

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



“Efeitos da pentoxifilina sobre as enzimas de metabolismo de xenobióticos na malária murina causada pelo Plasmodium berghei ANKA e no modelo de sepse causada pelo LPS de Escherichia coli”

por

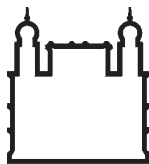
Carolina Morse Siqueira

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientadora principal: Prof.^a Dr.^a Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira

Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Dalma Maria Banic

Rio de Janeiro, outubro de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

“Efeitos da pentoxifilina sobre as enzimas de metabolismo de xenobióticos na malária murina causada pelo Plasmodium berghei ANKA e no modelo de sepse causada pelo LPS de Escherichia coli”

apresentada por

Carolina Morse Siqueira

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Dr.^a Katia Soares da Poça

Prof. Dr. Antonio Teva

Prof.^a Dr.^a Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira — Orientadora principal

Dissertação defendida e aprovada em 31 de outubro de 2014.

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

- S618 Siqueira, Carolina Morse
Efeito da pentoxifilina sobre as enzimas de
metabolismo de xenobióticos na malária murina causada
pelo Plasmodium berghei ANKA e no modelo de sepse
causada pelo LPS de Escherichia coli. / Carolina Morse
Siqueira. -- 2014.
xx,132 f. : il. color. ; graf.
Orientador: Oliveira, Ana Cecilia Amado Xavier de
Banic, Dalma Maria
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.
1. Malária - epidemiologia. 2. Biotransformação.
3. Sistema Enzimático do Citocromo P-450. 4.
Escherichia coli. 5. Xenobióticos. I. Título.
CDD - 22.ed. – 616.9362

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por todo o conhecimento adquirido e por mais essa conquista em minha vida. Por ter me amparado nos momentos de dúvidas e ter me dado força interior para superar as dificuldades.

À minha **família** (Dayse, Arthur, Luiz, Camila e Fátima), a qual eu amo muito, pelo companheirismo, incentivo e carinho.

A todos do **Laboratório de Toxicologia Ambiental** pela amizade e convivência diária, principalmente às amigas **Hellen Leal** e **Deise Coelho** que sempre estiveram ao meu lado dando força e apoio e a **Júlia Mesquita** pela ajuda nos experimentos.

À orientadora **Dr^a Ana Cecília Xavier de Oliveira** por ter me mostrado o caminho da ciência, pelas horas de dedicação e pelo conhecimento adquirido.

Ao pesquisador **Dr. Francisco Paumgarten** pela receptividade e ensinamentos.

RESUMO

Os citocromos P450 (CYP) são enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e de substâncias endógenas. Quando expostas a uma grande diversidade de agentes químicos ou biológicos, os CYPs podem ser modulados positiva ou negativamente. Os mecanismos pelos quais a regulação de CYP é alterada na malária ainda não foram completamente esclarecidos. Desse modo, este trabalho tem por objetivo elucidar os mecanismos que participam da regulação das atividades das CYP hepáticas 1a, 2b e 2a5 no modelo de malária murina letal provocada pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos da linhagem DBA-2. Também estudamos a participação das citocinas e do óxido nítrico como mediadores inflamatórios na modulação das atividades enzimáticas.. Nesse sentido, a produção desses mediadores foi inibida pela PTX em duas doses 1,7 e 7 mg/kg por cinco ou nove dias de tratamento. Um modelo murino de sepse causado pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* foi usado como estímulo do sistema imune para elevar os níveis séricos de óxido nítrico (NO). As atividades hepáticas de Cyp1a, Cyp2b e Cyp2a5 foram quantificadas em ensaios espectrofluorimétricos. O TNF no soro dos animais foi quantificado por citometria de fluxo e o NO foi quantificado pelo método de Griess. Os resultados mostraram que no dia 13 de infecção (DI13) não foi vista depressão de Cyp1a e Cyp2b e indução de Cyp2a5 na malária. Porém, a dose de 1,7 mg/kg restituiu aos valores constitutivos as atividades de Cyp2b. O TNF foi aumentado na malária murina, o tratamento com a PTX não foi capaz de diminuir o TNF no soro de animais maláricos. Posteriormente, as atividades hepáticas de Cyp1a e 2b foram deprimidas no dia 17 de infecção (DI17) na malária murina e Cyp2a5 foi induzida nos animais maláricos que receberam o tratamento com a PTX. Na sepse, apenas foi observada a depressão de Cyp2b. A administração do LPS aumentou os níveis séricos de NO, o tratamento com a PTX na dose de 7 mg/kg não diminuiu o processo inflamatório na sepse.

ABSTRACT

Cytochrome P450 enzymes (CYP) are involved in the metabolism of xenobiotics and endogenous substances. When exposed to a wide variety of chemical and biological agents, CYPs can be positively or negatively modulated. The mechanisms by which the regulation of CYP is modulated in malaria have not been fully clarified. Thus, this work aims to elucidate the mechanisms involved in the regulation of hepatic activities of Cyp1a, 2b and 2a5 in lethal murine malaria by *Plasmodium berghei* ANKA in DBA-2 mice. We also study the involvement of inflammatory mediators such as cytokines and nitric oxide in modulation of enzymatic activities. Accordingly, these mediators were inhibited by PTX in two doses 1.7 and 7 mg/kg for five or nine days treatment. A murine model of sepsis caused by lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* was used as stimulating the immune system to raise serum levels of nitric oxide (NO). Hepatic activities of Cyp1a, Cyp2b and Cyp2a5 were quantified in spectrofluorimetric trials. TNF in serum of the animals was measured by flow cytometry and NO was measured by Griess method. The results showed that on day 13 of infection (DI13) Cyp1a and Cyp2b were not depressed and no induction of Cyp2a5 was seen in malaria. However, a dose of 1.7 mg / kg restored the activities of the constituent values of Cyp2b. TNF has been increased in the murine malaria, but the treatment with PTX was not able to reduce TNF in sick animals. Subsequently, the hepatic activities of Cyp1a and 2b were depressed in day 17 of infection (DI17) and Cyp2a5 was induced in infected animals that received treatment with PTX. In sepsis, only depression of Cyp2b was observed. The LPS administration increased the serum levels of NO, treatment with PTX at the dose of 7 mg/kg did not decrease inflammation in sepsis.

SUMÁRIO

1 –INTRODUÇÃO	1
<i>1.1– Malária</i>	<i>1</i>
<i>1.1.1 – Histórico</i>	<i>1</i>
<i>1.1.2 – Ciclo da Malária</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3 – Epidemiologia da Malária</i>	<i>8</i>
<i>1.1.4 – Sinais e Sintomas da Malária</i>	<i>9</i>
<i>1.1.5– Modelos Experimentais de Malária</i>	<i>12</i>
 <i>1.2 – Biotransformação</i>	 <i>16</i>
<i>1.2.1- Citocromos P450</i>	<i>21</i>
<i>1.2.1.1 – Mecanismo de Catálise</i>	<i>22</i>
<i>1.2.1.2 – Localização Celular de CYP</i>	<i>23</i>
<i>1.2.1.3 – Isoformas CYP humanas e murinas</i>	<i>24</i>
<i>1.2.1.3.1 – CYP1A1/2</i>	<i>24</i>
<i>1.2.1.3.2 – CYP2A5</i>	<i>26</i>
<i>1.2.1.3.3 – CYP2B</i>	<i>28</i>
<i>1.2.1.4 – Importância clínica da inibição e indução de CYP</i>	<i>29</i>
<i>1.2.2- Modulação de CYP nas Doenças Infecciosas</i>	<i>30</i>
<i>1.2.2.1- Exemplos em Seres Humanos</i>	<i>30</i>
<i>1.2.2.2 – Estudos Experimentais</i>	<i>32</i>
<i>1.2.2.3 – Modulação de CYP na Malária Murina</i>	<i>34</i>
<i>1.2.2.4 - Modulação de CYP na Malária Humana</i>	<i>36</i>
<i>1.2.2.5 – Modulação de CYP em Modelos de Sepses</i>	<i>40</i>
 <i>1.3 – Mediadores da Resposta Inflamatória</i>	 <i>41</i>
<i>1.3.1 – Citocinas</i>	<i>42</i>
<i>1.3.1.1 - TNF-α</i>	<i>43</i>
	vii

1.3.1.1.1 - <i>TNF-α na malária</i>	44
1.3.2 – <i>Óxido Nítrico</i>	45
1.3.2.1 – <i>NO na malária</i>	46
1.4 – <i>Tratamento da malária</i>	47
1.5 - <i>Anti-maláricos como substratos de CYP</i>	51
2 – OBJETIVOS	52
2.1 - <i>Objetivo Geral</i>	52
2.2 – <i>Objetivos Específicos</i>	52
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 – <i>Animais</i>	53
3.2 – <i>Desenho Experimental</i>	53
3.2.1 - <i>Modelo Experimental de Malária Murina Letal – Infecção com Plasmodium berghei (ANKA)</i>	54
3.2.1.1 – <i>Parasitos e Infecção</i>	54
3.2.1.2 – <i>Tratamentos</i>	55
3.2.1.3 – <i>Experimento I</i>	55
3.2.1.4 – <i>Experimento II</i>	56
3.2.2 – <i>Modelo Experimental de Sepses – Tratamento com LPS de E. coli</i>	58
3.2.2.1 – <i>Tratamento</i>	58
3.3- <i>Acompanhamento das Taxas de Parasitemia</i>	59
	viii

3.4 – Eutanásia	60
3.5– Preparo da fração microssomal	60
3.6– Quantificação de proteínas	61
3.7– Atividades de CYP	61
3.7.1 – Atividade da Cyp2a5	62
3.7.1.1 - Ensaio da Cumarina 7-Hidroxilase na Cubeta	62
3.7.1.2 – Ensaio da Cumarina 7-Hidroxilase na Microplaca	62
3.7.2 – Atividades da Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10	63
3.7.2.1 - Ensaio da benziloxiresorufina-O-desbenzilase e etoxiresorufina-O-desetilase	63
3.8 - Quantificação dos Níveis de Óxido Nítrico no Soro	64
3.8.1 - Curva Padrão de Nitrito	64
3.8.2 - Curva Padrão de Nitrato	64
3.8.3 - Quantificação de Nitrito nas Amostras de Soro	65
3.9 – Dosagem das citocinas	65
3.9.1 – Citometria de Fluxo	65
3.9.2 – ELISA	66
3.10 – Análises Estatísticas	67
4 – RESULTADOS	68
4.1 – Experimento I	68
4.1.1 – Estado geral dos animais	68
4.1.2. – Mortalidade	68
	ix

4.1.3 – Parasitemias	69
4.1.3.2 – Parasitemia por Animal	70
4.1.4 – Peso dos animais	71
4.1.5 – Peso dos órgãos	72
4.1.5.1 – Peso Absoluto	72
4.1.5.2 – Pesos Relativos	73
4.1.6 – Atividades enzimáticas	74
4.1.6.1 - Atividades das alcoxi-resorufinas O-desalquilases	74
4.1.6.2 - Atividade da cumarina 7-hidroxilase	76
4.1.7 - Níveis séricos de Citocinas	77
4.1.7.1 – TNF	77
4.1.7.2 – Interleucina 2 (IL-2)	78
4.1.7.3 – Interleucina 6 (IL-6)	79
4.1.7.4 – Interferon (IFN)	79
4.1.7.5 – Interleucina 17 (IL-17)	80
 4.2 – Experimento II	 81
4.2.1 – Estado geral dos animais	81
4.2.2 – Mortalidade	81
4.2.3 – Parasitemias	82
4.2.3.1 - Parasitemia Média	82
4.2.3.2 – Parasitemia Diária	83
4.2.4 – Efeitos dos Tratamentos sobre o Peso dos Animais	84
 4.2.5 - Efeitos da Infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> (ANKA) e do Tratamento com a Pentoxifilina sobre os Pesos dos Órgãos	 85
4.2.5.1 - Pesos dos Fígados e Baços	85
4.2.5.1.1 – Peso Absoluto dos Órgãos	85
4.2.5.1.2 – Peso Relativo dos Órgãos	87
	x

4.2.6 - Efeitos da Infecção pelo <i>Plasmodium berghei</i> (ANKA) e do Tratamento com a Pentoxifilina sobre as Atividades das Monoxigenases Hepáticas	88
4.2.6.1 – Atividades da etoxi-resorufina-O-desetilase (EROD)	88
4.2.6.2 – Atividades da benziloxi-resorufina-O-desbenzilase (BROD)	89
4.2.6.3 – Atividade da cumarina 7-hidroxilase	90
4.2.6.4 – Níveis Séricos de TNF	91
4-3 –Efeitos da Sepsé pelo LPS de <i>E. coli</i> e do Tratamento com a Pentoxifilina sobre as Atividades das Monoxigenases Hepáticas	91
4.3.1 – Estado geral dos animais	91
4.3.2 – Mortalidade	91
4.3.3 – Evolução Ponderal	92
4.3.4 – Peso Absoluto dos órgãos	93
4.3.5 – Atividades de Monooxigenases	95
4.3.5.1 – Alcoxi-resorufina-O-desalquilases	95
4.3.5.1.1 - Atividades da etoxi-resorufina-O-desetilase	95
4.3.5.1.2 – Atividades da benziloxi-resorufina-O-desbenzilase	96
4.3.5.1.3 – Atividades da cumarina 7-hidroxilase	96
4.3.6 – Níveis séricos de óxido nítrico	97
5 – DISCUSSÃO	99
6 – CONCLUSÕES	105
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

8 – ANEXOS	132
<i>8.1 – Anexo 1</i>	132

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 – Fêmea do mosquito <i>Anopheles</i> .	5
Fig. 2 - Eritrócito infectado pelo <i>Plasmodium falciparum</i> .	6
Fig. 3 - Ciclo da malária no homem.	7
Fig. 4 - Ciclo catalítico de CYP.	23
Fig. 5 – Localização subcelular de CYP no hepatócito.	25
Fig. 6 – Sobrevivência das fêmeas DBA-2 infectadas por via i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> (ANKA) (M, N=10), tratadas com pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (MP, N=10) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a PTX na mesma dose (MP, N=10).	71
Fig. 7 - Taxas de parasitemia (%) das fêmeas DBA-2 infectadas (M, N=9) com 10^6 hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> (ANKA) i.p. e dos animais infectados com o plasmódio e tratados com pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (MP, N=10).	72
Fig. 8 – Parasitemias das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP do <i>P. berghei</i> ANKA (N=9).	73
Fig. 9 – Parasitemias das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP do <i>P. berghei</i> ANKA e tratadas com a PTX (dose de 1,7 mg/kg) durante cinco dias (N=10).	73
Fig. 10 - Médias do ganho de peso corporal (g) entre o dia da eutanásia (DI13) e o DI0 de infecção das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas por via i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com <i>P. berghei</i> (ANKA) (M, N=9), tratadas com pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a PTX na mesma dose (MP, N=10).	74

