransferase (UGT) em fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster*, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média±DP da atividade de UGT de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em nanomoles de glicuronato de *p*-nitrofenol/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p>0,05$).

Quando comparamos as atividades de UGT de camundongos controles não infectados, entre os sexos, idades ou linhagens, também não detectamos diferenças estatisticamente significativas. Machos e fêmeas *Swiss Webster* com 25 dias de vida exibiram atividades de UGT da ordem de $11,5 \pm 0,89$ e $11,28 \pm 0,42$ nanomoles de glicuronato de ρ -nitrofenol/mg de proteína/minuto ($p > 0,05$), respectivamente. Machos e fêmeas da mesma linhagem, com 40 dias de vida, mostraram atividade da ordem de $12,31 \pm 0,8$ e $11,39 \pm 0,18$ nanomoles de glicuronato de ρ -nitrofenol/mg de proteína/minuto ($p > 0,05$), respectivamente. De forma semelhante, machos e fêmeas DBA/2, com 25 dias de vida, exibiram atividades de UGT da ordem de $10,99 \pm 0,92$ e $10,87 \pm 0,89$ nanomoles de glicuronato de ρ -nitrofenol/mg de proteína/minuto ($p > 0,05$), respectivamente. Machos e fêmeas, da mesma linhagem, com 40 dias de vida apresentaram atividade da ordem de $11,2 \pm 0,98$ e $11,05 \pm 0,87$ nanomoles de glicuronato de ρ -nitrofenol/mg de proteína/minuto, respectivamente ($p > 0,05$).

Gráfico 4.15 – Atividade da UDP-glucuronosiltransferase (UGT) em fração microsossomal hepática de camundongos DBA/2, machos e fêmeas, infectados com *S. mansoni*, e seus respectivos controles não infectados, 15 e 30 dias após a infecção.



Os resultados correspondem a média \pm DP da atividade de UGT de 6 *pools* de fígados de 7 animais, nos grupos de 15 dias pós-infecção, e 6 *pools* de fígados de 3 animais, nos grupos de 30 dias pós-infecção. Os valores estão expressos em nanomoles de glicuronato de ρ -nitrofenol/mg de proteína/minuto. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguida do teste *t* de Student. Não foram detectadas diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados ($p > 0,05$).

5 – DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos as alterações das atividades de enzimas hepáticas de biotransformação de xenobióticos, 15 e 30 dias após a infecção de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2* com 100 cercárias de *S. mansoni*. Neste momento da evolução da doença os vermes ainda são imaturos e a oviposição não começou (15 dias), ou está apenas tendo início (30 dias), de modo que ainda não existem, ou são muito raros, os ovos retidos no parênquima hepático e, por conseguinte, os granulomas (Fidalgo-Neto et al., 2004). As reações enzimáticas analisadas foram a etoxiresorufina-*O*-desetilação (EROD), a metoxiresorufina-*O*-desmetilação (MROD), a benziloxiresorufina-*O*-desbenzilação (BROD), a pentoxiresorufina-*O*-despentilação (PROD), a nitrosodimetilamina-desmetilação (NDMA-d) e a cumarina-7-hidroxilação (COH), marcadoras de diferentes isoformas de CYP, além da UDP-glicuronosiltransferase (UGT), uma das principais enzimas de fase II da biotransformação de xenobióticos.

5.1 – Índice de penetração de cercárias de *S. mansoni* em camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2* no 10º dia de vida

Em estudos anteriores realizados no nosso laboratório, havíamos notado que a proporção de vermes maduros recuperados após a perfusão hepato-mesentérica, bem como o número de ovos encontrados no fígado e intestinos, são maiores nos camundongos infectados aos 10 dias de vida (lactentes), do que naqueles infectados na idade adulta (Fidalgo-Neto et al., 2004). Estes achados sugerem que no hospedeiro definitivo mais jovem, infectado aos 10 dias de vida, o amadurecimento dos vermes é mais eficiente, independente do sexo e da linhagem dos animais. A infecção de animais lactentes, levando em conta o fato de que investigamos as alterações na fase inicial da doença (15 e 30 dias após a infecção), nos trouxe o inconveniente de analisar as atividades das enzimas de biotransformação em animais que ainda são muito jovens. Nestes animais, os eventuais efeitos da doença ocorrem num indivíduo em crescimento cujo amadurecimento, inclusive da capacidade do fígado biotransformar xenobióticos, ainda está em curso. Nesta faixa etária, por exemplo, os animais ainda não entraram na puberdade - 25 dias de vida - ou estão apenas iniciando o processo de maturação sexual - 40 dias de vida - (SANTOS, 2002). Em roedores, as atividades de algumas enzimas de biotransformação (*e.g.* subfamília CYP2B) exibem claras diferenças relacionadas ao

sexo e sabe-se que tanto os níveis de hormônio de crescimento quanto os de hormônios sexuais podem influenciá-las (Jarukamjorn, et al., 2001; Kato, 1974).

Para avaliar a eficiência do método de infecção empregado neste estudo, determinamos o índice de penetração de cercárias de *S. mansoni* nos animais infectados aos 10 dias de vida. Constatamos, então, que o índice de penetração percutânea de cercárias de *S. mansoni* (cepa BH, originária do Departamento de Malacologia do IOC/FIOCRUZ) foi elevado (entre 97 e 100%), e não diferiu entre os sexos e as linhagens dos camundongos. Estes resultados confirmam observações anteriores do nosso laboratório (Fidalgo-Neto et al., 2004) e de outros pesquisadores e apontam para a alta eficiência do parasito em penetrar através da pele de seus hospedeiros definitivos. Pode-se dizer que, pelo menos com a cepa BH de *S. mansoni*, quando respeitadas algumas condições, como o emprego de cercárias viáveis que emergiram há pouco tempo do caramujo, e a manutenção da temperatura adequada durante a exposição do camundongo, é possível obter aproximadamente 100% de penetração no processo experimental de infecção.

5.2 – Alterações do peso corporal e do peso do fígado em camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2* infectados com *S. mansoni*

A infecção pareceu não interferir com o ganho de peso dos camundongos, machos e fêmeas, das duas linhagens, apresentando os animais infectados ganho de peso semelhante ao de seus respectivos controles não infectados. Houve, todavia, diferenças de ganho de peso relacionadas ao sexo e à linhagem. Em períodos de tempo equivalentes, os machos ganharam mais peso do que as fêmeas, em ambas as linhagens. Por outro lado, os camundongos *Swiss Webster* exibiram ganho de peso maior do que os da linhagem *DBA/2*.

O peso do fígado dos camundongos também não foi alterado pela infecção. Notamos, no entanto, que os camundongos machos das duas linhagens apresentaram fígado mais pesado (peso absoluto) do que as fêmeas, o que pode estar relacionado com o maior peso corporal. Assim como observado em relação ao ganho de peso, os animais da linhagem *DBA/2* apresentaram peso absoluto do fígado menor do que os *Swiss Webster* de mesmo sexo e idade, o que reflete também o menor tamanho e peso corporal dos camundongos da linhagem consanguínea.

A ausência de diferenças de ganho de peso corporal e de peso do fígado entre infectados e não infectados, quando comparamos camundongos de mesmo sexo, idade e linhagem, sugere que nesta fase inicial (pré-granuloma) da esquistossomose mansônica murina – ao contrário do que é constatado mais tarde em indivíduos infectados com a mesma carga parasitária (100 cercárias) – não ocorre comprometimento importante do estado geral de saúde e da função hepática. Esta conclusão encontra apoio também no fato de que a observação clínica e comportamental dos animais em suas respectivas gaiolas não evidenciou – em qualquer das situações examinadas – diferenças dignas de registro entre camundongos infectados e controles não infectados.

5.3 – Alterações de isoenzimas citocromo P450 no fígado de camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, 15 e 30 dias após infecção com *S. mansoni*

5.3.1 – Especificidade das reações enzimáticas examinadas como marcadoras de isoenzimas citocromo P450 em camundongos

Uma das características das isoenzimas citocromo P450 é a sua grande versatilidade em termos de especificidade por substrato, isto é, uma mesma isoenzima é capaz de metabolizar vários substratos, estruturalmente diferentes, da mesma forma que um mesmo substrato pode ser metabolizado por mais de uma isoenzima. Neste contexto, a especificidade por determinado substrato é sempre relativa.

Sabe-se que uma série de éteres da fenoxazona, como a etoxi-, metoxi-, pentoxi- e benziloxiresorufina, são substratos para algumas isoformas de CYP (Burke et al., 1985). Entretanto, a especificidade de uma dada isoenzima como agente catalítico da desalquilação de determinado substrato não é absoluta, dependendo da concentração relativa das várias isoformas presentes na fração microssomal estudada (Burke et al., 1994). Em outras palavras, esta especificidade pode acentuar-se ou atenuar-se, dependendo da exposição prévia a agentes indutores. Além disso, a especificidade de cada isoenzima em relação à desalquilação de determinado substrato, pode variar entre as diferentes espécies. Em ratos, as reações de EROD e MROD são catalisadas predominantemente por CYP1A1 e CYP1A2, respectivamente. Por outro lado, em coelhos CYP1A2 desempenha um papel mais importante do que CYP1A1 na catálise de EROD e, em humanos, CYP1A2 participa de forma importante e similar tanto na catálise de EROD como na de MROD (Weaver et al., 1994).

De acordo com Nerurkar et al., (1993), o metabolismo da etoxiresorufina e da metoxiresorufina, em ratos e camundongos, é mediado preferencialmente por CYP1A1 e CYP1A2, respectivamente. Segundo Burke et al., (1994), em ratos, as reações de BROD e PROD são catalisadas preferencialmente por isoenzimas da subfamília CYP2B, principalmente em microsossomos induzidos por fenobarbital. De acordo com Nerurkar et al., (1993), apesar da benziloxiresorufina ser metabolizada por diferentes isoenzimas CYP450 induzíveis e constitutivas em ratos, incluindo CYP1A1/2, CYP2B1/2 e CYP3A1/2, tem sido demonstrado que a benziloxiresorufina, bem como a pentoxiresorufina são substratos razoavelmente preferenciais para serem considerados marcadores das atividades da subfamília CYP2B em camundongos e ratos.

Tem sido demonstrado que a hidroxilação da cumarina na posição 7 (7-hidroxilação) é catalisada predominantemente por CYP2A5 em algumas linhagens de camundongos (*e.g.* DBA/2) que expressam bem esta isoforma (Pelkonen et al., 1993). Assim, utilizamos COH como atividade marcadora de CYP2A5. Já a isoenzima CYP2E1, que desempenha papel fundamental no metabolismo hepático do etanol, é responsável pela ativação de uma grande variedade de xenobióticos a produtos hepatotóxicos ou carcinogênicos, incluindo algumas nitrosaminas – *e. g.*, *N*-nitrosodimetilamina (Zhang et al., 2002).

Neste trabalho, portanto, tendo em vista as evidências atualmente disponíveis, consideramos as atividades de EROD e MROD como marcadores de CYP1A, de BROD e PROD como marcadores de CYP2B, de COH como marcador de CYP2A5 e de NDMA-d como marcador de CYP2E1.

5.3.2 – Alterações de CYPs nos camundongos infectados com *S. mansoni*

Neste estudo notamos que, 15 e 30 dias após a infecção, os níveis totais de CYPs hepáticos nos camundongos infectados não diferiram dos níveis encontrados nos respectivos controles não infectados das duas linhagens estudadas (DBA/2 e *Swiss Webster*), tanto entre os machos como entre as fêmeas. No mesmo sentido, nesta fase inicial da doença, as atividades das alcoxiresorufinas-*O*-desalquilases (EROD, MROD, BROD e PROD), bem como a da nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d) e a da cumarina 7-hidroxilase (COH), também não apresentaram alterações, ou foram alteradas apenas de forma discreta, nos animais infectados. Nos camundongos mortos 15 dias após a infecção, machos e fêmeas, das duas linhagens, nenhuma alteração foi

observada em relação aos seus respectivos controles não infectados. Mais tarde, 30 dias após a infecção, discretas diferenças entre infectados e não infectados foram notadas em alguns casos. De modo geral, as atividades de CYP1A estavam discretamente aumentadas nos infectados, machos e fêmeas, *Swiss Webster*, e diminuídas nas fêmeas DBA/2. A atividade de BROD estava aumentada somente nas fêmeas *Swiss Webster*, enquanto a atividade de NDMA-d estava aumentada nos machos *Swiss Webster* e diminuída nos machos DBA/2. A atividade de COH não estava alterada em nenhum dos grupos de camundongos infectados.

Em síntese, os nossos resultados mostraram que no tecido hepático de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, em períodos que precedem o aparecimento de lesões granulomatosas decorrentes da infecção esquistossomótica (15 e 30 dias pós-infecção), ocorrem poucas alterações das atividades de isoenzimas das subfamílias CYP1A, 2A, 2B e 2E. Estas alterações, quando presentes, ocorrem de forma bastante discreta e em ambas as direções (aumento e diminuição), dependendo do sexo e da linhagem dos animais estudados.

5.3.3 – Influência do sexo, idade e linhagem dos camundongos utilizados neste estudo sobre as atividades de CYPs

Nos camundongos não infectados observamos uma clara diferença entre sexos quanto aos níveis totais de citocromo P450, exibindo os machos, das duas linhagens e das duas idades (25 e 40 dias de vida), concentrações mais elevadas do que as fêmeas. Estes resultados contrastam com os que foram anteriormente relatados por Iersel et al., (1994). Estes autores examinaram um grande número de linhagens de camundongos e, na maioria dos casos, não encontraram diferenças relacionadas ao gênero quanto aos níveis totais de CYP em microsossomos hepáticos. Iersel et al., (1994) notaram casos de dimorfismo sexual quanto aos níveis de CYP somente em duas linhagens: 129 (fêmea > macho) e A/J (macho > fêmea). Vale ressaltar, entretanto, que estes autores utilizaram camundongos adultos em seus estudos.

É conhecido que ratos adultos exibem, de um modo geral, um pronunciado dimorfismo sexual quanto ao metabolismo de xenobióticos dependente de CYPs, sendo as atividades enzimáticas, geralmente, 3 a 5 vezes maiores nos machos do que nas fêmeas (Kato, 1974). Nas diferentes linhagens de camundongos, entretanto, este dimorfismo aparece de forma mais discreta e no sentido inverso (fêmeas > machos),

sendo, na maioria das vezes, as atividades de CYPs apenas 40 a 100% maiores nas fêmeas do que nos machos (MacLeod et al., 1987).

A expressão de citocromo P450 pode ser influenciada por fatores endócrinos como hormônio de crescimento, hormônios sexuais e glicocorticóides (Jarukamjorn et al., 2001; Nemoto & Sakurai, 1995). Sharma et al., (1998) sugerem que as diferenças entre gêneros no metabolismo de fármacos em ratos e camundongos, e provavelmente também em outras espécies, sejam reguladas pelo hormônio de crescimento. De fato, a ação regulatória deste hormônio no aparecimento de diferenças entre sexos quanto à atividade de isoformas de CYPs, como CYP2C11 e CYP2C12, tem sido bem documentada (Zhang et al., 2002).

Neste trabalho, observamos poucos casos consistentes de dimorfismo sexual. As atividades de BROD não foram diferentes entre camundongos machos e fêmeas, com 25 e 40 dias de vida, em ambas as linhagens. De uma forma geral, os machos *Swiss Webster* apresentaram atividades de EROD, MROD e PROD maiores do que as fêmeas. As fêmeas DBA/2 apresentaram atividades de EROD e MROD maiores do que as observadas nos machos desta linhagem, principalmente nos grupos mortos aos 40 dias de vida. As atividades de NDMA-d foram maiores nos machos mortos aos 40 dias de vida do que nas fêmeas com a mesma idade, em ambas as linhagens.

A expressão constitutiva de isoformas de subfamília CYP2B hepático, é sexualmente dimórfica, sendo maior nos machos do que nas fêmeas em ratos, e maior nas fêmeas do que em machos em camundongos (Jarukamjorn et al., 2002; Jarukamjorn et al., 2001; Nemoto & Sakurai, 1995). Este dimorfismo sexual em relação a CYP2B de ratos é caracterizado por padrões pituitários temporais de secreção de hormônio de crescimento: um característico pulso plasmático intermitente nos ratos machos adultos, e a presença contínua no plasma de ratas fêmeas adultas (Dannan et al., 1986; Pampori & Shapiro, 1999). Em camundongos, ao contrário do que ocorre em ratos, a secreção de hormônio de crescimento é pulsátil, tanto em machos como em fêmeas. Estes períodos de baixo ou nenhum hormônio de crescimento no plasma podem constituir um importante determinante do padrão macho-específico da expressão de CYP2B (Jarukamjorn et al., 2002). Zhang et al., (2002) demonstraram ainda que ratos com deficiência de hormônio de crescimento exibiram maior inducibilidade de CYP2E1.

O padrão de secreção de hormônio de crescimento, todavia, não pode explicar completamente as diferenças sexo-dependentes nos níveis de expressão de diferentes isoenzimas CYP. Nemoto & Sakurai (1995) mostraram que hormônios femininos foram

indutores potentes de CYP2B9/10. Já a testosterona reduziu profundamente a expressão de CYP2B9/10 no fígado de fêmeas, sugerindo que hormônios femininos e masculinos também participam da modulação da expressão destas isoformas.

Quanto à atividade de CYP2A5, nossos resultados confirmaram a já bem documentada diferença entre gêneros, exibindo as fêmeas atividade maior do que os machos (Negishi et al., 1989; Iersel et al., 1994).

Além de alguns casos de diferenças entre sexos, notamos também variações das atividades de CYPs relacionadas à idade, entre 25 e 40 dias de vida. Observamos que, de um modo geral, camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, com 40 dias de vida apresentaram atividades enzimáticas maiores do que os animais com 25 dias de vida. Estes resultados sugerem que as atividades de CYP1A, 2A5, 2B e 2E1 aumentam à medida em que os indivíduos vão se aproximando da idade adulta, confirmando o que já havia sido demonstrado por outros autores para algumas enzimas (Nekoto & Sakurai, 1995; Pegran et al., 1995).

Nemoto & Sakurai, (1995) sugerem que algumas isoformas CYP são ativadas transcricionalmente durante diferentes fases do desenvolvimento, como logo após o nascimento ou no início da puberdade. Estes autores apontam os hormônios endógenos como candidatos a ativar ou suprimir a expressão de CYPs. Em camundongos, por exemplo, a expressão constitutiva de CYP2B hepático num estágio anterior à puberdade é sexo-independente, com a CYP2B9 – a principal isoforma – exibindo níveis similares nos dois sexos. A expressão de CYP2B10 começa a ser notada a partir da 5ª semana e continua ao longo da puberdade em ambos os sexos. Por volta da 7ª semana, CYP2B10 está sutilmente reduzida nos machos e bastante diminuída nas fêmeas, enquanto no mesmo período, CYP2B9 decresce nitidamente nos machos, mas não nas fêmeas. Assim sendo, a razão CYP2B9/CYP2B10 muda notoriamente durante a maturação sexual devido à marcada redução de CYP2B9 nos machos após a puberdade (Jarukamjorn et al., 2002). Pegran et al., (1995) demonstraram que a indução de EROD (CYP1A1) não difere entre camundongos C57BL/6N machos jovens (10 semanas) e velhos (28 meses). Em contraste, a indução de ACOH “*Acetanilide-4-hydroxylase*” (CYP1A2) foi maior nos animais mais velhos do que nos jovens.

Diferenças entre as linhagens quanto às atividades de EROD, MROD, BROD, PROD e NDMA-d também foram registradas neste estudo. Nossos resultados demonstraram que em relação às monooxigenases avaliadas, com exceção da NDMA-d, os camundongos DBA/2 apresentaram atividades maiores do que os *Swiss Webster*. Em

relação à atividade de COH, é bem documentado que, entre as linhagens de camundongos, a linhagem isogênica DBA/2 é a que melhor expressa CYP2A5, *i.e.*, possui alta atividade de COH (Iersel et al., 1994; Mäenpää et al., 1993). Não conseguimos, entretanto, obter na literatura dados sobre a atividade de COH na linhagem *Swiss Webster*. Após a realização dos ensaios de COH com os animais não infectados, confirmamos que a linhagem DBA/2 originária da CECAL-FIOCRUZ apresenta alta atividade e notamos, por outro lado, que as atividades da cumarina-7-hidroxilase eram muito baixas nos *Swiss Webster*.

As diferenças de comportamentos, entre as duas linhagens, quanto às atividades de cumarina 7-hidroxilase sugerem que, no caso do *Swiss Webster*, a reação de COH seja, provavelmente, catalisada de forma importante por outras isoformas, ainda que tenhamos utilizado baixas concentrações do substrato. A observação de Wood & Taylor (1979) *apud* Chang & Waxman, (1996) vem apoiar esta interpretação. Estes autores relataram que a anilina inibe preferencialmente a atividade de cumarina 7-hidroxilase em microsomas hepáticos de linhagens com fenótipo de metabolizadores intensos, enquanto que a “*metirapona*” inibe preferencialmente a atividade nas linhagens com fenótipo de metabolizadores pobres. Isto sugere que a 7-hidroxilação da cumarina é catalisada por diferentes enzimas nos dois grupos de camundongos, o que é consistente com a diferença de aproximadamente 10 vezes no K_m da 7-hidroxilação da cumarina entre microsomas hepáticos de camundongos C57BL/6J e DBA/2 (Chang & Waxman, 1996).

5.4 – Alterações da atividade da UDP-glicuronosiltransferase no fígado de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, 15 e 30 dias após infecção com *S. mansoni*

5.4.1 – Alterações da atividade de UDP-glicuronosiltransferase nos camundongos infectados com *S. mansoni*

Neste trabalho notamos que a velocidade de glicuronidação do *p*-nitrofenol em camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, não sofreu alteração 15 e 30 dias após a infecção com 100 cercárias de *S. mansoni*. Estes resultados sugerem que as atividades de UDP-glicuronosiltransferase não são afetadas na fase inicial da esquistossomose mansônica murina.