Fig. 11 - Pesos médios absolutos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). 75

Fig. 12 - Pesos médios absolutos dos baços das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). 76

Fig. 13 - Pesos relativos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). 77

Fig. 14 - Pesos relativos dos baços das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). 78

Fig. 15 – Médias das atividades de Cyp1a1/2 (EROD, picomoles de resorufina/mg ptn/min) nas frações microsossomais hepáticas de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles (C, N=10) que receberam apenas PBS i.p., infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratadas com a dose de 1,7 mg/kg de PTX (P, N=9) s.c. e infectadas com o plasmódio e tratadas com a mesma dose do antiinflamatório (MP; N=10). 79

Fig 16 - Médias das atividades de Cyp2b9/10 (BROD, picomoles de resorufina/mg ptn/min) nas frações microsossomais hepáticas de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles (C, N=10) que receberam apenas PBS i.p., infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratadas com a dose de 1,7 mg/kg s.c. de pentoxifilina (P, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a mesma dose do antiinflamatório (MP; N=10). 80

Fig. 17 - Médias das atividades de Cyp2a5 (picomoles de umbeliferona/mg ptn/min) nas frações microsossomais hepáticas de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles (C; N=10) que receberam apenas PBS i.p., infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratadas com a dose de 1,7 mg/kg s.c. de PTX (P; N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a mesma dose do antiinflamatório (MP; N=10). 81

Fig. 18 - Níveis de TNF (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). 82

Fig. 19 - Níveis de IL-2 (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=9). 83

Fig. 20 - Níveis de IL-6 (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). 84

Fig. 21 - Níveis de IFN (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). 85

Fig. 22 - Níveis de IL-17 (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). 86

Fig. 23 – Sobrevivência das fêmeas DBA-2 infectadas por via i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=10), tratadas com a PTX na dose de 7 mg/kg s.c. durante nove dias (P, N=9) e infectadas e tratadas com a PTX (MP, N=10). 87

Fig. 24 – Médias das taxas de parasitemia das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* n DI17. As taxas de parasitemia apenas dos animais infectados (MP, N=10) estão representadas em rosa e as dos animais infectados e tratados com PTX (7 mg/kg s.c. durante 9 dias) (MP, N=10) estão representadas em verde. 88

Fig. 25 – Parasitemias dos animais infectados com 10^6 HP do *P. berghei* ANKA do DI1 ao DI17 (N=10). 89

Fig. 26 – Parasitemias dos animais infectados com 10^6 HP do *P. berghei* ANKA e tratados com 7 mg/kg de PTX s.c. do DI1 ao DI17. As setas nos DI8 e DI17 indicam o início e o fim do tratamento com a PTX, respectivamente (N=10). 89

Fig. 27 – Médias das evoluções ponderais (g) no período entre DI0 (dia 0 de infecção) e DI17 (dia da eutanásia) das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=10), infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). 90

Fig. 28 - Pesos absolutos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). 92

Fig. 29 - Pesos absolutos dos baços das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=10), infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* (M, N=10), tratadas com PTX (7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). 93

Fig. 30 - Pesos relativos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg , N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). 94

Fig. 31 - Pesos relativos dos baços dos camundongos fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). 95

Fig. 32 – Atividades de EROD (Cyp1a) das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam apenas PBS, infectadas com 10⁶ HP com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg durante nove dias, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com o anti-inflamatório (MP, N=9). 96

Fig. 33 – Atividades de BROD (Cyp2b) das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam apenas PBS, infectadas com 10⁶ HP com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg durante nove dias, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com o anti-inflamatório (MP, N=9). 97

Fig. 34 - Atividades de COH (Cyp2a5) na fração microsomal hepática de camundongos DBA-2 (fêmeas) não infectados (C; N=10), infectados com 10⁶ HP com *P. berghei* ANKA, tratados com PTX (P, 7 mg/kg durante nove dias, N=9) e infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com PTX (MP; N=10). 98

Fig. 35 - Níveis de TNF (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=3), infectados com 10⁶ hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=7), tratados com PTX 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=4) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com PTX na mesma dose (MP, N=4). A análise estatística foi Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney. 98

Fig. 36 – Sobrevivência das fêmeas DBA-2 tratadas com a PTX durante nove dias (7 mg/kg s.c.), tratadas com 10 mg/kg de LPS, e tratados com a PTX durante nove dias (7 mg/kg s.c.) e desafiadas com LPS na mesma dose. 99

Fig. 37 – Médias das evoluções ponderais (g) dos animais controles (C, N=11), tratados com o LPS (LPS, N=11), tratados apenas com a PTX 7 mg/kg s.c. durante nove dias (P, N=11) e tratados com a PTX e desafiados com o LPS (LPS + P, N=11) entre os dias 9 e o dia 0 do experimento. 100

Fig. 38 - Pesos absolutos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratadas com 10 mg/kg i.p. de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas e desafiadas com o LPS (LPS + P, N=11). 101

Fig. 39 - Pesos absolutos dos baços das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), desafiadas com o LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas com a PTX na mesma dose e desafiadas com 10 mg/kg i.p. de LPS (LPS + P, N=11). 102

Fig. 40 – Atividades de EROD (Cyp1a) das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratadas com 10 mg/kg de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas e desafiadas com o LPS com as mesmas doses (LPS + P, N=11). 103

Fig. 41 – Atividades de BROD (Cyp2b) das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratadas com 10 mg/kg de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas e desafiadas com o LPS com as mesmas doses (LPS + P, N=11). 104

Fig. 42 – Atividades de COH (Cyp2a5) na fração microsomal hepática de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratados com 10 mg/kg de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratados com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratados com o anti-inflamatório na mesma dose e desafiados com o LPS (LPS + P, N=11). 105

Fig. 43 - Níveis séricos de NO nas fêmeas DBA-2 que receberam apenas PBS (controles, C, N=7), PTX s.c. na dose de 7 mg/kg durante nove dias (P, N=8), 10 mg/kg de LPS de *E. coli* i.p. (LPS, N=7) e o tratamento combinado com a endotoxina e o antiinflamatório (PLPS, N=8). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): a: médias diferem dos controles e b: médias diferem da PTX. 106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios para a definição da malária grave.	10
Quadro 2 - Modelos Experimentais de Malária em Camundongos	15
Quadro 3 - Reações e Enzimas da Fase I da Biotransformação de Xenobióticos e Suas Principais Localizações Subcelulares.	19
Quadro 4 - Reações e Enzimas da Fase II da Biotransformação de Xenobióticos e Suas Principais Localizações Subcelulares.	20
Quadro 5 - Experimento I de Malária Murina Letal: grupos e números de animais, infecção, tratamento, doses e vias utilizadas.	58
Quadro 6 - Experimento II de Malária Murina Letal: grupos e números de animais, infecção, tratamento, doses e vias utilizadas.	59
Quadro 7 – Modelo Experimental de Sepsis: grupos e números de animais, tratamentos, doses e vias utilizadas.	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BROD – benziloxiresorufina-O-desbenzilase

CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

COH – cumarina 7-hidroxilase

CYP – Cytochrome P450 (Citocromo P450)

EROD – etoxiresorufina-O-desetilase

et al. – et alli (e outros)

GST – Glutathione S-transferase

IL – interleucina, as mais diversas (e.g., IL-2, IL-6; IL-17)

INF – interferon

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

i.p. – intra-peritoneal

LPS – lipopolissacarídeo

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NEED – N-1-naftilenodiamin

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – phosphate buffer solution (tampão fosfato de potássio)

pmol - picomoles

PTX – pentoxifilina

RFA – Resposta de fase aguda

REL – retículo endoplasmático liso

s.c. - subcutânea

TNF – fator de necrose tumoral

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Malária

1.1.1 – Histórico

Diversas são as tentativas de se determinar a origem da malária no mundo, mas os estudos são fragmentados e escassos, não sendo suficientes para se precisar a real origem da doença. Contudo, supõe-se que a malária tenha se originado na África tropical, onde o parasito adaptou-se bem aos hospedeiros (BRASIL, 2006). A adaptação dos parasitos aos vetores foi um dos fatores primordiais para o seu sucesso. A agricultura nas primeiras comunidades africanas ocasionou muitas mudanças no meio ambiente. Os seres vivos que passaram por essas mudanças adaptaram-se e evoluíram, e entre estes, destaca-se o vetor da malária humana (CARTER: MENDIS, 2002).

Apesar de incerta, há referências da associação da malária com febres sazonais intermitentes em citações religiosas. Da mesma forma, médicos assírios, chineses e indianos, em tempos remotos, já associavam a doença à punição dos deuses e à presença de maus espíritos (DUTRA, 2001). Hipócrates, médico grego, elaborou os registros mais antigos em 400 a.C., descrevendo, com detalhes, as febres intermitentes da malária (AVERY *et al.*, 2002). Foi o próprio Hipócrates quem, ao perceber que as febres eram limitadas às áreas pantanosas, primeiro rejeitou a superstição e associou a doença ao meio ambiente (GARDINER *et al.*, 2004).

Posteriormente, no século II d.C., médicos gregos e romanos referiram-se à malária como doença epidêmica, comprovada pela seguinte citação: “uma doença horrível que vem todo verão e mata”, sendo reconhecida como “Febre Romana” (AVERY *et al.*, 2002).

Ao longo de 1500 anos, pouco se contribuiu para o conhecimento da doença e seu tratamento. Somente no século XVII, padres jesuítas observaram o uso da casca de uma árvore nativa por populações indígenas para o tratamento de alguns tipos de febre da América do Sul. Diz-se que a condessa de Chinchon se recuperou da malária usando a quinina em sua estadia no Peru (Lima) no século XVII. Seu uso foi, assim, introduzido na Europa, onde ficou conhecida como “pó da condessa” e, mais tarde, comercializada pelos jesuítas, como “pó dos jesuítas”. A árvore, de onde ocorre a sua extração, passou a se chamar Cinchona (DUTRA, 2001). A quinina era o seu princípio

ativo e foi isolado em 1820. Atualmente, a quinina ainda é uma droga antimalárica eficaz, ainda que tenham sido registrados casos de resistência (GARDINER *et al.*, 2004).

No século XVIII, o nome italiano “mal aire” foi relacionado à malária, já que na época acreditava-se que era causada pelas emanções e miasmas vindos dos pântanos. Foi somente ao final do século XIX que o conhecimento sobre a malária começou a desenvolver-se, pois muitos bacteriologistas e patologistas passaram a pesquisar e descobrir as diferentes causas das doenças infecciosas (DUTRA, 2001).

Em 1880, na Argélia, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran (1845-1922) observou, pela primeira vez, gametócitos no sangue de um soldado francês. Em 1883, a descoberta de Laveran foi sustentada por Ettore Machiavava e Angelo Celli, ambos italianos. O médico escocês Ronald Ross (1857-1932), em 1897, relatou como a malária era transmitida em aves a partir da picada do mosquito *Anopheles*, e em 1898, Batista Grassi (1854-1925), médico italiano, confirmou o mecanismo de transmissão no homem, recebendo o prêmio Nobel em 1902. Posteriormente, em 1907, Laveran viria a receber o prêmio Nobel pela descoberta do papel dos protozoários na doença. Finalmente, em 1948, um grupo de estudiosos liderado por Shortt e Garnham esclareceu o ciclo do parasito (PARAENSE, 2002; SERRA, 2003; GARDINER *et al.*, 2004).

Relatos da ocorrência da malária no Brasil datam do século XVI. No entanto, os registros quantitativos sobre sua prevalência datam do fim do século XIX e início do século XX. A doença acometia quase toda a área brasileira, sobretudo nas regiões litorâneas, com exceção de alguns lugares da região Sul. Embora o controle da doença no país venha sendo feito há muito tempo, estimativas revelam que seis milhões de casos anuais aconteciam no início do século XX (SILVEIRA: REZENDE, 2001; CAMARGO, 2003).

Dessa forma, esta síndrome seguiu seu curso de forma regular e equilibrada, sem o registro de surtos epidêmicos, mesmo estando presente nas capitais brasileiras, como no Rio de Janeiro e na capital da República. A doença também se fazia presente no estado de São Paulo: na capital, em Santos, Campinas, e nos vales dos rios Tietê e Piracicaba (CAMARGO, 2003).

O controle da malária no Brasil vem sendo realizado antes mesmo da descoberta da veiculação da doença por mosquitos do gênero *Anopheles*. Em 1898, Adolfo Luz atribuiu o surto que aconteceu entre os trabalhadores que estavam construindo a estrada de ferro São Paulo-Santos aos mosquitos da espécie *Anopheles cruzi*. Em seguida, determinou o afastamento dos acampamentos das florestas, já que os mosquitos tinham como criadouros bromélias arborícolas (SILVEIRA: REZENDE, 2001).

Duas grandes epidemias da doença relacionadas à extração do látex ocorreram no final do século XIX e início do século XX. Na primeira, nordestinos vítimas da seca em suas regiões e movidos pela busca da riqueza imediata migraram para a Amazônia, protagonizando a primeira grande epidemia. A segunda ocorreu durante a construção da estrada Madeira-Marmore, quando milhares de trabalhadores brasileiros e vindos do Caribe sucumbiram à doença (CAMARGO, 2003; KATSURAGAWA *et al.*, 2009).

Durante a Segunda Guerra, em pleno século XX, renascem os seringais com a procura de novos migrantes nordestinos pela riqueza seringueira na Amazônia. O “Exército da Borracha” sucumbiu à malária, ultrapassando em muito o número de vítimas abatidas em guerra, constituindo nova epidemia. A segunda grande epidemia do século XX apareceu inesperadamente, sendo descrita como “até então, única no mundo, que teve o adicional papel de influenciar todo o programa da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o controle da malária”. Esta epidemia ocorreu no Rio Grande do Norte (Natal) no final da década de 30 com a introdução do *Anopheles gambiae*, até então ausente da região, transmissor da malária na África, provavelmente pelos *destroyers* franceses que faziam a rota postal França-Natal, via Dakar. Mais tarde, espalhou-se por outras cidades do nordeste, levando a uma verdadeira calamidade pública, manifestando-se totalmente no Brasil nos anos 1940 (BRASIL, 1995; SILVEIRA & REZENDE, 2001; CAMARGO, 2003).

Nos anos 60 e 70, foram relatados menos de 100 mil casos de malária ao ano. A partir desse período, ocorreu uma tendência à elevação da doença com ocupação desordenada da Amazônia Legal (SILVA, 2003; BRASIL, 2005_b). No ano de 1983, 300 mil casos foram observados. Posteriormente (de 1984 a 1986), a malária manteve-se numa faixa de 400 mil casos/ano. Já em 1987, uma situação epidêmica grave foi relatada com o aumento significativo do número de casos (450 a 500 mil casos/ano) (BRASIL, 1995).

A partir de 1990, um discreto declínio da doença começou a ser observado. Porém, sua incidência aumentou de forma alarmante entre os anos de 1998 e 1999, atingindo seu ápice em 1999 (BRASIL, 2005b), quando houve um aumento de mais de 637 mil casos. Alguns fatos relevantes foram responsáveis por esse quadro epidemiológico grave, tais como: questões sociais e econômicas, que levaram ao deslocamento de grande parte da população para o interior de florestas, bem como para áreas periurbanas, além de variação dos índices pluviométricos (BRASIL, 2004; SCHUTZ, 2011).

Na Declaração do Milênio proposta pelas Nações Unidas entre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) no ano de 2000, metas para o combate ao HIV/AIDS, à malária e a outras doenças foram propostas e devem ser cumpridas até o ano de 2015. Entre as metas, destaca-se a importância de deter a incidência da malária e de outras doenças importantes que se encontram em declínio (BRASIL, 2011).

1.1.2 - Ciclo da Malária

O agente etiológico da malária é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, à família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*. O gênero *Plasmodium* é o único da família Plasmodiidae da subordem Haemosporina e compreende mais de 125 espécies que infectam répteis, pássaros e mamíferos. Todos os membros dessa subordem são parasitos intracelulares obrigatórios durante toda a vida e tem dois hospedeiros: um intermediário onde a reprodução é assexuada, que é um vertebrado, e outro definitivo, que é um invertebrado díptero hematófago, onde a reprodução é sexuada (por fertilização) (MUTIS *et al.*, 2005).

Segundo Garnham (1966), o gênero *Plasmodium* é subdividido em 10 subgêneros. Os subgêneros *P. (Plasmodium)* e *P. (Laverania)* incluem os parasitos da malária humana e de outros primatas, ao passo que todas as outras espécies que infectam outros mamíferos como o *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelli*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chabaudi* pertencem ao subgênero heterogêneo *P. (Vinckea)* (MUTIS *et al.*, 2005).

Cinco espécies de parasitos podem infectar os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Os mais importantes são o *P. falciparum* e o

P. vivax. A malária causada pelo *P. falciparum* é a forma mais mortal, e predomina na África. O *P. vivax* está mais bem distribuído que o *P. falciparum*, pois é capaz de desenvolver-se no vetor a temperaturas muito baixas, sobreviver em altas altitudes e em climas frios (WHO, 2013).

No sudeste asiático, o *P. knowlesi*, um parasito que normalmente infecta macacos de florestas, infectou seres humanos. Tal infecção é detectada microscopicamente, assim como a causada pelo *P. malariae*. A transmissão direta humana de *P. knowlesi* pelo vetor ainda não foi bem estabelecida. Atualmente, a malária *knowlesi* deve ser considerada uma zoonose (RAMASAMY, 2014).

Na malária humana, os hospedeiros invertebrados são mosquitos do gênero *Anopheles* (Fig. 1). O ciclo assexuado do parasito (esquizogônico) é iniciado logo após a picada da fêmea anofelina, com a inoculação de esporozoítos infectantes. No momento em que ela se alimenta, esporozoítos saem de suas glândulas salivares, atingem a corrente sanguínea e invadem as células do fígado (hepatócitos), dando início ao ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual, que dura seis dias para a espécie *P. falciparum*, oito dias para a *P. vivax* e 12 a 15 dias para a *P. malariae* (BRASIL, 2005a; FRANÇA *et al.*, 2008).



Fig. 1 – Fêmea do mosquito *Anopheles*. Fonte: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>

Vale ressaltar que é durante esta fase que o *P. vivax* e o *P. ovale* desenvolvem lentamente alguns dos seus esporozoítos, originando os hipnozoítos, formas latentes do plasmódio responsáveis pelas recaídas da doença meses ou anos após. Os parasitos se diferenciam e sofrem multiplicação assexuada, originando os merozoítos, que eclodem na ruptura de cada hepatócito. Cada hepatócito rompido libera por volta de 2.000

merozoítos na infecção pelo *P. malariae*, 10.000 pelo *P. vivax* e 40.000 pelo *P. falciparum* (BRASIL, 2005a; FRANÇA *et al.*, 2008).

Na corrente sanguínea, os merozoítos invadem as hemácias, dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo sangüíneo ou eritrocítico. O *P. malariae* tem preferência pelas hemácias maduras, o *P. vivax* invade preferencialmente os reticulócitos (hemácias jovens) e o *P. falciparum*, hemácias em qualquer fase evolutiva (BRASIL, 2005a). A duração do estágio eritrocítico depende da espécie do parasito, sendo de 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e de 72 horas para *P. malariae* (FRANÇA *et al.*, 2008) (Fig. 2).

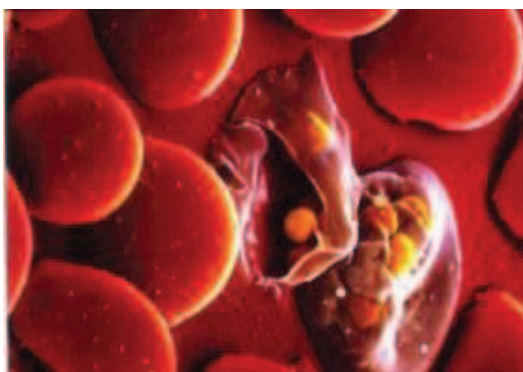


Fig. 2 - Eritrócito infectado pelo *Plasmodium falciparum*. Fonte: Stockbower, on line.

Durante o período de 48 a 72 horas (dependendo do plasmódio), ocorre o desenvolvimento do parasito no interior da hemácia até a sua ruptura, liberando novos merozoítos que irão invadir hemácias livres. A ruptura e liberação de parasitos na corrente sanguínea traduz-se clinicamente como o ápice da doença. No ciclo sangüíneo, o plasmódio passa por várias transformações morfológicas – sem divisão celular – até chegar ao esquizonte, que se divide e origina novos merozoítos, que serão liberados na corrente sangüínea após a ruptura do eritrócito. Ao exame microscópico da distensão sangüínea do hospedeiro infectado, portanto, é possível observar diversas formas do parasito: trofozoítos jovens (anéis), trofozoítos maduros, formas irregulares, esquizontes jovens e esquizontes maduros. Passada a replicação assexuada, alguns merozoítos podem desenvolver-se em gametócitos machos e fêmeas, que amadurecem sem divisão celular, sendo essas as formas infectantes dos mosquitos. Esses gametócitos possuem funções reprodutivas, garantindo a perpetuação da espécie. Nas distensões sangüíneas,

podem ser diferenciados em microgametócitos (masculinos) e macrogametócitos (femininos) (BRASIL, 2005a).

Abaixo, encontra-se resumido o ciclo da malária no homem (Fig. 3).



Fig. 3 - Ciclo da malária no homem. Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2013/04/01/malaria-causa-de-ictericia/>

A transmissão natural da malária está associada à existência de portadores de gametócitos (reservatórios humanos) e de vetores. Centenas de espécies de anofelinos possuem o potencial de transmitir a malária. No Brasil, há cinco espécies importantes: *Anopheles (N) darlingi*, *A. (N) aquasalis*, *A. (N) albitarsis*, *A. (K) cruzi* e *A. (K) bellator*. Esses insetos reproduzem-se, preferencialmente, em águas limpas e sombreadas de remansos de rios, córregos, igarapés, lagoas, represas, açudes, valetas para irrigação, alagados e pântanos.

A transmissão da doença pode ocorrer por transfusão de sangue infectado com plasmódio, pelo compartilhamento de seringas por usuários de drogas ilícitas ou por acidente com agulhas e/ou lancetas contaminadas. Existe também a possibilidade de transmissão neonatal (BRASIL, 2005a).

Em roedores, o ciclo de vida de todos os parasitos é semelhante. A infecção também é iniciada com a injeção de esporozoítos provenientes das glândulas salivares de um mosquito infectado e a esquizogonia exoeritrocítica ocorre nos hepatócitos. Há uma única fase típica da esquizogonia exoeritrocítica que leva 40-60 horas para se completar (AIKAWA: SEED, 1980; HOMEWOOD: NEAME, 1980).

Em algumas espécies pode ocorrer uma fase secundária da esquizogonia no fígado. Os merozoítas hepáticos invadem as hemácias onde se tornam anéis, trofozoítas e esquizontes, produzindo cerca de 6-18 merozoítas depois de 24 horas. A reinfecção das hemácias ocorre e a infecção continua com 24 horas de periodicidade. Gametócitos arredondados são formados e retornam aos anofelinos, onde ocorre a esporogonia. Essas formas podem ser encontradas na corrente sanguínea depois de 10-12 dias, a uma temperatura entre 24 e 26°C (AIKAWA: SEED, 1980; HOMEWOOD: NEAME, 1980).

No que diz respeito às suas características intrínsecas, o ciclo de vida dos parasitos murinos se assemelha ao do homem e de outros primatas. Estas similaridades são confirmadas nos estudos sobre sua estrutura e bioquímica (AIKAWA: SEED, 1980; HOMEWOOD: NEAME, 1980).

1.1.3 – Epidemiologia da Malária

A malária é uma doença endêmica em regiões da Ásia e América do Sul e, principalmente, na África subsaariana (GREENWOOD: MUTABINGWA, 2002; CAMARGO, 2003). No ano de 2010, a OMS estimava que, mundialmente, 3,3 bilhões de pessoas corriam o risco de contrair malária. No mesmo ano, foram registrados 216 milhões de casos (WHO, 2011).

Ainda que o continente africano concentre por volta de 90% dos casos, a doença ocorre no mundo inteiro, sendo a maioria dos casos decorrentes da infecção pelo *P. falciparum*. É inquietante o fato da malária avançar para áreas antes não afetadas, até

mesmo para os países desenvolvidos (LEORATTI, 2011). Inclusive, na América Latina, a malária encontra-se grandemente distribuída, sendo o *P. vivax*, a espécie mais frequente (PALMER *et al.*, 1998; SAN SEBASTIAN *et al.*, 2008; SHARMA, 1999).

No Brasil, que é um país endêmico, 99% dos casos são encontrados na Amazônia Legal. Inclusive, 49 milhões de pessoas podem residir em áreas de risco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). No ano de 2011, houve uma redução de 40% na incidência da doença no país, bem como intensa redução de internações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Mais da metade dos países que tiveram transmissão contínua da malária no ano 2000 apresentaram diminuição da incidência de casos ou internações e mortes (ou ambos) em decorrência da doença. Em todo o mundo, as taxas de mortalidade da malária decresceram em 42% entre os anos 2000 e 2012 em todas as faixas etárias, e em 48% em crianças menores de 5 anos de idade. Caso se mantenha a taxa anual de redução observada ao longo dos últimos 12 anos, estima-se que no ano de 2015, as taxas de mortalidade da malária diminuirão em 52% em todas as idades e em 60% em crianças menores de 5 anos de idade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Em 2013, 97 países apresentaram transmissão em curso da malária, e 7 países encontraram-se na fase de prevenção e de reintrodução da doença, perfazendo um total de 104 países e territórios em que a malária é atualmente considerada endêmica. Em termos globais, 3,4 bilhões de pessoas estão em risco de malária. A estimativa da OMS é de que 207 milhões de casos de malária ocorreram no mundo em 2012 com 627.000 mortes (WHO, 2013).

1.1.4 – Sinais e Sintomas da Malária

Os principais sintomas da malária são: febre, calafrios, vômitos, anorexia, fadiga, diarreia e anemia (FRANÇA, 2008). Os sintomas são inespecíficos e decorrentes da ruptura dos eritrócitos infectados. Com a ruptura, ocorre a liberação na corrente sanguínea de antígenos presentes no parasito e daqueles formados como consequência de seu metabolismo, com ativação do sistema imune do hospedeiro (DE SOUZA: RILEY, 2002).

Durante as infecções pela forma mais virulenta do plasmódio, *P. falciparum*, se o diagnóstico for tardio e o tratamento não for adequado, a doença pode evoluir para a malária grave (forma complicada). A OMS define a malária grave a partir da presença de qualquer uma das formas assexuadas do parasito associada a uma das características apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Critérios para a definição da malária grave. Adaptado de DAY *et al.*, (1999).

Características
Malária cerebral (escore <11 na escala de coma de Glasgow) Anemia (hematócrito <20%) associado à contagem de parasitos > 100.000 L⁻¹ em sangue periférico Icterícia (bilirrubina sérica >2,5 mg/dL) associada à contagem de parasitos > 100.000 L⁻¹ em sangue periférico ou comprometimento renal (creatinina sérica >1,5 mg/dL) Insuficiência renal (débito urinário <400 mL/h associado à creatinina sérica >3 mg/dL) Hiperparasitemia (10% de parasitemia ou contagem de parasitos > 500.000 L⁻¹) Hipoglicemia (glicose sangüínea <40 mg/dL) Choque (pressão sangüínea sistólica <80mm Hg associada às extremidades frias)

Na malária grave, as manifestações dependem da idade do paciente e se o mesmo teve alguma exposição prévia ao plasmódio (NEWTON *et al.*, 1998). A forma grave é classificada como uma doença multissistêmica, capaz de levar à malária cerebral (MC), anemia grave, insuficiência renal aguda, edema pulmonar, hipoglicemia, colapso circulatório e acidose metabólica (MILLER *et al.*, 2002). Contudo, vale ressaltar que o curso clínico desta síndrome vai depender de fatores associados ao parasito e ao hospedeiro (GOOD *et al.*, 2005).

Os métodos laboratoriais para o diagnóstico da malária são essenciais, pois não existem parâmetros específicos da doença que permitam confirmar o diagnóstico baseado apenas na clínica. É importante ter em mente que a parasitemia não está

necessariamente associada às manifestações clínicas, isto é, o pico febril não está relacionado a um resultado positivo do exame microscópico. Apesar das semelhanças entre os ciclos evolutivos das espécies infectantes, há variações na evolução clínica da doença (BRASIL, 2005a).