5.4.2 – Influência do sexo, idade e linhagem dos camundongos utilizados neste estudo sobre a atividade de UDP-glicuronosiltransferase

Não foram observadas, também, diferenças relacionadas ao sexo, às linhagens e às idades dos animais, sugerindo que a atividade da UGT se comporta de forma bastante homogênea em camundongos *Swiss Webster* e *DBA/2*, machos e fêmeas, com 25 e 40 dias de vida.

Estes resultados confirmam relatos encontrados na literatura a respeito de alterações das atividades de UGT ao longo do desenvolvimento do indivíduo. Matsumoto et al., (2002) demonstraram em ratos que, apesar das atividades de UDP-glicuronosiltransferase para glicuronidação para xenoestrógenos estarem ausentes em microsomas hepáticos de fetos, elas aumentam linearmente após o nascimento e alcançam o mesmo nível notado nos adultos a partir do 21º dia de vida pós-natal. Dannenberg & Zakim, (1992), por outro lado, mostraram que as enzimas responsáveis pela glicuronidação do 4-nitrofenol parecem estar diminuídas em ratos com a idade muito avançada. Os nossos resultados são coerentes, portanto, com o que havia sido relatado para ratos, indicando que nos camundongos das duas linhagens estudadas também não parece haver variação da atividade de UGT entre 25 e 40 dias de vida.

Diferenças entre os sexos quanto à UGT, tais como níveis de glicuronidação do 4-nitrofenol maiores nos machos do que nas fêmeas, e o oposto no caso da glicuronidação de estrógenos, têm sido relatadas (Guéraud et al., 1997). Segundo Guéraud & Paris (1998), apesar de diferenças entre os gêneros terem sido descritas para atividades de UGT em ratos, nenhum estudo foi realizado recentemente abordando a influência de hormônios sexuais sobre este dimorfismo.

Segundo Guéraud et al., (2003), a UGT parece ser modulada pelo estado hormonal, particularmente pelo hormônio de crescimento. Em ratos, o padrão de secreção do hormônio de crescimento parece influenciar a regulação de muitas enzimas citocromo P450 e de glutatona *S*-transferases, assim como a composição de ácidos graxos do microsomo (Guéraud et al., 1997; Waxman, 1992; Staffas et al., 1992). Guéraud et al., (1997) mostraram, também, que o hormônio de crescimento pode modificar de forma diferenciada a quantidade de várias UGTs presentes no fígado de ratos, particularmente a UGT 1A1, que está envolvida na conjugação da bilirrubina.

Embora a regulação de UGTs por hormônios tenha sido menos estudada do que a indução por xenobióticos, alguns autores têm evidenciado que hormônios tireoideanos

regulam as várias isoenzimas de forma diferente, aumentando a conjugação com 4-nitrofenol e diminuindo a glicuronidação da bilirrubina e da testosterona (Guéraud et al., 1997).

5.5 – Confronto dos resultados deste trabalho com os de outros estudos sobre alterações da biotransformação de xenobióticos em processos inflamatórios e infecciosos

Como mencionado anteriormente, tem sido descrito que, tanto em seres humanos como em animais de laboratório, infecções virais, bacterianas e parasitárias, e processos inflamatórios de vários tipos, alteram o metabolismo de fármacos e as atividades e níveis de expressão de diversas enzimas de biotransformação de xenobióticos (Renton, 2000; Morgan, 1997). De um modo geral, tem sido constatado que processos infecciosos e inflamatórios deprimem o metabolismo, aumentando a meia vida biológica ($T_{1/2}$) e, eventualmente, a toxicidade de fármacos (Renton, 2000). Os mecanismos subjacentes a esta depressão após a ativação dos sistemas de defesa do hospedeiro, entretanto, ainda não são bem conhecidos. A literatura sobre o assunto é vasta, mas esparsa, dispersando-se por inúmeros agentes infecciosos ou inflamatórios e diferentes momentos de evolução da doença / inflamação.

Em muitos casos, as atividades de isoformas de CYP estão diminuídas, mas algumas não são afetadas, ou estão induzidas em condições de infecção e inflamação, tanto no fígado, como em tecidos extra-hepáticos (Morgan, 2000). A CYP2E1, por exemplo, está induzida em astrócitos durante a inflamação no cérebro, enquanto a CYP1A1 está deprimida (Tindberg et al., 1996).

Neste estudo mostramos que, 15 dias após a infecção de camundongos com 100 cercárias de *S. mansoni*, não ocorreram alterações da concentração total de CYPs ou da atividade de CYP1A, 2A, 2B e 2E, bem como da UGT. Observamos também, que 30 dias após a infecção, não houve modificações das concentrações totais de CYPs, mas foram notadas alterações das atividades de algumas isoenzimas CYP, alterações estas que ocorreram de forma discreta e em ambas as direções (aumento e diminuição), dependendo do sexo e da linhagem do animal. Neste trabalho constatamos ainda que as atividades de CYP1A estavam aumentadas nos *Swiss Webster*, de ambos os sexos, e diminuídas nos DBA/2. A atividade de BROD (CYP2B) estava aumentada nas duas linhagens. No entanto, a atividade de PROD, considerada também um marcador de

CYP2B, bem como a atividade de COH (CYP2A5) não sofreram alterações. A atividade da NDMA-d (CYP2E1) foi aumentada pela infecção somente nos camundongos *Swiss Webster* machos (tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Alterações das atividades de enzimas citocromo P450 na fração microsossomal hepática de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, machos e fêmeas, infectados com 100 cercárias de *S. mansoni*, 30 dias após a infecção.

Atividade	<i>Swiss Webster</i>	DBA/2
EROD	$(\bar{e} \alpha) > 60\%$	$(\alpha) < 40\%$
MROD	$(\bar{e} \alpha) > 30\%$	$(\alpha) < 50\%$
BROD	$(\alpha) > 40\%$	na
NDMA-d	$(\bar{e}) > 26\%$	$(\alpha) < 10\%$

Os valores representam a porcentagem de aumento (>) ou diminuição (<) – em relação aos respectivos controles não infectados (=100%) - das atividades de EROD (etoxiresorufina-*O*-desetilase), MROD (metoxiresorufina-*O*-desmetilase), BROD (benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase) e NDMA-d (nitrosodimetilamina desmetilase). N = 6 *pools* de fígados de 3 animais. na = não alterado.

Estes resultados contrastam com a consistente elevação das atividades de enzimas de biotransformação na fase inicial da esquistossomose murina descrita por Sheweita e colaboradores em uma série de trabalhos (tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Alterações dos níveis totais e das atividades de enzimas citocromo P450 e da atividade da glutathiona-S-transferase em fígado de camundongos Balb/C, machos, infectados com 120 cercárias de *S. mansoni*, 33 dias após a infecção.

Reação	Alteração
CYPs totais	> 48%
EROD	> 63%
AHH	> 65%
PROD	> 44%
GST	> 50%

Os valores representam a porcentagem de aumento dos níveis totais de CYPs e das atividades de EROD (etoxiresorufina-*O*-desetilase), AHH (“*aryl hydrocarbon hydroxylase*”), PROD (pentoxiresorufina-*O*-desbenzilase) e GST (glutathiona-S-transferase). N = fígados de 5 animais por grupo.

Sheweita et al., (1998) relataram que, em camundongos da linhagem Balb/c, o conteúdo total de CYPs e a atividade da AHH “*Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*” estavam aumentados na fração microsossomal hepática 33 dias após a infecção com *S. mansoni*. Como verificamos em trabalhos anteriores,(Fidalgo-Neto et al., 2004), e tem

sido notado por outros autores (Lenzi et al., 1987), nesta fase da esquistossomose mansônica murina (33 dias) os vermes ainda não alcançaram a plena maturidade sexual – *i.e.*, a oviposição está apenas iniciando – e são raros os ovos depositados no fígado e, conseqüentemente, os processos inflamatórios granulomatosos. Este aumento generalizado de CYPs na fase inicial da esquistossomose mansônica murina (33 dias) descrito por Sheweita et al., (1998) parece destoar do que tem sido observado em vários outros modelos experimentais de parasitoses e infecções (Biro et al., 1994; Galtier et al., 1983; Azri & Renton, 1991).

Sheweita et al., (2001) também observaram aumento das atividades de etoxicumarina-*O*-desetilase, etoxioresufina-*O*-desetilase, dimetilnitrosamina *N*-desmetilase, AHH “*Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*”, pentoxioresufina-*O*-despenteilase e da glutatona *S*-transferase em fragmentos de bexiga urinária de pacientes infectados pelo *Schistosoma haematobium*. Na esquistossomose causada pelo *S. haematobium*, que é endêmica no Egito e em outros países da África, os ovos depositam-se na bexiga, formando-se em torno dos mesmos uma reação inflamatória. Como a associação de esquistossomose urinária e câncer de bexiga em seres humanos parece ser bem estabelecida, os dados de Sheweita et al., (2001) sugerem que o aumento da atividade de isoenzimas (*e.g.* CYP1A1, 2E1) envolvidas na ativação de carcinógenos químicos poderia ter um importante papel neste sentido. Existem, de fato, evidências sobre a participação da infecção esquistossomótica no desenvolvimento de câncer de bexiga (Mostafa et al., 1999; Bedwani et al., 1998; El-Garem, 1998). As evidências sobre uma possível relação causal entre esquistossomose mansônica e câncer de fígado, no entanto, são limitadas.

Vários estudos experimentais têm demonstrado uma estreita relação entre a evolução dos processos infecciosos e inflamatórios, e alterações de expressão e atividade de enzimas de biotransformação. Neste sentido, Chomarat et al., (1997) encontraram um aumento das atividades de CYP1A2 e 2A5 em camundongos infectados com *Helicobacter hepaticus*. Este aumento estava relacionado ao avanço da doença. A influência do tempo de evolução de doenças infecciosas na intensidade das alterações de enzimas de biotransformação, no entanto, já havia sido relatada anteriormente por Galtier et al., (1983) em ratos infectados com *Fasciola hepatica*. Galtier et al., (1983) verificaram, em ratos, que o conteúdo total de CYPs, bem como as atividades de anilina hidroxilase e aminopirona desmetilase estavam profundamente deprimidas, 4 semanas após a infecção. Esta depressão começava a regredir entre 6 e 8

semanas e, 12-14 semanas após a infecção, os níveis de CYPs totais e as atividades enzimáticas tornavam-se comparáveis àquelas observadas em ratos não infectados.

Ebeid *et al.*, (2000) demonstraram que ocorre uma diminuição na concentração de proteínas totais, bem como de CYPs totais, na fração microssomal hepática de camundongos infectados com *S. mansoni*. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Sheweita *et al.*, (1998), Habib *et al.*, (1996) e Sheweita & Mostafa (1995). No entanto, esta diminuição na concentração de proteínas totais e CYPs totais na fração microssomal hepática foi observada a partir de 6-7 semanas após a infecção, quando os vermes estão sexualmente amadurecidos e começam a por ovos. Em contraste com estes resultados, foi observado um aumento no conteúdo total e das atividades de citocromos P450, em camundongos infectados com *S. mansoni*, durante o estágio inicial da doença (Sheweita & Mostafa, 1995; El-Mouelhi *et al.*, 1987).