Apesar de no Brasil a maioria dos casos de malária serem causados pelo *P. vivax*, é preocupante o aumento do número de casos da doença pelo *P. falciparum*, o que contribui para a ocorrência dos casos graves e fatais. Nesse sentido, o Ministério Público tem aumentado as ações de controle da malária na Amazônia nos últimos anos, obtendo resultados positivos. Tais ações, juntamente com o diagnóstico precoce e o uso de tratamentos seguros e eficazes tem contribuído para modificar a dinâmica da transmissão da doença na região. Apesar dos avanços, a grande incidência da doença e a persistência de fatores ambientais e socioeconômicos predisponentes requerem o permanente aperfeiçoamento do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Com esse objetivo, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS) implantou, no ano de 2003, o Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Malária (SIVEP - Malária) na Região Amazônica, conseguindo resultados promissores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Na primeira metade do século XX muitos pesquisadores dedicaram-se ao controle da malária, sobretudo no sentido de reduzir ou eliminar a presença de criadouros do inseto transmissor. Por outro lado, as dificuldades no fornecimento da quinina durante a Primeira Guerra Mundial levaram os pesquisadores alemães a produzir antimaláricos sintéticos, o que culminou com o desenvolvimento da primaquina (1924), mepacrina (1930) e cloroquina (1934) (DUTRA, 2001). Posteriormente, também foram realizadas pesquisas com o objetivo de sintetizar substâncias com ação inseticida, o que culminou com a obtenção em 1942 por Paul Muller, do composto dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), de alto potencial inseticida, grande poder residual e baixo custo (GARDINER *et al.*, 2004; DUTRA, 2001).

1.1.5– Modelos Experimentais de Malária

Os modelos experimentais têm sido úteis para a compreensão da patogênese de várias doenças autoimunes e infecciosas que acometem os seres humanos. Da mesma forma, muitas vacinas e terapias imunológicas que estão atualmente em uso foram primeiramente desenvolvidas e testadas em animais. Inclusive, muito do conhecimento sobre a fisiologia dos mamíferos teve origem a partir de estudos realizados com animais (HAU: VAN HOOSIER, 2005).

Os parasitos de roedores que causam a malária foram isolados em ratos do mato do gênero *Thamnomys* no Congo Africano e proporcionaram um recurso inestimável para o estudo do papel das respostas imune e inflamatória na patologia da malária (BEALE *et al.*, 1978; LANDAU: BOULARD, 1978).

Modelos de malária em camundongos têm sido utilizados para estudos das alterações bioquímicas, imunológicas e fisiopatológicas que ocorrem durante a infecção malárica, uma vez que a doença experimental reproduz alguns aspectos da doença humana com certa exatidão (MUXEL *et al.*, 2011).

Grande parte do atual conhecimento sobre a imunopatologia da malária foi obtida em estudos laboratoriais que envolviam a infecção de roedores, especialmente os camundongos. Os parasitos mais utilizados nos modelos murinos de malária pertencem às seguintes espécies: *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei* e *Plasmodium chabaudi*. O *Plasmodium berghei* foi o primeiro a ser isolado e é, atualmente, o mais usado em estudos experimentais. No laboratório, ele pode infectar camundongos, hamsters e ratos (COX, 1988).

Desde a sua descoberta em 1948 por Vinckey e Lips, o parasito *P. berghei* tem sido empregado como uma ferramenta útil para o estudo da atividade de potenciais antimaláricos (FERREIRA DA CRUZ *et al.*, 2000), desempenhando um papel essencial na investigação da doença (TOMAS *et al.*, 1998).

O animal mais utilizado é o camundongo, devido à sua grande susceptibilidade aos plasmódios de roedores. Neste animal, o início da infecção é rápido e níveis elevados de parasitemia e alta mortalidade são observados (AGER, 1984). No entanto, nem todos os medicamentos antimaláricos são ativos no modelo murinho de malária pelo *P. berghei*. Para os estudos da eficácia e farmacocinética dos antimaláricos, que

requerem grandes volumes de sangue, o rato seria o animal mais adequado (DOW *et al.*, 1998).

A gravidade da malária e o curso letal ou não letal da infecção são estabelecidos de acordo com o parasito e a linhagem do camundongo. Os plasmódios *P. berghei*, *P. vinckei* e algumas linhagens de *P. yoelii* e *P. chabaudi* causam infecções letais em camundongos (FOOTE *et al.*, 2005). Em camundongos infectados com o *P. berghei*, a evolução letal pode acontecer precocemente devido ao aparecimento de um quadro neurológico compatível com malária cerebral, ou tardiamente, em consequência de um quadro de anemia aguda grave. Já com as espécies *P. yoelii*, *P. c. chabaudi* e *P. vinckei petteri*, a morte em camundongos não resistentes ocorre em virtude do agravamento do quadro de anemia aguda. Porém, nas linhagens murinas resistentes, após a elevação inicial da parasitemia, a infecção com esses plasmódios pode evoluir para a cura com a total eliminação do parasito ou com a permanência deste, com recidivas de menor intensidade ocorrendo durante vários meses (FOOTE *et al.*, 2005).

Em linhagens não resistentes, como no C57BL/6, o quadro neurológico causado pelo *P. berghei* (ANKA) tem sido utilizado como modelo murino da malária cerebral humana (BRIAN DE SOUZA: RILEY, 2002; COMBES *et al.*, 2006). Vale ressaltar que o *P. berghei* (ANKA) apenas produz um quadro claro de malária cerebral em duas linhagens murinas, C57BL/6 e CBA, visto que há uma predisposição genética para a resposta imune pró-inflamatória (BRIAN DE SOUZA: RILEY, 2002).

A linhagem murina DBA-2 foi considerada resistente com relação à malária cerebral por Foote e colaboradores (2005) e como não resistente por Brian de Souza e Riley (2002). Ainda que a infecção com *P. berghei* (ANKA) seja letal nos camundongos DBA-2, a morte, geralmente, é resultado do agravamento da anemia aguda e não do comprometimento cerebral.

Em termos gerais, o *P. c. chabaudi* é considerado “avirulento” ou não letal, mas, o desfecho letal ou não letal da infecção experimental também irá depender da linhagem, ou seja, da carga genética do hospedeiro murino. As linhagens C57BL/6, DBA-2 e CBA são resistentes e os camundongos A/J e BALB/c não são resistentes. Nestes últimos hospedeiros, a infecção evolui para a morte (COX, 1988, HERNANDEZ-VALLADARES *et al.*, 2004, FOOTE *et al.*, 2005).

De acordo com COX (1988), as principais alterações patológicas da malária humana (anemia, trombocitopenia, esplenomegalia, hepatomegalia, edema pulmonar e malária cerebral) também são vistas em infecções experimentais de primatas e roedores. A anemia em roedores é comparável à observada em seres humanos, particularmente nos portadores de malária pelo *P. falciparum*, sendo grave e de início rápido.

O aumento do baço e fígado também são encontrados na malária murina. O baço do animal aumenta notoriamente de tamanho com a evolução da doença, e exibe a cor vermelho-escura ou negra, sendo frágil ao toque. Em exames histológicos, é possível observar que o baço está em estado reacional hiperplásico, com aumento do número e tamanho dos macrófagos da polpa vermelha que estão em intensa atividade fagocitária, o que é evidenciado pela presença de parasitos, restos celulares e pigmento (hemozoína). O fígado também aumenta de tamanho e passa a ter a cor castanho escura, consequência do acúmulo do pigmento (hemozoína) nas células de Kupffer que sofrem hiperplasia e hipertrofia (COX, 1988).

É de extrema importância frisar que na maior parte dos estudos que utilizam o modelo de malária em roedores, o animal é inoculado por via intraperitoneal ou intravenosa com o sangue de um doador infectado com o plasmódio. Dessa forma, provoca-se o início direto do ciclo eritrocítico da doença no animal, sem que haja um hospedeiro invertebrado e um ciclo exoeritrocítico hepático no hospedeiro vertebrado (COX, 1988).

O Quadro 2 apresentado abaixo mostra a gama de modelos onde as diferentes linhagens de camundongos e as diferentes espécies do plasmódio podem ser estudadas (Quadro 2).

Quadro 2. Modelos Experimentais de Malária em Camundongos. Fonte: COX, 1988.

<i>Plasmodium</i> espécie/subespécie/clone	Órgão de sequestro	Preferência de invasão das CVS	Susceptibilidade à anemia	Susceptibilidade à MC
<i>berghei</i> ANKA	Cérebro, pulmões e tecido adiposo	Reticulócitos	C57BL/6 e CD-1: letal C57BL/6J: não letal	C57BL/6 e CBA: susceptível BALB/c: resistente
<i>yoelii yoelii</i> 17X	Cérebro	Reticulócitos e CVS maduras	BALC/c: não letal	A maioria das linhagens
<i>yoelii yoelii</i> 17XL	-	Reticulócitos e CVS maduras	BALC/c: não letal C57BL/6: letal	A maioria das linhagens
<i>chabaudi chabaudi</i> AS	Fígado e cérebro	CVS maduras	A/J: letal C57BL/6: não letal	C57BL/6 IL-10 KO: susceptível
<i>chabaudi chabaudi</i> AJ	Fígado	CVS maduras	BALC/c: não letal	-
<i>chabaudi adami</i> DS	-	CVS maduras	C3H: letal C57BL/6: não letal	-
<i>chabaudi adami</i> DK	-	CVS maduras	BALC/c e C3H: não letal	-
<i>vinckei vinckei</i>	-	CVS maduras	BALC/c: letal	-

CVS: células vermelhas sanguíneas; MC: malária cerebral; KO: *knockout*

1.2 – Biotransformação

Brodie *et al.* (1958) evidenciaram o fato de que a maior parte dos fármacos e compostos estranhos aos organismos não eram excretados pela urina, salvo em quantidades mínimas, antes de serem modificados em sua estrutura química. Os autores salientaram que se não existissem enzimas capazes de catalisar essas transformações, a eliminação de medicamentos seria muito lenta. Em consequência, os seus efeitos seriam prolongados e o tratamento farmacológico se tornaria perigoso ou, até mesmo, inexequível. Dessa forma, o termo “compostos estranhos” foi utilizado para determinar “*os compostos orgânicos encontrados em plantas ou sintetizados (pelo homem) que normalmente não estão presentes no organismo*”. O vocábulo “xenobiótico”, com o significado de estranho à vida, foi posteriormente estabelecido por Mason *et al.* (1965), e atualmente é empregado para determinar os compostos químicos estranhos ao organismo, assim como proposto inicialmente.

Todos os organismos estão inevitavelmente expostos aos xenobióticos, incluindo medicamentos, produtos químicos industriais, pesticidas, poluentes, produtos de pirólise de alimentos cozidos, alcalóides, metabólitos secundários de plantas, e as toxinas produzidas por fungos, plantas e animais. A lipofilia é uma característica física que permite que muitos xenobióticos sejam absorvidos através da pele, pulmões ou trato gastrointestinal, tornando-se um obstáculo para a sua eliminação, já que compostos lipofílicos podem ser prontamente reabsorvidos. Por consequência, a eliminação dos xenobióticos depende, muitas vezes, da sua conversão em produtos químicos solúveis, em um processo chamado biotransformação, que é catalisado por enzimas localizadas no fígado e em outros tecidos (PARKINSON, 2001). Ainda que se distribuam por quase todo o organismo, há uma maior concentração enzimática no fígado (WATKINS, 1992).

Uma consequência importante da biotransformação é a alteração da lipofilia do xenobiótico, visto que a sua transformação em metabólito mais hidrossolúvel favorece a excreção através da urina e fezes (PARKINSON, 2001). A alteração química dos xenobióticos absorvidos pelo organismo, do estado lipofílico para o hidrofílico, é realizada através de reações que podem ser específicas ou inespecíficas (MEYER, 1996).

A biotransformação pode ser dividida, didaticamente, em duas fases: as transformações metabólicas de fase I e II. As reações metabólicas de fase I (reações de

redução, oxidação e hidrólise) têm por objetivo expor ou acrescentar grupos funcionais (-OH, -NH₂, -SH ou -COOH) na molécula original. Entre as enzimas envolvidas nas reações de fase I, destaca-se o sistema citocromo P450 (CYP) pela sua importância na catálise de uma infinidade de substâncias químicas estruturalmente diversas, de origem natural ou sintetizadas pelo homem (OMURA, 1999). Estas reações, no entanto, promovem um discreto aumento da hidrofiliabilidade das substâncias químicas, de modo que o metabólito oriundo desta fase sofre nova transformação (reações de fase II). Durante este eprocesso, o metabólito sofre conjugação com macromoléculas endógenas, como sulfatos inorgânicos, aminoácidos, ácido glicurônico e glutatona que o tornam mais hidrossolúvel para eliminação (OMURA, 1999; PARKINSON, 2001).

Muitos fármacos são basicamente metabolizados por uma única via metabólica. Porém, a grande maioria deles sofrem a ação de mais de uma via e a quantidade do fármaco metabolizado por essas diferentes vias é variável nas diferentes espécies (WEBER, 1986).

As enzimas mais importantes da fase II do metabolismo são a glutatona S-transferase, as sulfotransferases, a uridina difosfato glucuronil transferases (UDP-glucuronil transferases), as N-acetiltransferases e as metiltransferases, que catalizam reações de conjugação com a glutatona (síntese do ácido mercaptúrico), sulfatação, glucuronidação, acetilação e metilação, respectivamente. Além dessas reações, ainda ocorrem reações de conjugação com aminoácidos, como glicina, taurina e ácido glutâmico (IYER: SINZ, 1999). Os cofatores necessários para que estas reações aconteçam reagem com os grupos funcionais presentes nos xenobióticos, ou que são introduzidos/expostos durante a fase I da biotransformação (PARKINSON, 2001).

A maior parte das reações de biotransformação de fase II concede aumento considerável da hidrofiliabilidade do xenobiótico. Dessa forma, essas reações possibilitam a excreção, com excelência, dos compostos químicos estranhos ao organismo. As reações de fase II podem preceder ou não as reações de fase I. Por exemplo, a morfina, a heroína e a codeína são todas convertidas em morfina-3-glucuronato. No que diz respeito à morfina, o metabólito é eliminado pela conjugação direta com o ácido glucurônico. No entanto, nos outros dois casos, da heroína e da codeína, a conjugação com ácido glucurônico é precedida por reações de fase I: hidrólise (desacetilação) no

caso de heroína e *O*-desmetilação (envolvendo a oxidação por CYP), no caso da codeína (PARKINSON, 2001).

Exemplificamos as principais reações que ocorrem nas fases I e II do metabolismo de xenobióticos nos Quadros 3 e 4, respectivamente.

Quadro 3. Reações e Enzimas da Fase I da Biotransformação de Xenobióticos e Suas Principais Localizações Subcelulares. Fonte: PARKINSON, 2001.

Reação	Enzima	Localização subcelular
Hidrólise	Esterase	Microssomos, citosol, lisossomos e sangue
	Peptidase	Lisossomos e sangue
	Epóxi-hidroxilase	Microssomos e citosol
Redução	Azo e nitro redução	Citosol, microflora e microssomos
	Redução pela carbonila	Citosol, sangue e microssomos
	Redução pelo dissulfeto	Citosol
	Redução pelo sulfóxido	Citosol
	Redução pela quinona	Citosol e microssomos
	Desalogenação redutora	Microssomos
Oxidação	Álcool desidrogenase	Citosol
	Aldeído desidrogenase	Mitocôndria e citosol
	Aldeído oxidase	Citosol
	Xantina oxidase	Citosol
	Monoamina oxidase	Mitocôndria
	Diamina oxidase	Citosol
	Prostraglandina H sintase	Microssomos
	Flavina monooxygenase	Microssomos
	Citocromo P450	Microssomos

Quadro 4. Reações e Enzimas da Fase II da Biotransformação de Xenobióticos e Suas Principais Localizações Subcelulares. Fonte: PARKINSON, 2001.

Reação	Enzima	Localização subcelular
Conjugação com ácido glicurônico	UGT	Microsomos
Conjugação com glutatona	GST	Citosol e microsomos
Conjugação com sulfato	Sulfotransferase	Citosol
Conjugação com aminoácidos	Acetil-CoA e N-acil amino-transferase	Mitocôndria e microsomos
Acetilação	N-acetiltransferase	Mitocôndria e citosol
Metilação	N-metiltransferase	Citosol, microsomos e sangue

1.2.1- Citocromos P450

As enzimas metabolizadoras de xenobióticos estão virtualmente distribuídas em quase todos os tecidos, como fígado, intestino, pulmão, coração, cérebro, supra-renal, placenta e outros. Os citocromos P450 (CYP) são enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e de substâncias endógenas. Essas monooxigenases constituem uma complexa superfamília, e mais de 504 isoformas já foram identificadas e sequenciadas. Tais proteínas já foram encontradas na maioria dos organismos vivos, animais e vegetais, de protistas até o homem (LEWIS, 1996_a).

CYPs são determinantes na manutenção do estado homeostático, estando envolvidas no metabolismo endógeno, na catálise do ácido araquidônico, na síntese de eicosanóides, esteróides, colesterol e ácidos biliares, e no metabolismo de xenobióticos, como fármacos, poluentes ambientais, aditivos alimentares e toxinas, especialmente aquelas substâncias com alto caráter lipofílico (PARKINSON, 2001; NELSON *et al.*, 2004).

Os CYP foram assim denominados por absorverem luz a um comprimento de onda de 450 nm quando ligados ao monóxido de carbono, após redução pelo ditionito de sódio (OMURA: SATO, 1964). A principal função destas enzimas é realizar a biotransformação dos xenobióticos em metabólitos com um maior caráter hidrofílico, para que possam ser mais facilmente eliminados pelos rins, através da urina e pela bile, através das fezes. A transformação ocorre devido às alterações das propriedades físico-químicas dos xenobióticos lipofílicos, que podem ser estruturalmente modificados, o que facilita a sua solubilidade em água.

CYPs são as enzimas mais importantes da fase I do metabolismo, destacando-se por sua extraordinária versatilidade catalítica. CYPs tem um papel de extrema importância tanto sob o ponto de vista farmacológico quanto toxicológico, quer seja na eliminação de inúmeros xenobióticos lipofílicos a que os seres humanos e os animais estão expostos – desintoxicação - quer seja na conversão de xenobióticos inertes em metabólitos ativos - ativação metabólica (LEWIS, 1996_a).

Em seres humanos, já foram descritas 18 famílias CYP e isoladas 50 isoformas, dentre as quais 35 apresentam importância clínica (COLLEMAN, 2007; NELSON, 2009). As famílias CYP são identificadas por um número arábico (CYP1, 2, 3...) e as subfamílias por uma letra maiúscula após o número indicativo da família gênica

(CYP1A, 1B, 2A, 2B, 2E, 2C, 3A...). As isoformas individuais são identificadas por um número arábico, seguido por uma letra maiúscula (subfamília) e outro número arábico, *e.g.*, CYP2A5 é a isoforma 5 da subfamília 2A (NELSON, 2009).

A sigla CYP quando representa as enzimas murinas, é escrita com letras minúsculas (exceto o C de citocromo), *e.g.*, Cyp2a5 (COLLEMAN, 2007; NELSON, 2009). A homologia entre CYPs de espécies diferentes é avaliada segundo a similaridade na sequência de aminoácidos. Por exemplo, CYP1A1 humana é 80% similar à isoforma do rato (LEWIS, 1996_b).

A família de genes CYP diversificou-se desde a sua origem há mais de 3,5 bilhões de anos para a sua adaptação ao metabolismo de inúmeras substâncias químicas que são ingeridas diariamente (BENET *et al.*, 1996).

1.2.1.1 – Mecanismo de Catálise

O citocromo P450 é o sistema mais eficiente de desintoxicação e ativação metabólica de uma ampla variedade de xenobióticos. Todos os CYPs são hemoproteínas capazes de catalisar a monooxigenação de um átomo de oxigênio para um substrato. Durante a reação, outro átomo de oxigênio é reduzido a água com os equivalentes de redução derivados do NADPH (KLAASSEN: WATKINS, 2012).

CYPs não reagem diretamente com NADPH ou NADH. Uma flavoproteína chamada de NADPH-citocromo P450 redutase libera os elétrons do NADPH para o CYP no retículo endoplasmático. Já nas mitocôndrias, os elétrons são transferidos para o CYP pela ferredoxina e pela ferredoxina redutase (KLAASSEN: WATKINS, 2012).

Há uma maior interação entre CYP e a NADPH-citocromo P450 redutase já que estão ancoradas na bicamada fosfolipídica do retículo endoplasmático. A fase inicial do ciclo catalítico implica na ativação do oxigênio e a fase final abrange a oxidação do substrato (KLAASSEN: WATKINS, 2012).

Quando o substrato liga-se ao CYP, o ferro do grupamento heme é reduzido do estado férrico para o ferroso com a adição de um elétron da NADPH-citocromo P450 redutase. O CYP volta à sua forma inicial com a liberação do substrato oxidado (KLAASSEN: WATKINS, 2012) (Fig.4).

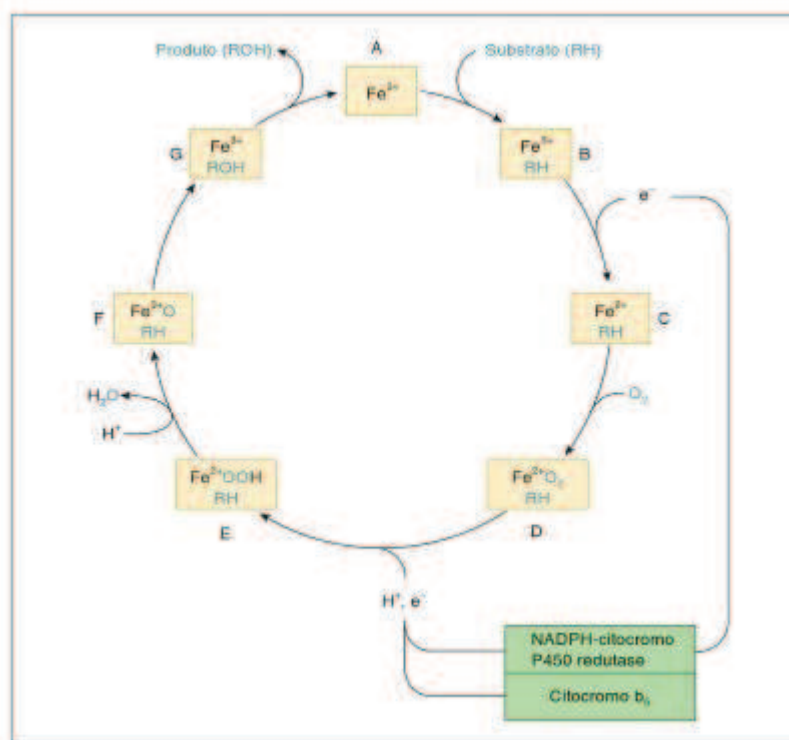


Figura 4 - Ciclo catalítico de CYP. Fonte: KLAASSEN: WATKINS, 2012.

1.2.1.2 – Localização Celular de CYP

A circulação do fígado e intestino evoluiu de modo a levar os xenobióticos até os hepatócitos. Uma vez nos hepatócitos, a etapa seguinte do processo de metabolismo é subcelular, isto é, os xenobióticos, em sua maioria altamente lipofílicos, são encaminhados para o retículo endoplasmático liso (REL) dos hepatócitos, onde os CYPs estão ancorados na matriz fosfolipídica (COLEMAN, 2010).

O retículo endoplasmático rugoso se assemelha a uma linha de montagem onde os ribossomos produzem as proteínas. Já com relação ao REL, sua estrutura lembra uma massa de tubos. As paredes são as partes mais lipofílicas do REL, ou seja, as membranas. Os xenobióticos fluem no interior dos tubos do REL diretamente para o sistema CYP monooxigenase em um ambiente altamente lipofílico. Dessa forma, moléculas lipofílicas são levadas para o fígado por duas razões: pelas suas características lipofílicas, a entrada em áreas aquosas da célula é impedida, e uma vez no REL, serão metabolizadas pelas isoformas CYP em moléculas mais hidrossolúveis (COLEMAN, 2010).

Quando atingem a hidrossolubilidade, os metabólitos são repelidos nas paredes do REL e entram no lúmen ou no citoplasma, o que faz com que se estabeleça e mantenha um gradiente de concentração (COLEMAN, 2010). A localização subcelular do CYP está representada na Fig.5.

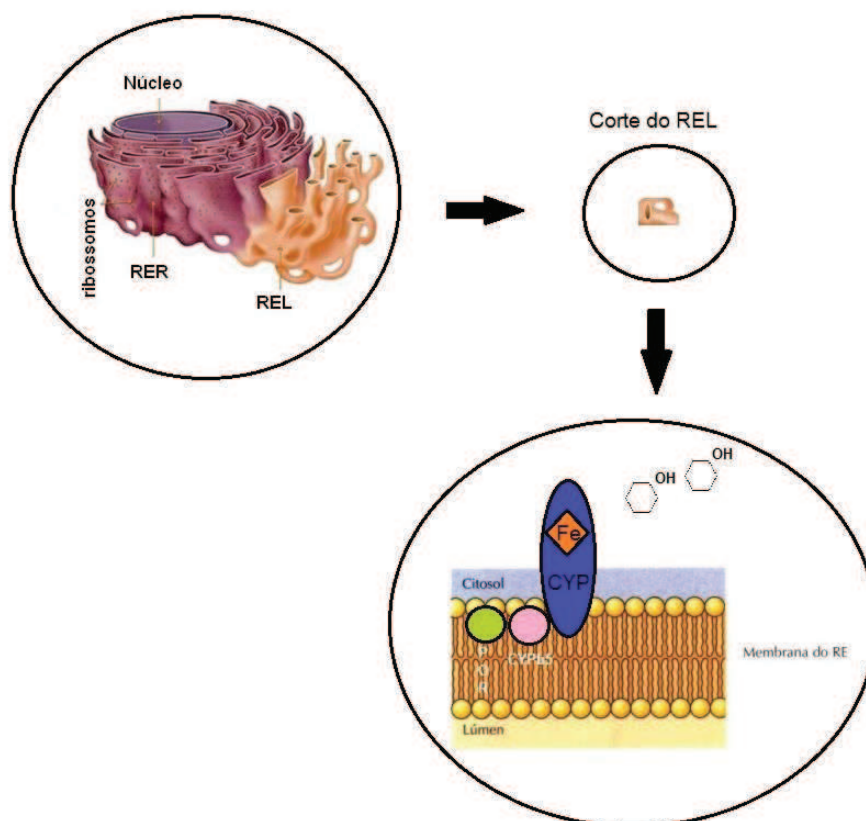


Fig. 5 – Localização subcelular de CYP no hepatócito.

1.2.1.3 – Isoformas CYP humanas e murinas

1.2.1.3.1 – CYP1A1/2

A subfamília CYP1A é de grande importância para a Saúde Pública, pois as suas isoformas são responsáveis pela ativação metabólica de pré-carcinógenos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), *e.g.*, benzo[a]pireno (MARTIGNONI *et al.*, 2006). Os membros desta subfamília, CYP1A1 e CYP1A2, possuem grande similaridade em suas estruturas primárias e características físico-químicas (KAWAJIRI: HAYASHI, 1996). Tais isoformas são altamente conservadas entre as diferentes espécies. Entre a espécie humana e camundongos, a similaridade da CYP1A1 é de 83% e da CYP1A2, 80% (MARTIGNONI *et al.*, 2006). Dez espécies moleculares de

CYP1A1 (de peixes e mamíferos) foram clonadas e sequenciadas. Se comparadas, as isoformas CYP1A1 e CYP1A2 exibem um percentual de similaridade de aproximadamente 71% em camundongos e 69% em ratos (KAWAJIRI: HAYASHI, 1996).

A expressão hepática da isoforma CYP1A1 é baixa. Há relatos de que a sua expressão só seja detectada após indução, já que metaboliza o benzo[a]pireno e outros HPAs, xenobióticos absorvidos, em geral, através do trato gastrointestinal e respiratório. No homem, CYP1A1 é considerada uma enzima extra-hepática, já que grandes quantidades de RNAm e proteínas foram encontradas nos pulmões, linfócitos e placenta de fumantes ativos, e níveis indetectáveis de RNAm e proteínas tenham sido observados na maioria dos fígados desses indivíduos (KAWAJIRI: HAYASHI, 1996).

A CYP1A2 é expressa especialmente no fígado, sendo capaz de metabolizar hormônios e xenobióticos, como acetaminofeno, teofilina, cafeína, e outros compostos que apresentam grupamento amino (MARTIGNONI *et al.*, 2006; COLLEMAN, 2007).