Awney *et al.*, (2001) verificaram que, em camundongos machos Balb/c adultos infectados com diferentes cargas parasitárias de *S. mansoni* (60 – 600 cercárias / animal) e sacrificados 33 dias após a infecção, ocorreu um aumento da mutagenicidade do benzo(a)pireno e da atividade da AHH “*Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*”. Sheweita *et al.*, (1998) observaram também um aumento da atividade da AHH “*Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*” e da glutatona *S*-transferase em camundongos machos Balb/c adultos 33 dias após a infecção com diferentes cargas parasitárias de *S. mansoni* (60 – 600 cercárias / animal). É importante notar, no entanto, que estes aumentos não chegaram a dobrar os valores das atividades registrados nos controles não infectados.

O aumento da expressão e da atividade de enzimas de biotransformação, em consequência de infecções / inflamação, é bem menos frequentemente relatado do que a depressão destas enzimas. Tem sido amplamente demonstrado que, em diferentes espécies, a infecção com parasitas leva a um declínio da biotransformação. Entre as helmintoses, um dos exemplos mais comuns, é o da depressão do metabolismo de xenobióticos pela infecção com *Fasciola hepatica* (Biro *et al.*, 1994; Galtier *et al.*, 1983).

Foi descrito que a *N*-desmetilação da monometilaminopirona, a oxidação do hexobarbital, a hidroxilação da anilina e a hidrólise do parooxon estão inibidas em camundongos infectados com *S. mansoni* (Ghazal *et al.*, 1974). Uma acentuada redução da atividade de monooxigenases hepáticas em camundongos infectados experimentalmente com *S. mansoni* também foi relatada por Cha & Bueding (1978) e Cha & Edwards (1976). Neste mesmo sentido, Coelho *et al.*, (1977) demonstraram que

camundongos da linhagem *Swiss Webster* infectados com *S. mansoni*, em que foram recuperados quatro ou mais vermes do sexo feminino, exibiam um notável aumento do tempo de sono após a administração de pentobarbital.

Cha et al., (1980), por outro lado, verificaram que a atividade de enzimas microssomais não estava diminuída quando a infecção era unissexual (animais infectados apenas com parasitos machos ou fêmeas) e não havia, portanto, oviposição. Estes mesmos autores constataram também que, em camundongos atímicos (*“athymic nude mice”*), não ocorria depressão das enzimas microssomais, sugerindo que esta inibição seria uma consequência do processo inflamatório (granuloma) em torno dos ovos.

Uma hipótese levantada por alguns autores para explicar a diminuição do conteúdo total e das atividades de CYPs, após a deposição de ovos no fígado, é a desnaturação de CYPs transformados em sua forma inativa CYP422 (Habib et al., 1996; Sheweita & Mostafa, 1995). A desnaturação tem sido interpretada como consequência de diferentes reações patológicas que se seguem à deposição de ovos no tecido hepático, incluindo a formação de granulomas e reações fibrinogênicas (Badawi & Mostafa, 1993). A necrose celular e a degeneração das organelas, incluindo o retículo endoplasmático, também poderiam resultar na diminuição do conteúdo microssomal de CYPs (Ebeid et al., 2000).

É possível, também, que a diminuição das atividades de enzimas citocromo P450 na inflamação, a curto e a longo prazos, ocorra através de diferentes mecanismos, podendo envolver a participação de alguns hormônios (Morgan, 1997). De fato, estímulos inflamatórios causam estresse e envolvem alterações nos níveis de muitos hormônios, como glicocorticóides, epinefrina, glucagon e hormônio de crescimento, que podem estar envolvidos na regulação de citocromo P450 (Morgan, 2001; Iber et al., 1999).

Segundo Morgan (1989), a regulação de CYP também poderia estar relacionada a um estímulo da produção de proteínas de fase aguda. Neste sentido, a supressão da expressão de CYPs poderia ser uma consequência da necessidade do fígado aumentar, drasticamente, a síntese de proteínas de fase aguda, que desempenham importante papel no controle da resposta inflamatória sistêmica. Morgan (2001), afirma, no entanto, que esta interpretação é questionável, porque diferentes enzimas citocromo P450 parecem ser reguladas através de diferentes mecanismos.

Como as citocinas são os principais mediadores envolvidos na indução de produção de proteínas de fase aguda durante a inflamação, sua participação na regulação de enzimas citocromo P450 também tem sido investigada (Morgan, 2001). Tem sido demonstrado que a administração de citocinas e interferons altera, em geral diminuindo, a atividade de diferentes isoformas citocromo P450 (Morgan, 2001; Renton, 2000). As citocinas, assim como os interferons, regulam a expressão de proteínas de fase aguda e da óxido nítrico sintase induzível. Entretanto, os mecanismos de regulação de CYPs por citocinas e interferons ainda são pouco conhecidos (Morgan et al., 2002).

Como já foi mencionado anteriormente, citocinas induzem a óxido nítrico sintase nos hepatócitos, resultando em um aumento expressivo da produção de óxido nítrico no fígado. O óxido nítrico pode se ligar às enzimas CYP, causando sua inibição reversível ou irreversível (Morgan et al., 2002). A reação do óxido nítrico com a anion peroxidase, pode produzir peroxinitrito, resultando na oxidação das proteínas e reações de nitração de um resíduo específico de tirosina, além de reduzir os níveis de glutathione reduzida, tornando a célula mais suscetível ao estresse oxidativo. Desta forma, a redução de CYPs seria um mecanismo de proteção da célula contra os efeitos deletérios de espécies oxidativas (Morgan et al., 2002; Morgan, 2001; Iber et al., 1999).

Além disso, a *down-regulation* de CYPs durante a resposta inflamatória poderia estar relacionada ao seu papel na formação de metabólitos biologicamente ativos do ácido araquidônico, que possuem propriedades antiinflamatórias. Neste sentido, a diminuição de CYPs na inflamação preveniria a inibição da resposta inflamatória, que é em última análise, um mecanismo de defesa do organismo (Morgan, 2001). É importante salientar que, em alguns modelos experimentais, a infecção / inflamação, pode ter levado à redução da ingestão de alimentos (hipofagia), o que pode ter contribuído também para a alteração da expressão de algumas isoenzimas citocromo P450 (Morgan, 2001).

Neste trabalho investigamos as alterações de CYPs que ocorrem no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni*, antes do aparecimento das reações inflamatórias produzidas em torno dos ovos do parasito retidos no tecido hepático. Escolhemos portanto um momento inicial da evolução da esquistossomose murina (15 e 30 dias pós-infecção), em que não são observadas lesões granulomatosas no tecido hepático, nem há a intensa fibrose hepática, notada em fases mais avançadas da doença (e.g. 90 dias pós- infecção).

A análise da atividade de algumas isoenzimas CYP em fases mais avançadas da doença (55 e 90 dias pós-infecção) tem mostrado que, de modo geral, estas atividades estão deprimidas nas fases intermediária e tardia da esquistossomose mansônica. De acordo com os dados de Sheweita et al, (1998), estas alterações de enzimas microssomais hepáticas seguiriam, ao longo do tempo, um curso bifásico, com a indução – antes da formação dos granulomas – precedendo a inibição que ocorre após o aparecimento das reações inflamatórias ao redor dos ovos. Os nossos resultados, no entanto, indicam que o sentido destas alterações é monotônico ocorrendo apenas a inibição após o aparecimento dos granulomas.

Sendo assim, nossos resultados não confirmam a pronunciada elevação das atividades de enzimas microssomais na fase inicial da esquistossomose mansônica murina, descrita por Sheweita e colaboradores em diversos trabalhos. Este aumento, quase que generalizado de enzimas de biotransformação na fase inicial da esquistossomose, contrasta com o que tem sido observado em outros modelos de infecção / inflamação, não tendo Sheweita e colaboradores tentado explicar os mecanismos subjacentes a esta alteração.

Vale ressaltar que os trabalhos destes pesquisadores envolveram camundongos machos Balb/c, infectados na idade adulta, com carga parasitária variável. Não acreditamos, entretanto, que a carga parasitária seja responsável pela diferença entre os nossos resultados e aqueles descritos por Sheweita e colaboradores, uma vez que eles observaram aumento das atividades de diferentes enzimas microssomais, inclusive em camundongos infectados com apenas 60 cercárias *de S. mansoni*. Outra diferença foi a linhagem de camundongos (BALB/c) empregada por Sheweita e colaboradores. Embora seja pouco provável, a hipótese de que BALB/c se comporte de forma diferente das duas linhagens que usamos (*Swiss Webster* e DBA/2), não pode ser inteiramente descartada. A idade dos animais na época da infecção, 10 dias no nosso experimento, e adultos, no caso de Sheweita e colaboradores, poderia, eventualmente, explicar a discrepância de resultados.

Desta forma, em estudos subsequentes, pretendemos avaliar as alterações das enzimas microssomais na fase inicial da esquistossomose (15 e 30 dias após a infecção), em camundongos infectados na idade adulta. Exceto pela possível relevância dos fatores idade e linhagem, não temos outra hipótese para explicar a discrepância entre os nossos resultados e o que foi relatado por Sheweita e colaboradores, apontando uma consistente

elevação das atividades de isoformas CYP450s hepáticas na fase inicial (pré-granuloma) da esquistossomose mansônica murina.

6 – CONCLUSÕES

- A esquistossomose mansônica murina, na fase inicial da evolução da doença, (15 e 30 dias após a infecção), quando ainda não são observados granulomas no tecido hepático, não alterou o conteúdo total de CYPs na fração microsomal hepática de camundongos *Swiss Webster* e DBA/2 machos e fêmeas.
- As atividades das enzimas de fase I e II de biotransformação de xenobióticos analisadas neste estudo, 15 dias após a infecção com *S. mansoni*, não estão alteradas nos camundongos *Swiss Webster* e DBA/2.
- 30 dias após a infecção, a atividade de etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD) e metoxiresorufina-*O*-desmetilase (MROD) está discretamente aumentada em *Swiss Webster* e diminuída em DBA/2 de ambos os sexos.
- A infecção com *S. mansoni* aumentou, 30 dias após a infecção, as atividades de benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD) em *Swiss Webster* fêmeas e de nitrosodimetilamina-desmetilase (NDMA-d) em *Swiss Webster* machos, e diminuiu esta última atividade em DBA/2 machos.
- Camundongos *Swiss Webster* e DBA/2, dos dois sexos, não apresentaram alterações das atividades de pentoxiresorufina-*O*-despencilase (PROD), de cumarina 7-hidroxilase (COH) ou UDP-glicuronosiltransferase (UGT) na fase inicial da esquistossomose mansônica.
- Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, na fase inicial da esquistossomose mansônica murina, quando ainda não são observadas lesões granulomatosas no tecido hepático, não ocorre alteração do conteúdo total de citocromo P450, bem como da atividade de CYP2A5 e UGT. Os resultados também mostram que as atividades de CYP1A1/2, 2B9/10 e 2E1 apresentam alterações discretas, distintas e em ambas as direções, que dependem do sexo e da linhagem dos animais.

- Em síntese, as alterações na expressão e atividade de enzimas microsossomais hepáticas de biotransformação que ocorrem na fase inicial da esquistossomose mansônica murina não são generalizáveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, Z.A., 1987. Pathology of human schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 17-23.

AWNEY, H. A., GHZLAN, H. E., SHEWEITA, S. A. & MOSTAFA, M. H., 2001. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection increased the mutagenicity of benzo(a)pyrene, the activity of aryl hydrocarbon hydroxylase and the formation of hepatic microsomal hydrogen peroxide. *Toxicology*, 163: 213 – 218.

AZRI, S. & RENTON K. W., 1991. Factors involved in the depression of hepatic mixed function oxidase during infection with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Immunopharmacology*, 13: 197 – 204.

BADAWI, A. F., MOSTAFA, M. H., 1993. Possible mechanisms of alteration in the capacity of carcinogen-metabolizing enzymes during schistosomiasis and their role in bladder cancer induction. *Journal of International Medic Research*, 21: 281-287.

BEDAWANI, R., RENGANATHAN, E., EL KWHSKY, F., BRAGA, C., ABILAZM, T., ZAKI, A., FRANCESCHI, S., BOFFETTA, P. & LA VECCHIA, C., 1998. Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *British Journal of Cancer*, 77 (7): 1186 – 1189.

BIRO, S. B., ECKHOUTTE, C., SUTRA, J. F., CALLEJA, C. ALVINERIE, M. & GALTIER, P., 1994. Consequences of challenge infections with *Fasciola hepatica* on rat liver P450-dependent metabolism of Sex hormones. *The Journal of Steroid Biochemistry and MolecularBiologl*, 51: 209 – 217.

BOCK, K. W., BURCHELL, B., DUTTON, G. J., HÄNNINEN, O., MULDER, G. J., OWENS, I. S., SIEST, G. & TEPHLY, T. R., 1983. UDP-Glucuronosyltransferase activities – Guidelines for consistent interim terminology and assay conditions. *Biochemical Pharmacology*, 32 (6): 953-955.

BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.

BRUNET, L. R., DUNNE, D. W. & PEARCE, E. J., 1998. Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Today*, 14 (10): 422-427.

BURCHELL, B., NEBERT, D. W., NELSON, D. R., BOCK, K. W., IYANAGI, T., JANSEN, P. L. M., LANCET, D., MULDER, G. J., CHOWDHURY, J. R., SIEST, G., TEPHLY, T. R. & MACKENZIE, P. I., 1991. The UDP-glucuronosyltransferase-gucuronosyltransferase gene superfamily: suggested nomenclature based on evolutionary divergence. *DNA and Cell Biology*, 10: 487 – 494.

BURKE, M. D., THOMPSON, S., ELCOMBE, C. R., HALPERT, J. HAAPARANTA, T. & MAYER, R. T., 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benziloxypheinoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochemical Pharmacology*, 34 (18): 3337-3345.

BURKE, M. D., THOMPSON, S., WEAVER, R. J., WOLF, C. R. & MAYER, R. T., 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxiresorufin-*O*-dealkylation in human and rat liver. *Biochemical Pharmacology*, 48 (5): 923 – 936.

CHANG, T. K. H. & WAXMAN, D. J., 1996. CYP2A subfamily. In: *Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, (C., IOANNIDES org), pp. 99 – 134, 1st edition, New York, Boca Raton, CRC Press.

CHA, Y. N., BRYAN, J. E., HEINE, H. S. & BUEDING, E., 1980. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29 (2): 234 – 238.

CHA, Y. N., BUEDING, E., 1978. Recovery of the hepatic drug-metabolizing capacity in mice infected with *Schistosoma mansoni* following curative chemotherapy with the schistomicide 4-isothiocyano-4'-nitro-diphenylamine (CGP450). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27 (6): 1188 – 1191.

CHA, Y. N. & EDWARDS, R., 1976. Effects of *Schistosoma mansoni* infection on the hepatic drug-metabolizing capacity of mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 199: 432 – 440.

CHEEVER, A. W., LENZI, J. A., LENZI, H. L. & ANDRADE, Z. A., 2002. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97 (7): 917 – 940.

CHEEVER, A. W. & ANDRADE, Z. A., 1967. Pathological lesions associated with *S. mansoni* in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 28: 626-639.

CHOMARAT, P., SIPOWICZ, M. A. DIWAN, B. A., FORNWALD, L. W., AWASTHI, Y., C., ANVER, M. R., RICE, J. M., ANDERSON, L. M. & WILD, C. P., 1997. Distinct time courses of increase in cytochrome P450 1A2, 2A5 and glutathione S-transferases during the progressive hepatitis associated with *Helibacter hepaticus*. *Carcinogenesis*, 18: 2179 – 2190.

COELHO, P. M., FREIRE, A. C., ARAÚJO, F. C., PELLEGRINO, J., PEREIRA, L. H., 1977. Effect of *Schistosoma mansoni* on pentobarbital-induced sleeping-time in mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 26 (1): 186 – 187.

DANNAN, G. A., GUENGERICH, F. P. & WAXMAN, D. J., 1986. Hormonal regulation of rat liver microsomal enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 261: 10728 – 10735.

DANNENBERG, A. J. & ZAKIM, D., 1992. Dietary lipids regulate the amount and functional state of UDP-glucuronosyltransferases in rat liver. *The Journal of Nutrition*, 122: 1607 – 1613.

DIMMETTE, R., ELWI, A. & SPROAT, H., 1956. Relationship of scistosomiasis and adenocarcinoma of large intestine. *American Journal of Parasitology*, 51: 307 – 321.

EBEID, F. A., SEIF EL-DIN, S. H. & EZZAT, A. R., 2000. Effect of *Schistosoma mansoni* infection and treatment on drug metabolizing enzymes. *Drug Research*, 50 (2): 867-874.

EL-BASSIOUNI, E. A., MOSTAFA, M. H., EL-SEWEDY, S. M., EL-MELIGY, S., ABDEL-AZIZ, T. & ABDEL-RAFEE, A., 1984. Hepatic microsomal enzymes in *S. mansoni* infected mice: II. Effect of duration of infection and lindane administration on aminopyrine demethylase and aniline hydroxylase. *Journal of Environmental Science and Health*, 19: 193 – 207.

EL-BOUKAINY, M. MOKHTARM, N. & GHONEIM, M., 1981. The impact of schistosomiasis on pathology of bladder carcinoma. *Cancer Research*, 48: 2643 – 2648.

EL-GAREM, A. A., 1998. Schistosomiasis. *Digestion*, 59 (5): 589 – 605.

EL-MOUELHI, M., BLACK, M. & PHILLIPS, S. M., 1987. Hepatic cytochrome P450 system in experimental hepatosplenic schistosomiasis. *Biochemical Pharmacology*, 36 (16): 2621 – 2626.

FIDALGO-NETO, A. A., CARVALHO, R. R., Oliveira, A.C.A.X., ROCHA, D.A.M. & PAUMGARTTEN, F.J.R., 2004. Penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in suckling and adult Swiss Webster and DBA-2 mice. *Journal of Experimental Animal Science*, 43(1): 29 – 38.

FRIEDBERG, T., GRASSOW, M. A, BARTLOMOWICS-OESCH, B., SIEGERT, P., ARAND, M., ADESNIK, M. & OESCH, F., 1992. Sequence of a novel CYP2B cDNA coding for a protein which is expressed in a sebaceous gland but not in the liver. *Biochemical Journal*, 287:775 – 781.

GALTIER, P., BATTAGLIA, A., MORE, J. & FRANC, M., 1983. Impairment of drug metabolism by the liver in experimental fascioliasis in the rat. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 35: 729 – 733.

GHANDOUR, A. M. & WEBBE, G., 1976. A comparative study of the death of Schistosomula of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in the skin of mice

and hamsters. *Journal of Helminatology*, 50: 39- 43.

GHAZAL, A., ZEITOUN, M. M., HASSANEEN, E. A., SELIM, M. M., 1974. Effect of schistosomal infection and of schistosomicidal drug on drug metabolizing enzymes of mouse liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 282 (2): 181 – 186.

GIBSON, G. & SKETT, P., 1994. *Introduction to drug metabolism*, 2nd edition, New York, Blackie Academic & Professional Publishers.

GREENLEE, W. F. & POLAND, A., 1978. An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2 mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 250 (3): 596 – 605.

GUENGERICH, F. P., 1994. Catalytic selectivity of human cytochrome P450 enzymes: Relevance to drug metabolism and toxicity. *Toxicology Letters*, 70: 133 – 138.

GUENGERICH, F. P., KIM, D. H. & IWASAKI, M., 1991. Role of human cytochrome P450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chemical Research in Toxicology*, 4: 168 – 179.

GUENGERICH, F.P. & MACDONALD, T.L., 1990. Mechanism of cytochrome P450 catalysis. *The FASEB Journal*, 4: 2453 – 2459.

GUÉRAUD, F., DAVELOOSE, D., VEZIN, H., VIRET, J. & PARIS, A., 2003. In vivo modification of the UDP-glucuronosyltransferase functional state in rat liver following hypophysectomy and partial or complete hormonal restoration. *Journal of Biochemistry*, 134: 641 – 653.

GUÉRAUD, F. & PARIS, A., 1998. Glucuronidation: A dual control. *General Pharmacology*, 31 (5): 683 – 688.

GUÉRAUD, F. MASMOUDI, T., GOUDONNET, H. & PARIS, A., 1997. Differential effect of hypophysectomy and growth hormone treatment on hepatic

glucuronosyltransferases in male rats: evidence for an action at pretranslational level for isoforms glucuronidating bilirubin. *Biochemical Pharmacology*, 53: 1637 – 1647.

HABIB, S. L. SHEWEITA, S. A., AWAD, A. T., 1996. Influence of *S. mansoni* infection on carcinogen-metabolizing capacities and in vitro aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Current Oncology Reports*, 3, 769 - 773.

HONKAKOSKI, P., AURIOLA, S. & LANG, M. A., 1992. Distinct induction profiles of three phenobarbital-responsive mouse liver cytochrome P450 isoenzymes. *Biochemical Pharmacology*, 43: 2121 – 2128.

IBER, H., SEWER, M. B., BARCLAY, T. B., MITCHELL, S. R., LI, T. & MORGAN, E. T., 1999. Modulation of drug metabolism in infectious and inflammatory diseases. *Drug Metabolism Reviews*, 31 (1): 29-41.

IERSSEL, M. V., WALTERS, D. G., PRICE, R. J., LOVELL, D. P. & LAKE, B. G., 1994. Sex and strain differences in mouse hepatic microsomal coumarin 7-hydroxylase activity. *Progress in Chemical Toxicology*, 32 (4): 387-390.

IOANNIDES, C. & PARKE, D. V., 1990. The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metabolism Review*, 22 (1): 1 – 85.

JARUKAMJORN, K., SAKUMA, T. YAMAMOTO, M. OHARA, A. & NEMOTO, N., 2001. Sex-associated expression of mouse hepatic and renal CYP2B enzymes by glucocorticoid hormones. *Biochemical Pharmacology*, 62: 161 – 169.