A CYP1A2 humana é induzida pelo tabaco, plantas da família das crucíferas (*e.g.*, brócolis e couve de Bruxelas) e carne grelhada, e pelos medicamentos omeprazol e nafcilina. CYP1A2 representa 13% das CYP hepáticas humanas (SHIMADA *et al.*, 1994 apud YANG *et al.*, 2006). A subfamília CYP1A foi investigada neste estudo, pois está envolvida em muitas reações de ativação metabólica de xenobióticos, como HPAs e pró-fármacos, como teofilina (KAWAJIRI: HAYASHI, 1996).

A conservação evolutiva da subfamília 1A até os mamíferos pode indicar que a mesma tenha função importante no metabolismo de xenobióticos. Há muitos relatos sobre o papel da subfamília CYP1A em diversas funções metabólicas, envolvendo a mutagênese ou carcinogênese em animais experimentais. As isoenzimas CYP1A1 e CYP1A2 apresentam especificidades distintas para os substratos, porém, ocorre certa superposição em algumas ocasiões (LEWIS, 1996_a). Exemplificando, em camundongos, Cyp1a1 e Cyp1a2 catalisam a *O*-desalquilação da 7-etoxiresorufina. Já em ratos, Cyp1a1 catalisa preferencialmente a *O*-desalquilação da 7-etoxiresorufina, ao passo que Cyp1a2 catalisa de modo preferencial a *O*-desalquilação da 7-metoxiresorufina (BURKE *et al.*, 1985).

De forma geral, a subfamília CYP1A participa do metabolismo oxidativo de substâncias exógenas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas heterocíclicas e aminas aromáticas (PARKINSON, 2001; LEWIS, 1996_a).

Tanto o CYP1A1 como o CYP1A2 são induzidos por 3-metilcolantreno, β -naftoflavona, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) e outros hidrocarbonetos policíclicos (PARKINSON, 2001; IOANNIDES & PARKE, 1990). A regulação por transcrição destes dois genes, CYP1A1 e CYP1A2, é mediada por mecanismos comuns, como a ativação do receptor Ah, em resposta aos indutores. Porém, muitas diferenças entre as duas isoformas têm sido observadas quanto à capacidade de resposta aos indutores. O isosafrole, por exemplo, indutor seletivo de CYP1A2 hepático, tem efeito discreto sobre CYP1A1 (KAWAJIRI; HAYASHI, 1996).

1.2.1.3.2 – CYP2A5

Entre todos os membros integrantes da subfamília CYP2A, o Cyp2a5 foi o que mais recebeu atenção entre os pesquisadores, já que esta enzima é capaz de mediar diversas reações de importância toxicológica. O Cyp2a5 (ortóloga da CYP2A3 de ratos) e seu ortólogo humano, CYP2A6, metabolizam diferentes substratos como cumarina, nicotina, cotinina e fármacos, como halotano e losigamona. Ambas as Cyp2a5 e CYP2A6 atuam no metabolismo de toxinas, como das nitrosaminas N-nitrosodietilamina (NDEA) e da nitrosamina-cetona derivada da nicotina (NNK), e da aflatoxina B1 (POSTI *et al.*, 1999).

Um excelente marcador para a atividade hepática murina da Cyp2a5 é a reação da cumarina-7-hidroxilase (COH), tendo em vista que anticorpos anti-2A5 inibem quase completamente (mais de 99%) esta atividade em microsomos hepáticos isolados de camundongos machos e fêmeas das linhagens DBA-2 e AKR não tratados e tratados com fenobarbital ou pirazol. Porém, as atividades hepáticas 7-etoxicumarina-*O*-desetilase, anilina 4-hidroxilase, etilmorfina *N*-desmetilase, benzo[*a*]pireno 3-hidroxilase e pentoxiresorufina-*O*-despentilase não são marcadores úteis para o Cyp2a5 hepático (LANG *et al.*, 1989).

Há diferenças importantes no metabolismo da cumarina entre linhagens diferentes de camundongos. No DBA-2, a atividade da cumarina-7-hidroxilase é

relativamente alta, mas é consideravelmente menor nas linhagens AKR/J, C57BL/6N, C3H/HeJ, BALB/c, CBA, C57BL/10 e Swiss Webster (WOOD: CONNEY, 1974; WOOD & TAYLOR, 1979; VAN IERSEL et al., 1994; POÇA, 2013). Vale ressaltar que Poça (2013) demonstrou pela primeira vez em seu estudo que, apesar das notáveis diferenças das atividades constitutivas de COH evidenciadas entre as fêmeas adultas das linhagens isogênicas DBA-2, DBA-1, BALB/c, CBA, C57BL/6, C57BL/10, da linhagem *outbred* Swiss Webster e da híbrida B6D2F1, a expressão do RNAm de Cyp2a4/5 pouco diferia, sendo o BALB/c a linhagem com maior expressão constitutiva.

Além da variação da atividade enzimática entre as linhagens, a Cyp2a5 possui uma expressão sexo-específica, notando-se uma atividade maior entre as fêmeas (PEARCE *et al.*, 1991).

A Cyp2a5 é expressa no fígado e em outros tecidos extra-hepáticos, como a mucosa olfatória, e sua atividade e expressão hepática ocorrem predominantemente em fêmeas (KIRBY *et al.*, 2011). Também tem sido descrito que a atividade da COH murina apresenta um modo de hereditariedade aditiva devido à presença de dois alelos no locus do gene do Cyp2a5 no cromossomo. Estes dois alelos são capazes de promover atividades diferenciadas, ou seja, um dos alelos promove atividade elevada, enquanto o outro promove baixa atividade (WOOD: CONNEY, 1974; WOOD: TAYLOR, 1979; RAUNIO *et al.*, 1988).

Além de ser induzido por substâncias químicas, foi demonstrado que Cyp2a5 também estava induzido em alguns processos infecciosos, como na hepatite, na fasciolíase e na malária (KIRBY *et al.*, 1994; MONTERO *et al.*, 1999; DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006, 2010). A hipótese de que a indução de Cyp2a5 ocorreria em resposta ao dano hepatocelular, resultando na alteração do estado redox da célula e em estresse do RE foi levantada por alguns autores (GILMORE *et al.*, 2003; GILMORE: KIRBY, 2004). Neste sentido, foi demonstrado que o tratamento de camundongos com a toxina pirazol, indutora de Cyp2a5, resultou na superexpressão do biomarcador do estresse do RE, GRP78 (*glucose-regulated protein 78*, proteína regulada pela glicose) (GILMORE *et al.*, 2003). A indução de Cyp2a5 pelo pirazol provocava lesão hepática nos camundongos DBA-2, evidenciada pelos aumentos dos níveis da transaminase ALT, o que reforçava a relação entre lesão hepática e indução de Cyp2a5. No entanto, a administração das citocinas IL-1 β e IL-6 recombinantes, que simulavam um processo

inflamatório, não provocavam efeito sobre a isoforma. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que embora o tratamento de hepatócitos primários de camundongos com os ativadores do estresse do RE tapsigargina, tunicamicina, trans-4, 5-dihidroxi-1,2-ditiano (DTT_{ox}) e o ionóforo de cálcio A23187 (calcimicina) tenha resultado em níveis elevados do RNAm de GRP78, apenas o agente redutor DTT_{ox} induziu os níveis do RNAm e da proteína Cyp2a5, e a atividade da COH. Estes resultados levaram os autores a concluir que a indução de Cyp2a5 na lesão hepatocelular envolvia a alteração do estado redox do RE (GILMORE: KIRBY, 2004).

1.2.1.3.3 – Cyp2b

Em fígados de camundongos, dezesseis genes Cyp2b já foram encontrados. Embora não se saiba ainda quais destes genes são ativos, duas isoenzimas, Cyp2b9 e Cyp2b10, foram, há muito, identificadas nesta espécie (HONKAKOSKI *et al.*, 1992). Apesar de possuírem 83% de homologia entre si, tais isoformas possuem grandes diferenças em sua regulação. Cyp2b9 é constitutiva e fracamente induzível, sendo controlada rigorosamente por hormônios. A isoforma Cyp2b10 é intensamente induzível pelo fenobarbital e controlada por hormônios sexuais, inclusive, foi a primeira isoenzima induzida por substâncias químicas, como clordano e bifenilas halogenadas (LEIGHTON: KEMPER, 1984; YOSHIOKA *et al.*, 1990).

As isoenzimas da subfamília Cyp2b metabolizam uma grande diversidade de substratos, o que varia de acordo com a espécie, a linhagem e o sexo do animal. Os substratos usados como sondas catalíticas são a aminopirona, a etilmorfina e a zoxazolamina, porém não são específicos dessa subfamília. 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; NERURKAR *et al.*, 1993; BURKE *et al.*, 1985).

A subfamília CYP2B participa da ativação metabólica de substâncias de importância toxicológica, como o bromobenzeno, o tetracloreto de carbono, a cocaína, o paration, o tricloroetileno e substâncias pró-carcinógenas, como aflatoxina B1 e dibenzoantraceno. CYP2B também metaboliza fármacos anti-neoplásicos, como

ciclofosfamida, e anestésicos, como o propofol, sendo o fenobarbital um potente indutor desta subfamília (NIMS: LUBET, 1996; COLLEMAN, 2007).

No homem, as isoformas CYP2B6 e CYP2B7 são encontradas tanto no fígado como em tecidos extra-hepáticos (MARTIGNONI *et al.*, 2006). CYP2B6 representa 2% das CYP hepáticas humanas (SHIMADA *et al.*, 1994 apud YANG *et al.*, 2006).

1.2.1.4 – Importância clínica da inibição e indução de CYP

A velocidade de biotransformação depende de vários fatores, como: concentração de CYP no tecido, proporção das diferentes isoformas, afinidade pelo substrato, redução do complexo xenobiótico-citocromo P450 e da competição entre substratos endógenos e exógenos (RELLING: EVANS, 1992). Também pode ser modificada por agentes genéticos, fisiológicos e ambientais ou, até mesmo, pelo uso conjunto de medicamentos. Com isso, dois resultados antagônicos podem acontecer: inibição ou indução de CYP, o que afeta diretamente a posologia médica (OSHIMA-FRANCO: FRANCO, 2003).

A atividade enzimática de CYP quando inibida ou induzida por xenobióticos leva às variações na resposta terapêutica. Dessa forma, as associações de medicamentos devem receber atenção especial (MEYER, 1996).

A indução ou inibição de CYP pode ser circunstancial, acidental ou o efeito realmente desejado com a terapia. A indução de CYP ocorre, sobretudo devido ao aumento da sua expressão enzimática consequente ao aumento da transcrição e tradução ou pela diminuição da sua degradação. A indução de CYP pode levar a diversas consequências: uma delas seria o fármaco aumentar o seu próprio metabolismo. Um exemplo seria a carbamazepina (um agente antiepilético) que não apenas induz o CYP3A4, como também é metabolizada por essa enzima. Por consequência, a carbamazepina aumenta o seu próprio metabolismo a partir da indução de CYP3A4 (TANIGUCHI: GUENGERICH, 2009). Outra consequência seria um fármaco aumentando o metabolismo de outro fármaco coadministrado. Como por exemplo, o CYP3A4 metaboliza cerca da metade de todos os fármacos clinicamente prescritos. Caso um desses fármacos seja coadministrado com a carbamazepina, seu metabolismo também será aumentado. Com o aumento da atividade de CYP3A4, pode acontecer a

redução das concentrações do fármaco abaixo de seus níveis terapêuticos, caso tenham sido administradas doses convencionais desses fármacos, sendo este um problema a ser enfrentado pelo clínico (TANIGUCHI: GUENGERICH, 2009).

A indução de CYP ou de outras enzimas de biotransformação também pode levar à produção de níveis tóxicos dos metabólitos reativos dos fármacos, causando lesão tecidual ou outros efeitos colaterais (TANIGUCHI: GUENGERICH, 2009).

A inibição de CYP pode levar à redução do metabolismo dos fármacos que são metabolizados pela enzima inibida. Tal inibição leva os níveis do fármaco a concentrações tóxicas, prolongando a atividade do fármaco no organismo. Como exemplo, temos o cetoconazol, que é um fármaco anti-fúngico. Ele possui um nitrogênio que se liga ao ferro do heme no sítio ativo de CYP. Tal ligação bloqueia, por inibição competitiva, o metabolismo de fármacos administrados conjuntamente (TANIGUCHI: GUENGERICH, 2009).

1.2.2- Modulação de CYP nas Doenças Infecciosas

CYPs podem ser moduladas positiva ou negativamente por agentes externos aos organismos, como consequência à exposição a uma grande diversidade de agentes químicos, mas também a agentes biológicos, como bactérias, parasitos e vírus (MORGAN, 1997).

1.2.2.1 – Exemplos em Seres Humanos

Muitos estudos clínicos relataram alterações farmacocinéticas em pacientes com doenças inflamatórias, infecciosas e câncer (AITKEN *et al.*, 2006; MORGAN *et al.*, 2008; MORGAN, 2009). Data de 1976, a demonstração por Renton e Mannering (1976_a) que agentes indutores de interferon, como o lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*, vírus Mengo e vacina pertussis, deprimiam as atividades de isoformas e os níveis totais de CYPs hepáticas em ratos. Posteriormente, os mesmos autores sugeriram que a redução do metabolismo e da eliminação de medicamentos de uso contínuo durante um processo infeccioso e inflamatório poderia desencadear um quadro de toxicidade com a administração da mesma dose do medicamento que anteriormente não se mostrava

tóxica para o mesmo paciente (RENTON: MANNERING (1976_b). De fato, foi constatado por Chang *et al.* (1978) que em crianças asmáticas que haviam contraído uma infecção viral do trato respiratório superior, a depuração da teofilina era muito mais lenta do que após a recuperação do quadro viral. Poucos anos mais tarde, pesquisadores relataram que durante o surto de influenza B de 1980 que ocorreu em Washington, EUA, crianças asmáticas que já se tratavam com uma dose estável de teofilina foram hospitalizadas com convulsões, dores de cabeça, náusea e vômitos. Os pesquisadores associaram os sintomas descritos à redução da depuração da teofilina, mais do que ao próprio estado viral (KRAEMER *et al.*, 1982).

Foram também relatados casos de associação entre vírus, como Herpes simples, adenovírus e HIV (*human immunodeficiency virus*, vírus da imunodeficiência humana), e depressão do metabolismo por CYP com redução da eliminação de medicamentos e fármacos. Anolik *et al.* (1982) relataram que a alteração da meia-vida da teofilina em uma criança de nove anos com gengivostomatite pelo Herpes simples estava associada ao quadro de neurotoxicidade observado na paciente. Forsyth *et al.* (1982) descreveram em crianças com idades entre cinco meses e cinco anos, que a eliminação da antipirina na saliva diferia entre os períodos febril e controle (duas a quatro semanas após cessada a febre), sendo o valor médio do *clearance* durante a febre ($32 \pm 13 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) aproximadamente 50% inferior ao observado durante o período afebril ($52 \pm 22 \text{ mL kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Lee *et al.* (1993) estudaram os índices oxidativos do metabolismo da cafeína (desmetilação, oxidação pela xantina e 8-hidroxilação) em três grupos de pacientes infectados pelo HIV: um grupo que apresentava um quadro agudo da doença, um grupo com a doença controlada e um grupo infectado e assintomático, além dos controles (não infectados). Os resultados mostraram que no grupo assintomático, o metabolismo do fármaco era semelhante ao grupo controle. No entanto, a lenta acetilação e as alterações das vias oxidativas observadas nos pacientes com a doença aguda poderiam explicar a incidência elevada de reações adversas a medicamentos evidenciada nesses pacientes.

O efeito sobre a farmacocinética de fármacos nas doenças inflamatórias, como artrite reumatoide (AR), foi relatado por alguns autores. Mayo *et al.* (2000) relataram em pacientes voluntários portadores de AR, que os níveis sanguíneos de R-verapamil e S-verapamil estavam elevados 12 h após a administração de 80 mg do medicamento. Os níveis sanguíneos elevados de IL-6 e óxido nítrico (NO) observados nos pacientes estavam associados à gravidade do quadro da doença inflamatória. Os autores sugeriram

que o clearance reduzido do medicamento, associado às alterações da ligação às proteínas e do fluxo sanguíneo hepático, poderiam justificar os níveis elevados dos enantiômeros observados nos pacientes artíricos. O trabalho de Schmitt *et al.* (2011) com doze pacientes com AR mostra a menor exposição à sinvastatina quando administrada aos pacientes que também recebem tocilizumabe (imunoglobulina recombinante, IG1). Os pacientes com AR apresentam altos níveis de IL-6, que interfere com CYP3A4, causando uma redução das reações catalisadas por essa isoforma CYP. Como a sinvastatina é metabolizada pela CYP3A4, a neutralização da IL-6 pela administração do tocilizumabe, e consequente retorno da atividade de CYP3A4 aos níveis normais, reduz os níveis sanguíneos da sinvastatina. Os autores ressaltam, com propriedade, a necessidade de cautela ao administrar ambos os medicamentos a pacientes com AR, devido ao risco da ocorrência de interações entre a doença e os medicamentos, o que pode levar ao aparecimento de efeitos adversos.

1.2.2.2 – Estudos Experimentais

Estudos com camundongos transgênicos acometidos pelo vírus da Hepatite B (VHB) revelaram que o estresse do RE desempenhava um papel importante na indução de Cyp2a5. Os autores observaram que cadeias filamentosas longas do políptideo VHB acumulavam-se dentro do ER, causando uma resposta inflamatória crônica localizada, o que foi associado à indução de Cyp2a5 hepático (KIRBY *et al.*, 1994_a).

Em estudo realizado para investigar a expressão e atividade de CYPs hepáticas e a cinética do praziquantel na infecção pelo *Schistosoma mansoni*, camundongos Swiss Webster (SW) de ambos os gêneros foram infectados no décimo dia pós-natal e mortos nos dias 30 e 55 pós-infecção (PI). Independentemente do sexo, a infecção deprimiu as atividades de Cyp1a, 2b9/10, 2e1 e 3a11 no dia 55 PI, mas não no dia 30 PI. A expressão do RNAm das Cyp estudadas Cyp1a, 2b9/10, 2e1 e 3a11 estava reduzida no dia 55 PI, mas apenas o RNAm de Cyp1a2 e 3a11 estava reduzido 30 dias PI nas fêmeas, mas não nos machos. Os autores também observaram que a cinética do praziquantel estava reduzida no dia 55 PI, mas não no dia 30 PI (GOTARDO *et al.*, 2011).

As alterações de enzimas microsossomais hepáticas durante a infecção precoce, quando os granulomas ainda não se formaram no fígado, também foram estudadas por Manhães-Rocha e colaboradores (2005). O conteúdo total hepático de CYPs e as atividades de Cyp1a, 2b, 2a5, 2e1 e da UGT foram avaliadas em microsossomos hepáticos de camundongos SW e DBA-2 mortos 15 e 30 dias PI. Os níveis de CYPs e as atividades enzimáticas não foram alteradas em camundongos SW e DBA-2 no dia 15 PI. Porém, os níveis totais de CYP e pequenas alterações das atividades de Cyp1a, 2b e 2e1 foram observadas no dia 30 PI. Os resultados levam a crer que, embora haja uma baixa regulação consistente e quase generalizada de CYPs na esquistossomose crônica, alterações das Cyps hepáticas na fase inicial da infecção são específicas da isoforma Cyp e do gênero e linhagem do camundongo.

Ainda com relação ao *S. mansoni*, foram demonstradas alterações das atividades de CYP hepáticas murinas no estágio crônico da doença, quando a reação granulomatosa em torno dos ovos dos vermes presentes nos fígados era menor e a fibrose do tecido hepático era intensa. Conte e colaboradores (2007) avaliaram as atividades de CYP em camundongos SW e DBA-2 no dia 90 PI e constataram reduções de Cyp1a e 2b, bem como do teor total de Cyp em ambas as linhagens.

Camundongos infectados naturalmente por *Helicobacter hepaticus* desenvolvem uma hepatite crônica ativa, levando ao carcinoma hepatocelular. A partir deste modelo, foi examinado o impacto da infecção bacteriana na expressão hepática e atividade das enzimas envolvidas na ativação de pró-carcinógenos (enzimas de fase I) e na desintoxicação (enzimas de fase II). Os autores não observaram diferenças entre os teores totais de Cyp entre os camundongos infectados e os controles, mas a avaliação imunohistoquímica revelou aumento de Cyp1a2 e 2a5 proporcional à idade dos animais e à gravidade da lesão. Vale ressaltar que nos hepatócitos onde havia superexpressão de Cyp2a5, evidenciada por *northern blotting*, também se observou acúmulo de marcadores de estresse oxidativo. Com relação às enzimas de fase II, um aumento da atividade e das concentrações da proteína glutatona S-transferase (GST) foi observado nos camundongos infectados. Diante desses resultados, os autores sugeriram que as alterações de CYP e da GST poderiam contribuir para a etiologia da incidência tumoral em função da infecção por *H. hepaticus*, através da produção de espécies reativas de oxigênio (CHOMARAT *et al.*, 1997).

Montero *et al.* (1999) investigaram a capacidade do parasito *Fasciola hepatica* de alterar as enzimas do hospedeiro, com o objetivo de correlacionar a infecção ao desenvolvimento de tumor maligno no tecido hepático de camundongos. Os dados obtidos demonstraram aumento da atividade do Cyp2a5 e alteração da distribuição hepática da isoforma, em decorrência do processo inflamatório e da proliferação do tecido hepático.

Para elucidar os mecanismos envolvidos na interação sinérgica entre a exposição aos carcinógenos químicos (nitrosaminas), a infestação hepática pelo *Opisthorchis viverrini* e o desenvolvimento de hepatocarcinoma, a análise imunohistoquímica do fígado de hamsters infectados foi realizada. Os resultados mostraram que a alta expressão de Cyp2a5 nos fígados parasitados poderia constituir fator de risco para o desenvolvimento de câncer hepático associado à hepatite parasitária (KIRBY *et al.*, 1994_b).

1.2.2.3- Modulação de CYP na Malária Murina

O primeiro relato da associação malárica à depressão da atividade de enzimas hepáticas data de 1970, quando McCarthy e colaboradores publicaram um estudo onde ratos infectados com *P. berghei* e mortos no período entre 1 e 8 dias PI apresentaram redução do metabolismo hepático de etilmorfina, anilina, p-nitroanisol e hexobarbital. O teor total de CYP hepático também estava reduzido. Visto que foi observado que houve redução das atividades das CYP hepáticas e prolongamento do tempo de sono pelo barbitúrico, os autores questionaram se as alterações bioquímicas seriam decorrentes da ação do parasito ou de efeitos secundários provocados pela infecção.

Em 1984, o artigo de Alvares e colaboradores (1984) sugeriu que a malária poderia comprometer a capacidade metabolizadora do fígado. Usando camundongos NIH/NMRI ou A/J, os autores estudaram o efeito da infecção pelo *P. berghei* sobre as alterações de CYP hepáticas e concluíram que a malária no estágio eritrocítico podia comprometer significativamente a capacidade do fígado de metabolizar fármacos e substâncias carcinogênicas.

Uhl *et al.* (1999) descreveram em ratos machos Sprague-Dawley, que a malária (*P. berghei*) reduziu o teor total de CYP em comparação com os animais controles. A

atividade da clorzoxazona 4-hidroxilase (mediada por Cyp2e1) não foi diferente quando animais infectados foram comparados aos seus controles, enquanto a atividade da testosterona-6-beta-hidroxilase (mediada por Cyp3a2) foi reduzida nos ratos infectados. Os estudos mostraram ainda que a perda da atividade do Cyp3a2 estava associada à redução da expressão do Cyp3a2 nos animais maláricos.

Usando um modelo de malária letal (*P. berghei* ANKA) em camundongos DBA-2, De-Oliveira *et al.* (2006) demonstraram que as atividades da isoforma Cyp2a5 e Cyp2e1 (comparados aos animais controles) estavam elevadas no estágio avançado da doença, enquanto as subfamílias Cyp1a e Cyp2b estavam deprimidas. Em estudo posterior, foi observado que na malária não letal (*P. chabaudi chabaudi*) na mesma linhagem de camundongo, as atividades de Cyp2a5 estavam elevadas nos momentos de pico das taxas de parasitemia, retornando aos valores basais com a evolução da doença para a cura, enquanto as atividades de Cyp1a e 2b não estavam alteradas. Neste estudo, também foi demonstrado que as atividades das enzimas de fase II, GST e UGT, não eram alteradas pela infecção letal (DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Como os CYPs participam da ativação e desintoxicação de xenobióticos, foi investigado se a malária seria capaz de modificar os efeitos de carcinógenos sobre a medula óssea com o ensaio do micronúcleo. Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram infectados com *P. berghei* (ANKA) e tratados com ciclofosfamida (CFA), 7,12-dimetilbenzo[a]antraceno (DMBA) ou metanossulfonato nos dias 9-12 PI, quando a parasitemia se encontrava maior ou igual a 9%. Os resultados mostraram que os efeitos de CFA e DMBA, que dependiam de ativação metabólica por CYP para exercerem os seus efeitos tóxicos, estavam reduzidos, enquanto o efeito do clastógeno direto, que não dependia de ativação metabólica, estava aumentado pela infecção. Os mesmos autores mostraram que a infecção pelo *berghei* diminuiu a atividade de Cyp1a e Cyp2b em microsossomos hepáticos, apoiando a hipótese de que a redução da genotoxicidade causada pela malária estava associada à depressão das isoformas CYP que ativam metabolicamente a CFA (Cyp2b) e DMBA (Cyp1a) em seus metabólitos tóxicos (POÇA *et al.*, 2008).

Em estudo subsequente, foi evidenciado que as atividades de Cyp1a, 2b, 2e1 e 3a11 estavam deprimidas, enquanto a atividade da UGT estava inalterada, nos fígados de camundongos machos SW infectados pelo *P. berghei* (ANKA), quando as

parasitemias ultrapassavam 20%. O prolongamento do sono com o midazolam e uma menor liberação de clorzoxazona também foram vistos nos camundongos infectados. A redução dos níveis hepáticos do RNAm de Cyp1a2, 2e1 e 3a11 indicou que a malária deprimiu as atividades medidas por CYP de modo pré-traducional (CARVALHO *et al.*, 2009).

1.2.2.4 - Modulação de CYP na Malária Humana

Assim como em camundongos, há muitos estudos clínicos no homem que apontam a malária como uma doença capaz de modular o metabolismo e cinética de xenobióticos. De acordo com esse pensamento, Trenholme *et al.* (1976) investigaram a eliminação da quinina em cinco indivíduos infectados experimentalmente com uma linhagem *P. falciparum* resistente à cloroquina, antes e durante a indução da infecção, e em dois indivíduos antes e durante a indução da febre, também experimentalmente. Os níveis plasmáticos de quinina e a proporção entre a quinina não metabolizada e a quinina e seus metabólitos aumentaram em todos os indivíduos parasitados, levando os pesquisadores a concluir que a malária prejudicava o metabolismo hepático da quinina.

Posteriormente, Supanaranond *et al.* (1991) avaliaram a depuração sistêmica do sulfato de quinina por via oral em pacientes adultos com malária não complicada pelo *P. falciparum*, e confirmaram que a eliminação do medicamento na fase aguda da doença foi menor do que na fase de restabelecimento da doença.

Em estudo clínico do mesmo grupo (EDWARDS *et al.*, 1993) usando a primaquina como medicamento marcador, foi observado que a sua depuração estava diminuída nos pacientes com malária pelo *P. falciparum*.

Em outro estudo, o artesunato foi administrado via oral (3 mg/kg) a 10 crianças vietnamitas com idades entre 6 e 15 anos acometidas pela malária *falciparum* moderada. A quantificação plasmática do fármaco foi realizada em ensaio biológico e sua atividade antimalárica foi expressa como di-hidroartemisinina. O medicamento foi prontamente absorvido e o tempo médio para alcançar o seu pico plasmático foi de 1,7 h. Foi observada uma grande variação no pico da concentração plasmática e uma variação de quatro vezes na área sob a curva concentração plasmática versus tempo. A meia-vida de eliminação plasmática era de 1 h. Apesar da dose alta, os níveis do antimalárico no

plasma após 12 h eram inferiores ao limite de detecção em todos os casos. Logo, o artesunato via oral é rapidamente absorvido e eliminado em crianças com malária falciparum moderada, mas deve-se levar em consideração as variações entre os indivíduos (BETHELL *et al.*, 1997).