JARUKAMJORN, K., SAKUMA, T. & NEMOTO, N., 2002. Sexual dimorphic expression of mouse hepatic CYP2B: alterations during development or after hypophysectomy. *Biochemical Pharmacology*, 63: 2037 – 2041.

KAWAJIRI, K. & HAYASHI, S. I., 1996. CYP1 Family. In: *Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, (C., IOANNIDES, org), 1st edition, New York, Boca Raton, CRC Press.

KOKWARO, G. O., SZWANDT, I. S., GLAZIER, A. P., WARD, S. A. & EDWARDS, G., 1993. Metabolism of caffeine and theophylline in rats with malaria and endotoxin-induced fever. *Xenobiotica*, 23 (12): 1391 – 1397.

LANG, M. A., JUVONEN, R., JÄRVINEN, P., PAAVO, H. & RAUNIO, H., 1989. Mouse liver P450Coh: Genetic regulation of the pyrazole-inducible enzyme and comparison with other P450 isoenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 271 (1): 139-148.

LEIGHTON, J. K. & KEMPER, B., 1984. Differential induction and tissue-specific expression of closely related members of phenobarbital-inducible rabbit cytochrome P-450 gene family. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 11165 – 11168.

LEWIS, D. F., 1996. *Cytochrome P450 structure, function and mechanism*. (TAYLOR & FRANCIS), 1st edition, London, Bristol, T. J. Press.

LEWIS, D. F. & PRATT, J. M., 1998. The catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metabolism Reviews*, 30 (4): 739 – 786.

LINDBERG, R. & NEGISHI, M., 1989. Alteration of mouse cytochrome P450coh substrate specificity by mutation of a single amino acid residue. *Nature*: 336:632 – 634.

MCCARTHY, J. S., FURNER, R. L., VAN DYKE, K., STITZEL, R. E., 1970. Effects of malarial infection on host microsomal drug-metabolizing enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 19 (4): 1341 – 1349.

MACKENZIE, P. I., RODBOURNE, L. & STRANKS, S., 1992. Steroid UDP-glucuronosyltransferase glucuronosyltransferases. *The Journal of Steroid Biochemistry*, 43: 1099 – 1105.

MACLEOD J. N., SORESEN, M.P. & SHAPIRO, B. H., 1987. Strain independence elevation of hepatic monooxygenase enzymes in female mice. *Xenobiotica*, 17: 1095 – 1102.

MÄENPÄÄ, J., SIGUSCH, H., RAUNIO, H., SYNGELMÄ, T., VUORELA, P., VUORELA, H. & PELKONEN, O., 1993. Differential inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in mouse and human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 45(5): 1035-1042.

MANSUY, D., 1998. The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 121:5 – 14.

MARTIN, S. T. & BLACK, S. D., 1994. Detergent effects in rabbit liver microsomal UDP-Glucuronosyltransferase studied by means of continuous spectrophotometric assay with *p*-nitrofenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 200(2): 1093-1098.

MATSUMOTO, J., YOKOTA, H. & YUASA, A., 2002. *Environmental Health Perspectives*, 110 (2): 193 – 196.

MINERS, J. O. & MACKENZIE, P. I., 1991. Drug glucuronidation in humans. *Pharmacology & Therapeutics*, 51: 347 – 369.

MINERS, J. O. & MACKENZIE, P. I., 1992. Drug metabolism in humans. *Pharmacology & Therapeutics*, 51: 347 – 369.

MORGAN, E. T., 2001. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: Why and how? – Minireview - *Drug Metabolism and Disposition* , 29 (3): 207 – 212.

MORGAN, E. T., LI-MASTERS, T. & CHENG, P. Y., 2002. Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology*, 181-182: 207 – 210.

MORGAN, E. T., 1997. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metabolism Reviews*, 29 (4): 1129-1188.

MORGAN, E. T., 1989. Suppression of constitutive cytochrome P450 gene in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxine. *Molecular Pharmacology*, 36 (5): 699 – 707.

MOSTAFA, M. H., SHEWEITA, S. A., & ABDEL-MONEAM, N., 1990. Influence of some anti-inflammatory drugs on the activity of aryl hydrocarbon hydroxylase and cytochrome P-450 content. *Environmental Research*, 52: 77 – 82.

MOSTAFA, M. H., SHEWEITA, S. A., EL-KOWEDY, A. H. & BADAWI, A. F., 1993. Alteration in the carcinogen-metabolizing capacities of mouse liver during *S. mansoni* infection. *International Journal of Oncology*, 2: 694 – 699.

MOSTAFA, M. H., SHEWEITA, S. A. & O'CONNOR, P. J., 1999. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1): 97 – 115.

NAIK, Y. S. & HASLER, J., 1995. Intensity of *Schistosoma mansoni* infection determines alterations in hepatic drug metabolism. *J Egypt Soc Parasitol*, 25: 157 – 163.

NASH, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemistry*, 55:416-421.

NEBERT, D.W., NELSON, D.R., COON, M. J., ESTABROOK, R.W., FEYEREISEN, R., FUJII-KURIYAMA, Y., GONZALEZ, F.J., GUENGERICH, F.P., GUNSALUS, I.C., JOHNSON, E.F., LOPER, J.C., SATO, R., WATERMAN, M.R. & WAXMAN, D.J., 1991. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 10: 1 – 14.

NEGISHI, M. IWASAKI, M., JUVONEN, R. O., SUEYOSHI, T., DARDEN, T. A. & PEDERSEN, L. G., 1996. Structural flexibility and functional versatility of cytochrome P450 and rapid evolution. *Mutation Research*, 350: 43 – 50.

NELSON, D. R., 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 369 (1): 1 – 10.

NELSON, D. R., KAMATASI, T., WAXMAN, D. J., GENGUERICH, F. P., ESTABROOK, R. W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F. J., COON, M. J. & GUNSALUS, I. C., 1993. The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12: 1 –

51.

NELSON, D. R., KOYMANS, L. KAMATAKI, T. STEGEMAN, J. J. FEYEREISEN, R., WAXMAN, D. J., WATERMAN, M. R., GOTOH, O., COON, M. J., ESTABROOK, R. W., GUNSALUS, I. C. & NEBERT, D. W., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6: 1 – 42.

NEMOTO, N. & SAKURAI, J., 1995. Glucocorticoid and Sex hormones as activating or modulating factors for expression of Cyp2b-9 and Cyp2b-10 in the mouse liver and hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319 (1): 286 – 292.

NERURKAR, P. V., PARK, S. S., THOMAS, P. E., NIMS, R. W. & LUVET, R. A., 1993. Methoxyresorufin and benziloxymethoxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochemical Pharmacology*, 46 (5): 933-943.

NIMS, R. W. & LUBET, R. A., 1996. CYP2B Subfamily. In: *Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, (C., IOANNIDES), pp. 136 – 151, 1st edition, New York, Boca Raton, CRC Press.

OMURA, T., 1999. Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266 (3): 690 – 698.

OMURA, T. & SATO, R., 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I- Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7):2370-2378.

OMURA, T. & SATO, R., 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *The Journal of biological Chemistry*, 237: 1375 – 6.

PAMPORI, N. A. & SHAPIRO, B. H., 1999. Gender differences in the responsiveness of the Sex-dependent isoforms of hepatic P450 to the feminine plasma growth hormone profile. *Endocrinology*, 140: 1245 – 1254.

PARKINSON, A., 2001. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, (C. D., KLAASSEN, org), pp. 113 – 186, 9th edition, New York, McGraw_Hill, Inc.

PATON, T. E. & RENTON, K. W., 1998. Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in hepal cells. *Biochemical Pharmacology*, 55: 1791-1796.

PEARCE, R., GREENWAY, D. & PARKINSON, A., 1992. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol and testosterone oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298: 211 – 225.

PEGRAN, R. A., DILIBERTO, J. J., MOORE, T. C., GAO, P. & BIRNBAUM, L. S., 1995. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) distribution and cytochrome P450 induction in young and senescent male mice. *Toxicology Letters*, 76: 119 – 126.

PELKONEN, P., HONKAKOSKI, P., GENESTE, O., BARTSCH, H. & LANG, M. A., 1993. Comparison of hamsters and mouse reveals interspecies differences in the regulation of hepatic CYP2A isoenzymes. *Biochemistry & Pharmacology*. 46 (10): 1681 – 1687.

PEREIRA, L. H., 1997. *Schistosoma mansoni* (primeira parte). In: *Parasitologia Humana* (D. P. NEVES, A. L. de MELO, O. GENARO & P. M. LINARDI, org), pp. 212 - 225, São Paulo, Editora Atheneu.

POSTI, K., LEINONEN, S., TETRI, S., KOTTARI, S., VITALA, P., PELKONEN, O. & RAUNIO, H., 1999. Modulation of murine phenobarbital-inducible CYP2A5, CYP2A10 e CYP1A enzymes by inhibitors of protein kinases and phosphatases. *European Journal of Biochemistry*, 264: 19 – 26.

RENTON, K. W., 2001. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, 92: 147-163.

RENTON, K. W., 2000. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicology*, 142: 173-178.

RENTON, K. W., 1986. Factors affecting drug biotransformation. *Clinical Biochemistry*. 19 (2): 72 – 75.

REY, L., 1991. *Parasitologia – Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 3ª edição, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

SANTOS, B. F., 2002. Criação e manejo de camundongos. In: *Animais de Laboratório – Criação e Experimentação* (A. ANDRADE, S. C. PINTO & R. S., OLIVEIRA, org), 115 – 118 p., Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ.

SHARMA, M. C., AGRAWAL, A. K., SHARMA, M. R. & SHAPIRO, B. H., 1998. Interactions of gender, growth hormone, and phenobarbital induction on murine Cyp2b expression. *Biochemical Pharmacology*, 56: 1251 – 1258.

SHERIF, M., EL-MAWLA, N. & EL-BOLKAINY, N., 1975. Clinical staging of malignant in patients suspected to have hepatosplenic schistosomiasis. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 67 – 70.

SHEWEITA, S. A., EL-MAATI, A., EL-SHAHATI, F. G. & BAZEED, M. A., 2001. Changes in the expression of cytochrome P450 2E1 and the activity of carcinogen-metabolizing enzymes in *Schistosoma haematobium*-infected human bladder tissues. *Toxicology*, 162:43-52.

SHEWEITA, S. A., MANGOURA, S. A. & EL-SHEMI, A. G., 1998. Different levels of *Schistosoma mansoni* infection induce changes in drug-metabolizing enzymes. *Journal of Helminthology*, 72: 71-77.

GANDOLFI, A. J. & SIPES, I. G., 1991. Biotransformation of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, (C. D., KLAASSEN, org), pp. 88 – 126, 4th edition, New York, McGraw-Hill, Inc.

SHEWEITA, S. A., MOSTAFA, M. H., 1995. Recovery of the hepatic carcinogen-metabolizing capacity in schistosome-infected mice after treatment with praziquantel. *Oncology Reports*, 2: 155.

SIWELA, A. H., NYATHI, C. B., CHETSANGA, C. J., HASLER, J. A., 1990. The effect of schistosomiasis on the covalent binding of 2-actylaminofluorene to mouse liver macromolecules in vivo and in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 40 (2): 379 – 382.

SPATZENEGGER, M. & JAEGER, W., 1995. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metabolism Reviews*, 27: 397 - 417.

STAFFAS, L., MANKOWITZ, L., SODENSTROM, M., BLANCK, A., PORSCHE, C., HALLSTROM, I., SUNDBERG, C., MANNERVICK, B., OLIN, B., RYDSTROM, J. & DE PIERRE, J. W., 1992. Further characterization of hormonal regulation of glutathione transferase in rat liver and adrenal glands. Sex differences and demonstration that growth hormone regulates the hepatic levels. *Biochemical Journal*, 286: 65 – 72.

STEGEMAN, J. J. & LIVINGSTONE, D. R., 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 121: 1 – 3.

TEKWANI, B. L., TRIPATHI, L. M., MUKERJEE, S., GUPTA, S., PANDEY, V. C., KATIYAR, J. C., GHATAK, S. & SHUKLA, O. P., 1990. Hepatic microsomal cytochrome P450 system during experimental hookworm infection. *Experimental Molecular Pathology*, 52: 330 – 339.

TINDBERG, N., BALDWIN, H. A., CROSS, A. J. & INGELMAN SUNDBERG, M., 1996. Induction of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) expression in rat and gerbil astrocytes by inflammatory factors and ischemic injury. *Molecular Pharmacology*, 50: 1065 – 1072.

VERMEULEN, N.P.E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. In: *Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, (C. IOANNIDES), pp. 136-151, New York: 1st ed, CRC Press, Boca Raton.

WAXMAN, D. J., 1992. Regulation of liver-specific steroid metabolizing cytochromes

P450: Cholesterol 7 α -hydroxylase, bile acid, 6 β -hydroxylase and growth hormone-responsive steroid hormone hydroxylases. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 43: 1055 – 1072.

WEAVER, R. J., THOMPSON, S., SMITH, G., DICKINS, M., ELCOMBE, C. R., MAYER, R. T. & BURKE, M. D., 1994. A comparative study of constitutive and induced alkoxyresorufin O-dealkylation and cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human, mouse, rat and hamster liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 47 (5): 763-773.

WEINSTOCK, J. V., BOROS, D. L., 1983a. Organ dependence differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with *Schistosomiasis mansoni*. *Journal of Immunology*, 130: 418 – 422.

WERCK-REICHART, D. & FEYREISEN, R., 2000. Cytochromes P450: uma história de sucesso. *Genome Biology*, 1 (6): 1 – 9.

WHO (World Health Organization), 1985. *The control of schistosomiasis*. Report of WHO Expert committee, Technical report Series N° 728, Geneva: WHO.

WHO (World Health Organization), 1993. *The control of Schistosomiasis*. Report of WHO Expert Committee. Technical report Series No. 830, Geneva: WHO.

WOOD, A. & TAYLOR, B. A., 1979. *Appud* Chang & Waxman. CYP2A Subfamily In: *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, Ioannides, C., 1 st ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 99-134, 1996.

WRIGHTON, S. A. & STEVENS, J. C., 1992. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Critical Reviews in Toxicology*, 22: 1 – 21.

ZHANG, S., CAWLEY, G. F., EYER, C. S. & BACKES, W. L., 2002. Altered ethylbenzene-mediated hepatic CYP2E1 expression in growth hormone-deficient dwarf rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179: 74 – 82.

YAMANO, S. TATSUNO, J. & GONZALEZ, F. J., 1990. The CYP2A3 gene product

catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry*, 29: 1322 – 1329.

YANG, C. S., PATTEN, C. J., ISHIZART, H. & YOO, J. H., 1991. Induction, purification and characterization of Cytochrome P450IIE. In *Methods in Enzymology*, 206:595-603.

YONG TU, Y. & YANG, C. S., 1983. High-affinity nitrosamine dealkilase system in rat liver microsomes and its induction by fasting. *Cancer Research*, 43: 623-629.

YOSHIKA, H., LINDBERG, R., WONG, G., ICHIKAWA, T., ITAKURA, T., BURKHART, B. & NEGISHI, M., 1990. Characterization and regulation of sex-specific mouse steroid hydroxylases genes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68: 754 – 761.

8 – ANEXO

8.1 - Soluções, Padrões, Substratos, Sistema Regenerador de NADPH e outras Substâncias utilizadas neste estudo

8.1.1 - Soluções

Soluções utilizadas na preparação da fração microsomal:

- Solução de Sacarose 250 mM

Sacarose	21,4 g
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs: Preparar no dia de uso e manter no banho de gelo durante o ensaio.

- Solução Tris-HCl 100 mM com KCl 150 mM pH 7,4

Preparar Tris 1 M:

Tris	12,1 g
Água Destilada <i>qsp</i>	100 ml

Preparar HCl 10 N:

HCl	85 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 10 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 85 ml de HCl em capela química e completar para 100 ml com água destilada.

Imediatamente antes do uso, diluir a solução Tris 1 M 1:10 em água destilada (25:250) e acrescentar 2,9 g de KCl (para 250 ml de solução). Solubilizar e, em seguida, ajustar o pH para 7,4 com HCl 10 N. Manter no banho de gelo durante o ensaio.

- Solução Tampão Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) 100 mM com 20% v/v de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4

Preparar Solução Tampão K_2HPO_4 1 M:

K ₂ HPO ₄	52,25g
Água destilada <i>qsp</i>	300 ml

Obs: Manter a 4°C.

Preparar Solução Tampão KH₂PO₄ 1 M:

KH ₂ PO ₄	20,41 g
Água destilada <i>qsp</i>	150 ml

Obs: Manter a 4°C.

Preparar Solução de EDTA 100 mM:

EDTA	0,58 g
Água destilada <i>qsp</i>	20 ml

Obs: Manter a 4°C.

Solução A

Solução Tampão K ₂ HPO ₄ 1 M	10 ml
Glicerol	20 ml
Solução EDTA 100 mM	1000 µl
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Solução B

Solução Tampão KH ₂ PO ₄ 1 M	5 ml
Glicerol	10 ml
Solução EDTA 100 mM	500 µl
Água destilada <i>qsp</i>	50 ml

Ajustar o pH da solução A para 7,4 com a solução B

Obs: Preparar no dia de uso e manter no banho de gelo durante o ensaio.

*Soluções utilizadas na determinação da concentração de proteínas da fração
microssomal*

Preparar Solução Tampão KH₂PO₄ 1 M:

KH ₂ PO ₄	20,41 g
---------------------------------	---------

Água destilada *qsp* 150 ml

Obs: Manter a 4°C.

Preparar solução de KOH 10%:

KOH 10 g

Água destilada *qsp* 100 ml

- Solução Tampão KH_2PO_4 50 mM / NaCl 150 mM pH 7,2

KH_2PO_4 0,680 g

NaCl 0,876 g

Água destilada *qsp* 100 ml

Ajustar o pH para 7,2 com KOH 10 % p/v.

Obs: Preparar no dia de uso.

Soluções utilizadas na quantificação de citocromos P450 totais

- Solução Tampão K_2HPO_4 100 mM com 20% v/v de glicerol pH 7,4

Preparar Solução Tampão K_2HPO_4 1 M:

K_2HPO_4 52,25g

Água destilada *qsp* 300 ml

Obs: Manter a 4°C.

Preparar Solução Tampão KH_2PO_4 1 M:

KH_2PO_4 20,41 g

Água destilada *qsp* 150 ml

Obs: Manter a 4°C.

Solução A

Solução Tampão K_2HPO_4 1 M 5 ml

Glicerol 10 ml

Água destilada <i>qsp</i>	50 ml
---------------------------	-------

Solução B

Solução Tampão KH_2PO_4 1 M	2,5 ml
Glicerol	5 ml
Água destilada <i>qsp</i>	25 ml

Ajustar o pH da solução A para 7,4 com a solução B.

Obs: Preparar no dia de uso e manter no banho de gelo durante o ensaio.

Soluções utilizadas nas atividades enzimáticas

Atividade das alcoxiresorufina-O-desalquilases

- Solução K_2HPO_4 100 mM pH 7,8

Preparar Solução Tampão K_2HPO_4 1 M:

K_2HPO_4	52,25 g
Água destilada <i>qsp</i>	300 ml

Obs: Manter a 4°C.

Preparar Solução Tampão KH_2PO_4 1 M:

KH_2PO_4	20,41 g
Água destilada <i>qsp</i>	150 ml

Obs: Manter a 4°C.

Solução A

Solução Tampão K_2HPO_4 1 M	25 ml
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs.: Manter a 4 °C

Solução B

Solução Tampão KH_2PO_4 1 M	10 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Obs.: Manter a 4 °C.

No momento de uso, ajustar o pH da solução A com a solução B para 7,8.

Atividade da Cumarina 7-hidroxilase

- Solução tampão com Glicina 0,5 M / NaOH 0,01 N pH 10,5

Glicina	10,134 g
NaOH	0,108 g
Água destilada <i>qsp</i>	270 ml

Ajustar o pH para 10,5 com KOH 10 % p/v.

Obs: Preparar no dia de uso.

- KOH 10% p/v

KOH	10 g
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

- Solução tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4

Preparar Tris 1 M:

Tris	30,285 g
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs.: Manter a 4 °C.

No momento de uso, diluir Tris 1 M 1 : 2 e ajustar o pH para 7,4 com HCl 10 N.

- HCl 2 N

HCl	17ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 50 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 17 ml de HCl em capela química e completar para 100 ml com água destilada.

- HCl 10 N

HCl	85 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 10 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 85 ml de HCl em capela química e completar para 100 ml com água destilada.

Atividade da Nitrosodimetilamina-desmetilase

- Solução tampão Tris-HCl 500 mM pH 7,4

Preparar Tris 1 M:

Tris	30,285 g
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Obs.: Manter a 4 °C.

No momento de uso, diluir Tris 1 M 1 : 2 e ajustar o pH para 7,4 com HCl 10 N.

- HCl 10 N

HCl	85 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 10 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 85 ml de HCl em capela química e completar para 100 ml com água destilada.

- Solução de ZnSO₄ 25%

ZNSO ₄	12,5 g
Água destilada <i>qsp</i>	50 ml

Obs. Manter a 4 °C.

- Solução de KCl 3 M

KCl	11,18 g
Água destilada <i>qsp</i>	50 ml

- Solução de Ba(OH)₂ saturada

Ferver água destilada para remover o CO₂ dissolvido e acrescentar Ba(OH)₂ sólido em excesso. Ferver a mistura por alguns minutos e, após esfriar, filtrar e estocar em recipiente bem fechado.

- Reagente de Nash (Acetato de amônio 2 M, Ácido acético 0,05 M e Acetilacetona 0,02 M)

Acetato de amônio	9,6 g
Ácido acético	192 µl
Acetilacetona	128 µl
Água destilada <i>qsp</i>	64 ml

Obs. Preparar imediatamente antes do uso.

Atividade da UDP-Glicuronosiltransferase

- Solução tampão Tris-HCl 1 M pH 7,4

Tris	30,285 g
Água destilada <i>qsp</i>	250 ml

Ajustar o pH para 7,4 com HCl 10 N.

- HCl 10 N

HCl	85 ml
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

Adicionar 10 ml de água destilada à proveta de 100 ml. Acrescentar 85 ml de HCl em capela química e completar para 100 ml com água destilada.

- Triton X-100 0,25% (p/v)

Triton X-100	0,025 g
Água destilada <i>qsp</i>	10 ml

Pesar 0,025 g de Triton X-100 em proveta de 10 ml e completar para 10 ml com água destilada.

- MgCl₂ 50 mM

MgCl ₂	0,051 g
Água destilada <i>qsp</i>	5 ml

Obs. Manter a 4 °C.

- Ácido Tricloroacético 5% (p/v)

Ácido tricloroacético	5 g
Água destilada <i>qsp</i>	100 ml

- Solução de NaOH 2 M

NaOH	4 g
Água destilada <i>qsp</i>	50 ml

8.1.2 - Padrões

- Solução de Albumina Sérica Bovina 1,40 mg / ml

BSA	1,98 mg
Solução tampão KH ₂ PO ₄ 50 mM / NaCl 150 mM pH 7,2	1,4 ml

Obs: Manter a 4 °C pelo período de 60 dias ou a - 20°C distribuído em alíquotas.

- Solução de Resorufina 1 μM

Preparar solução de resorufina 1 mM:

Resorufina	47 mg
Água destilada <i>qsp</i>	200 ml

Preparar solução de resorufina 1 μ M:

Solução de resorufina 1 mM	100 μ l
Tampão K ₂ HPO ₄ 100 M pH 7,8 <i>qsp</i>	100 ml

Obs: Preparar em balão volumétrico aferido, imediatamente antes do uso e manter ao abrigo da luz.

- Solução de umbeliferona 1 μ M

Preparar solução de umbeliferona 1 mM:

Umbeliferona	0,0162 g
Tampão de Glicina 0,5 M / NaOH 0,01 N pH 10,5 <i>qsp</i>	100 ml

Preparar Solução de umbeliferona 1 μ M

Solução de umbeliferona 1 mM	25 μ l
Tampão de Glicina 0,5 M / NaOH 0,01 N pH 10,5 <i>qsp</i>	25 ml

Obs: Preparar no momento de uso e ao abrigo da luz.

- Solução de formaldeído 0,1 mM

Preparar solução de formaldeído 0,1M:

Formaldeído	40 μ l
Água destilada <i>qsp</i>	4960 μ l

Preparar solução de formaldeído 0,1 mM:

Solução de formaldeído 0,1 M	5 μ l
Água destilada <i>qsp</i>	4995 μ l

8.1.3 - Substratos

- Solução de etoxioresorufina, metoxioresorufina, pentoxioresorufina e benziloxioresorufina 1 mM

- 1) Pesar 3 a 5 mg do substrato
- 2) Adicionar 2 ml de clorofórmio
- 3) Distribuir alíquotas de modo a obter 0,5 mmol de substrato por tubo
- 4) Aguardar a evaporação do clorofórmio em capela química
- 5) Manter em temperatura ambiente e ao abrigo da luz
- 6) No momento de uso, adicionar volume de DMSO a cada tubo, de modo a obter uma solução 1 mM.

- Solução de cumarina 1 mM

Preparar solução de cumarina 0,1 M em *eppendorf* de 2 ml:

Cumarina	0,0292 g
Metanol	2 ml

Homogeneizar em vórtex

Obs.: Preparar no momento de uso e ao abrigo da luz.

Preparar a solução de cumarina 1 mM em *eppendorf* de 1,5 ml:

Solução de cumarina 0,1 M	10 μ l
Metanol	990 μ l

Homogeneizar em vórtex

Obs.: Preparar no momento de uso ao abrigo da luz.

- Solução de Nitrosodimetilamina 80 mM

Nitrosodimetilamina	0,0148 g
Água destilada	2,5 ml

Obs: Preparar em capela química ao abrigo da luz.

- Solução de ρ -nitrofenol 5 mM

ρ -nitrofenol	0,007 g
Água destilada <i>qsp</i>	10 ml

8.1.4 - Sistema Regenerador de NADPH

Atividade das alcoxiresorufina-O-desalquilases

- Solução de MgCl₂ 1 M

MgCl ₂	1,015 g
Água destilada <i>qsp</i>	5 ml

Obs: Manter a 4°C.

- Solução de Glicose-6-fosfato 500mM

Glicose-6-fosfato	0,3 g
Solução Solução K ₂ HPO ₄ 100 mM pH 7,8	2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo *eppendorf* e manter a - 20°C.

- Solução de β -NADP 25 mM

β -NADP	0,037 g
Solução tampão K ₂ HPO ₄ 100 mM pH 7,8	2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo *eppendorf* e manter a - 20°C.

- Solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 μ l

Glicose-6-fosfato desidrogenase	250 U
Solução Tampão K ₂ HPO ₄ 100 mM pH 7,8	2,5 ml

Obs.: Distribuir alíquotas em *eppendorfs* de 1,5 ml e manter a - 20°.

Nota: O sistema regenerador de NADPH é preparado como uma solução única. No momento de uso, as soluções de β -NADP 25 mM, glicose-6-fosfato 500 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 μ l, são degeladas em banho de gelo e adicionadas, juntamente com a solução de $MgCl_2$ 1 M, a um tubo tipo *ependorf*, em volumes suficientes para atingir na cubeta onde se processa a reação enzimática, as concentrações desejadas dos respectivos componentes (β -NADP 0,25 mM, glicose-6-fosfato 5 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 0,25 U / ml e $MgCl_2$ 2,5 mM). O sistema regenerador de NADPH deve ser mantido no banho de gelo durante todo o ensaio.

Atividade da cumarina-7-hidroxilase

- Solução de $MgCl_2$ 1 M

$MgCl_2$	1,015 g
Água destilada <i>qsp</i>	5 ml

Obs: Manter a 4°C.

- Solução de Glicose-6-fosfato 500 mM

Glicose-6-fosfato	0,3 g
Solução Tris-HCl 500 mM pH 7,4	2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo *ependorf* e manter a - 20°C.

- Solução de β -NADP 25 mM

β -NADP	0,037 g
Solução Tris-HCl 500 mM pH 7,4	2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo *ependorf* e manter a - 20°C.

- Solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 μ l

Glicose-6-fosfato desidrogenase	250 U
Solução Tampão K_2HPO_4 100 mM pH 7,8	2,5 ml

Obs.: Distribuir alíquotas em *ependorfs* de 1,5 ml e manter a - 20°.

Nota: O sistema regenerador de NADPH é preparado como uma solução única. No momento de uso, as soluções de β -NADP 25 mM, glicose-6-fosfato 500 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 μ l, são degeladas em banho de gelo e adicionadas, juntamente com a solução de $MgCl_2$ 1 M, a um tubo de ensaio, em volumes suficientes para atingir nos tubos onde se processa a reação enzimática, as concentrações desejadas dos respectivos componentes (β -NADP 0,5 mM, glicose-6-fosfato 10 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 0,5 U / ml e $MgCl_2$ 10mM). O sistema regenerador de NADPH deve ser mantido no banho de gelo durante todo o ensaio.

Atividade da Nitrosodimetilamina-desmetilase

- Solução de $MgCl_2$ 1 M

$MgCl_2$	1,015 g
Água destilada <i>qsp</i>	5 ml

Obs: Manter a 4°C.

- Solução de Glicose-6-fosfato 500 mM

Glicose-6-fosfato	0,3 g
Solução Tris-HCl 500 mM pH 7,4	2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo eppendorf e manter a - 20°C.

- Solução de β -NADP 25 mM

β -NADP	0,037 g
Solução Tris-HCl 500 mM pH 7,4	2 ml

Obs: Distribuir alíquotas em tubos tipo eppendorf e manter a - 20°C.

- Solução de glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 μ l

Glicose-6-fosfato desidrogenase	250 U
Solução Tampão K_2HPO_4 100 mM pH 7,8	2,5 ml

Obs.: Distribuir alíquotas em *ependorfs* de 1,5 ml e manter a - 20°.

Nota: O sistema regenerador de NADPH é preparado como uma solução única. No momento de uso, as soluções de β -NADP 25 mM, glicose-6-fosfato 500 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U / 10 μ l, são degeladas em banho de gelo e adicionadas, juntamente com a solução de MgCl₂ 1 M, a um tubo de ensaio, em volumes suficientes para atingir nos tubos de ensaio onde se processa a reação enzimática, as concentrações desejadas dos respectivos componentes (β -NADP 0,4 mM, glicose-6-fosfato 10 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 1 U e MgCl₂ 10mM). O sistema regenerador de NADPH deve ser mantido no banho de gelo durante todo o ensaio.

8.1.5 – Substâncias

- Acetato de Amônio, 21632 - Merck Ind. Químicas
- Acetilacetona, 1096 - Merck Ind. Químicas
- Ácido Clorídrico, 1789 Merck Ind. Químicas
- Ácido Tricloroacético, 1008100250 - Merck Ind. Químicas
- Albumina Sérica Bovina, P7656 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- Benziloxiresorufina, 1 004 603, Boehringer Mannheim GmbH, Germany.
- β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, N0505, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
- Cloreto de Magnésio 21561 - Merck Ind. Químicas.
- Cloreto de Potássio, 4936 Merck Ind. Químicas.
- Cloreto de Sódio, 10065, Reagen Ind. Com. de Produtos Químicos LTDA.
- Clorofórmio, 21506 - Merck Ind. Químicas.
- Cumarina, C-4261, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- Dimetil Sulfoxido 802912 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- Ditionito de Sódio, 106507 Merck Ind. Químicas
- D-Glicose-6-fosfato, G 7250, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- EDTA, 1.08718.0250 Merck Ind. Químicas
- Etoxiresorufina, 1004611, Boehringer Mannheim GmbH, Germany

- Formaldeído, 1.04003.1000 - Merck Ind. Químicas
- Fosfato de Potássio Dibásico, 1.05.101 Merck Ind. Químicas
- Fosfato de Potássio Monobásico, 4873 Merck Ind. Químicas
- Glicerol, 10103 Reagen - Quimibrás Ind. Químicas
- Glicina P.A., 104169, Merck Ind. Químicas
- Glicose-6-fosfato-desidrogenase 250 U, G 6378, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- Hidróxido de Bário, Qeel 11299
- Hidróxido de Potássio, 5033 Merck Ind. Químicas.
- Hidróxido de Sódio, 10109 Reagen - Quimibrás Ind. Químicas
- Metanol, UN1230 - Merck Ind. Químicas
- N- nitrosodimetilamina, N-7756 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA
- p-nitrofenol, 104-8 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- Pentoxiresorufina, 1 004 620, Boehringer Mannheim GmbH, Germany
- Reagente de Bradford (Azul de Comassie G-250), B-6916 - Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- Resorufina, 23,015-4 R, Aldrich
- Sacarose, Qeel C12H22011 C.0980,08
- Sulfato de Zinco, 950614 Reagen - Quimibrás Ind. Químicas
- Tris, UN 8382 – Merck Ind. Químicas.
- Triton X-100, 648466 - Calciochem
- Umbeliferona, U-7626, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA.
- UDPGA (Ácido urindina 5'difosfoglucurônico trissódico), U-6751 – Sigma Aldrich