Pukrittayakamee *et al.* (1997) analisaram os fatores que prejudicam a liberação da quinina durante a malária aguda causada pelo *P. falciparum*. Para isso, dezesseis pacientes tailandeses com malária grave ou moderadamente grave e doze no período de convalescença foram estudados. A depuração de quinina, dihidroquinina, antipirina, verde de indocianina (ICG) e iotalamato foram analisadas simultaneamente e esses valores foram relacionados à biotransformação da quinina em seu metabólito ativo (3-hidroxiquinina). Os resultados indicaram uma redução significativa na depuração da quinina, antipirina e ICG e na biotransformação da quinina na malária aguda, se comparados aos valores obtidos na convalescença. Já o iotalamato não foi afetado, não tendo relação com a liberação dos outros compostos. A depuração da quinina total e livre estava significativamente correlacionada com a depuração da antipirina, mas não com a de ICG. Embora a depuração da quinina tenha sido menos prejudicada do que a da dihidroxiquinina na malária aguda, as características farmacocinéticas desses dois compostos foram semelhantes. Os autores concluíram que a diminuição da depuração da quinina em consequência da malária aguda é resultado de uma disfunção ocasionada pela doença na atividade das oxidases hepáticas, como o CYP3A, que causa danos na biotransformação da quinina na 3-hidroxiquinina (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1997).

Com o objetivo de se recuperar de doenças como malária e kwashiorkor, os nigerianos fazem o uso de bebidas que contenham cafeína. De acordo com esta informação, Akinyinka *et al.* (2000_a) administraram uma dose oral única de cafeína em cinco crianças saudáveis e a cinco e sete crianças que sofriam de malária e kwashiorkor, respectivamente. Foram quantificados os níveis de cafeína e seus metabólitos no plasma. Os resultados obtidos demonstraram que a concentração plasmática máxima (C_{max}) da cafeína e o tempo de C_{max} foram similares nos três grupos. Porém, a meia vida de eliminação da cafeína foi significativamente maior em crianças com malária e kwashiorkor do que nos controles não infectados. A depuração oral plasmática de cafeína nas crianças saudáveis foi maior do que naquelas com kwashiorkor e malária. Em todos os grupos, a paraxantina foi o principal metabólito, estando mais elevada em

crianças saudáveis do que em crianças com malária e kwashiorkor. A atividade de CYP1A2 foi quantificada pela razão paraxantina/caféina no plasma, sendo esta razão menor nas crianças enfermas do que nos controles. Diante desses resultados, pôde-se concluir que a cinética plasmática da caféina e a atividade de CYP1A2 foram significativamente alteradas na presença das duas enfermidades.

Ainda com relação à eliminação da caféina, uma única dose oral de 300 mg de caféina foi dada a dez adultos nigerianos saudáveis e a dez adultos infectados com malária aguda não complicada pelo *P. falciparum*. A quantificação da caféina e seus metabólitos foi realizada no plasma e na saliva, indicando que a sua $C_{\max}$ foi semelhante nos dois grupos; porém, a $C_{\max}$ da paraxantina, seu metabólito, estava diminuída nos paciente maláricos. O gráfico da área sob a curva da concentração plasmática da razão caféina/paraxantina *versus* tempo foi utilizado como indicador da atividade do CYP1A2. A atividade desta CYP estava significativamente menor nos pacientes enfermos do que nos controles saudáveis. Uma vez que a conversão da caféina em paraxantina é catalisada por CYP1A2, estes resultados indicaram que a atividade desta isoforma hepática estava deprimida nos pacientes com malária (AKINYINKA *et al.*, 2000_b).

Seis pacientes voluntários com malária causada pelo *P. falciparum* e outros seis indivíduos saudáveis foram estudados por Teja-Isavadharm *et al.* (2001). Eles receberam uma dose única oral de 100 mg de artesunato e sua concentração plasmática e do seu metabólito, di-hidroartemisinina (DHA), foram quantificadas. O fármaco foi rapidamente absorvido e hidrolisado em DHA nos pacientes enfermos, enquanto a hidrólise foi incompleta nos voluntários saudáveis. Os valores de $C_{\max}$ e área sob a curva do metabólito DHA em portadores de malária foram significativamente maiores do que nos voluntários quando analisados por HPLC. Quando a análise foi realizada por um ensaio *in vitro*, as diferenças foram ainda maiores. Em compensação, as estimativas dos parâmetros meia-vida e tempo até o pico sanguíneo de DHA foram semelhantes nos dois grupos de pacientes, enfermos e saudáveis. Diante desses resultados, os autores concluíram que não só o metabolismo do medicamento contribuiu para essas diferenças, mas também a sua capacidade de se ligar a proteínas poderia explicar as diferenças da atividade antimalárica da artemisinina entre pacientes saudáveis e doentes.

Um amplo estudo com crianças (3 meses a 12 anos) e adultos (18 a 60 anos) africanos com malária não complicada pelo *P. falciparum* com o objetivo de avaliar os parâmetros farmacocinéticos do clorproguanil, da dapsona e do clorcicloguanil (metabólito ativo do cicloguanil) foi realizado por Simpson e colaboradores (2006). A combinação cicloguanil/dapsona, de rápida eliminação, foi apresentada como possível substituta da associação sulfadoxina/pirimetamina, que têm eliminação lenta, numa tentativa de evitar resistência aos medicamentos. Os autores concluíram que a malária falciparum não teve efeito sobre os parâmetros farmacocinéticos dos três medicamentos, quando comparados indivíduos adultos aos controles do experimento (indivíduos residentes fora do continente africano em área não endêmica de malária). No entanto, houve diferenças entre os perfis farmacocinéticos de adultos e crianças.

Pérez *et al.* (2009) investigaram a relação entre a falha terapêutica com o tratamento com a mefloquina e o estado nutricional e fenótipo e genótipo de CYP3A4 em pacientes com malária causada pelo *P. falciparum* por 28 dias. Homens e mulheres adultos de Turbo e El Bagre na Colômbia foram utilizados nesse estudo. Nenhuma diferença estatística foi vista entre a parasitemia de pacientes com falha no tratamento e aqueles em que o tratamento teve êxito. As concentrações de mefloquina sérica foram medidas 24 h após o tratamento e no décimo quarto dia de infecção. A fenotipagem metabólica de CYP3A4 foi realizada pela determinação da concentração de dextrometorfano (DMF) e o seu metabolito 3-metoximorfinano (3MM). A partir dos resultados, 20% dos pacientes foram classificados como metabolizadores lentos do medicamento (apresentaram uma concentração sérica maior do que 1,5 ng/mL de DMF/3MM). A concentração da mefloquina após 24 h foi baixa em 7% dos enfermos (apresentaram concentração sérica menor que 620 ng/mL, concentração necessária para impedir o desenvolvimento do parasito). Não houve relação entre o fenótipo de CYP3A4 e a concentração de mefloquina após 24 h de sua administração, mesmo após quatorze dias de infecção. Dessa forma, não foi possível avaliar em maior dimensão a relação entre a resposta à terapêutica antimalárica, atividade de CYP3A4 e estado nutricional, pois os resultados não foram suficientes para justificar maiores estudos da farmacocinética de antimaláricos na avaliação e controle das características do hospedeiro (PÉREZ *et al.*, 2009).

1.2.2.5 – Modulação de CYP em Modelos de Sepses

Como já citamos neste trabalho, o artigo de Renton e Mannering (1976b) foi pioneiro ao mostrar que o LPS interferia com as atividades de enzimas CYP e o teor hepático de CYPs totais. Artigos abordando o tema foram publicados na década de 1980 e 1990 por Sasaki *et al.* (1984), Stanley *et al.* (1988), Sewer *et al.* (1996), Rockich e Blouin (1999). Todos relataram alterações do metabolismo hepático em roedores que receberam a endotoxina.

Seguindo essa linha de investigação, usando o modelo simples de estímulo do sistema imune em camundongos tratados com uma ampla faixa de doses (0,05 a 20 mg/kg) do LPS, um estudo das atividades de CYP na resposta de fase aguda foi desenvolvido no LTA. Em camundongos da linhagem DBA-2, foi observado que as doses mais baixas (0,05 a 2 mg/kg) da endotoxina provocavam depressão das atividades de Cyp2a5, e não de Cyp1a e Cyp2b, que eram deprimidas com as doses mais altas (EROD, 2 a 20 mg/kg, BROD, 5 a 20 mg/kg), quando Cyp2a5 não era alterada (POÇA, 2013; DE-OLIVEIRA, dados não publicados).

Em modelo usado para estudar os efeitos da resposta de fase aguda (RFA) sobre as atividades de CYP hepáticas, Saitoh *et al.* (1999) trataram coelhos fêmeas com cinco injeções i.v de LPS (17 µg/kg/injeção) com intervalos de 1 hora. O desenho experimental era composto de quatro grupos de animais, sendo, um grupo controle e três grupos tratados com LPS (grupo I, II e III), eutanasiados em diferentes momentos após o tratamento com a endotoxina. Confirmada a RFA com a evidência do aumento da temperatura retal e das concentrações plasmáticas de IL-6 e proteína C-reativa (PCR), a farmacocinética da antipirina foi examinada antes da morte dos animais. Os resultados mostraram que o metabolismo dependente de CYP estava suprimido na RFA incipiente e os níveis das proteínas Cyp1a1 e 2e1 estavam reduzidos, retornando ao normal sete dias após a indução da APR.

A antipirina, bem como o hexobarbital e a teofilina, foram utilizados como medicamentos marcadores para avaliar o *clearance* de medicamentos em seres humanos que se submeteram voluntariamente ao tratamento com LPS. O quadro de sepsis foi evidenciado com o aumento da temperatura corpórea e das concentrações séricas de TNF- α , IL-1 e IL-6, e proteínas de fase aguda. Os resultados mostraram que a redução do *clearance* dos medicamentos coincidiu com o pico sanguíneo inicial de TNF e IL-6,

levando os autores a concluir que o processo inflamatório tem um efeito sobre as enzimas CYP responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos, mesmo quando ocorre exposição a baixas doses da endotoxina (SHEDLOFSKY *et al.*, 1994).

Na última década, artigos relatando estudos sobre a regulação de CYP durante a resposta inflamatória provocada pela endotoxina de bactérias Gram-negativas tem sido publicados, mostrando que o tema ainda é relevante e atual, e que ainda há muito a ser esclarecido. Alguns exemplos são comentados a seguir.

Theken e colaboradores (2011) avaliaram a expressão do RNAm de isoformas das famílias 2 e 4 no tecido hepático, renal, pulmonar e cardíaco de camundongos em diferentes momentos após a administração de LPS (1 mg/kg). 24 h após a administração da endotoxina, Cyp2c29, 2c44, 2j5, 4a12 e 4f13 hepáticos e renais estavam deprimidas. A avaliação da formação de eicosanoides associada aos resultados das alterações de CYP levaram os autores a concluir que a expressão de CYP durante a resposta imune depende da isoforma, do tecido e do tempo de exposição à endotoxina.

Em 2012, o grupo de Gandhi evidenciou, em camundongos C57BL/6 adultos, a redução do clearance do midazolam, substrato de Cyp3a e 2c murinos, e da expressão e atividade da proteína Cyp3a11 após tratamento com 2 mg/kg de LPS.

Em artigo recém-publicado, Moriya e colaboradores (2014) compararam os efeitos do tratamento com o LPS com os efeitos provocados pelo processo inflamatório induzido pela anafilaxia (provocada pela ovalbumina) sobre a expressão de Cyp. Os resultados mostraram que os níveis constitucionais do RNAm de Cyp1a2, 2c29 e 3a11 não foram alterados pelo processo inflamatório desencadeado pela anafilaxia, embora a expressão de TNF- α e IL-1 β estivessem tão elevados quanto nos animais que receberam o LPS. Nestes animais, a expressão das Cyp1a2, 2c29 e 3a11 estava reduzida, bem como os níveis das proteínas Cyp1a2 e 3a.

1.3 – Mediadores da Resposta Inflamatória

Sir Henry Dale (1993) foi o primeiro a definir “mediador” como um composto que deve obedecer um conjunto de critérios. Posteriormente, uma versão modificada desse conceito foi descrita por Dale e Foreman (1994). Os critérios utilizados por eles foram:

ao ser aplicada, a substância deve produzir o efeito em questão e receptores devem estar presentes; a via de síntese tem que estar presente e o composto deve ser originado localmente; um mecanismo para finalizar os efeitos deve estar presente e caso haja interferência em sua síntese, liberação ou término da ação, a reação deverá ser modificada de acordo com a alteração (RANG: DALE, 2011). Os mediadores inflamatórios estudados nesse trabalho serão as citocinas e o óxido nítrico.

As citocinas são mediadores liberados durante a inflamação por células do sistema imune. Essas moléculas são essenciais para a coordenação geral da resposta inflamatória. A síntese dessas moléculas é suprarregulada durante quadros inflamatórios. Normalmente, realizam suas funções em concentrações baixíssimas. Em uma célula alvo, as citocinas são capazes de ativar receptores específicos que também são suprarregulados na inflamação. Além de agirem diretamente nas células, formam outros mediadores inflamatórios, amplificando a inflamação (RANG: DALE, 2011).

O NO possui propriedades anti e pró-inflamatórias. Como molécula pró-inflamatória, aumenta a permeabilidade vascular, a produção de prostaglandinas e atua de forma eficiente como vasodilatador. Como mediador anti-inflamatório, o NO endotelial inibe a adesão e a agregação plaquetária, bem como a adesão de neutrófilos. O NO também exerce ações citotóxicas matando bactérias, fungos, vírus e protozoários, aumentando o mecanismo de defesa local. Porém, sua superprodução pode ocasionar danos ao hospedeiro (RANG: DALE, 2011).

1.3.1 - Citocinas

“As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias.” Em geral, essas proteínas não ocorrem como moléculas pré-formadas, visto que a síntese dessas moléculas tem início por novas transcrições genicas, que resultam da ativação celular. Após a síntese, as citocinas são secretadas imediatamente, e se necessário, liberadas em grande quantidade (ABBAS: LICHTMAN, 2008).

Vale destacar as características das ações das citocinas. Elas são pleiotrópicas (agem em diferentes tipos celulares) e redundantes (múltiplas citocinas possuem os mesmos efeitos funcionais), podendo ter ação local ou sistêmica. Na maioria das vezes,

a ação das citocinas acontece em local próximo de onde foram produzidas; se na mesma célula que as secreta, a ação é dita autócrina; se na célula vizinha, a ação é parácrina e se entrarem na circulação para atuar em local distante de onde foram produzidas, após produção em grande escala, a ação é dita endócrina (ABBAS: LICHTMAN, 2008).

A classificação das citocinas em mediadoras e reguladoras da imunidade inata ou adaptativa, e estimuladoras da hematopoiese se dá de acordo com as suas funções e ações biológicas. Durante uma resposta imune inata, as citocinas são produzidas, sobretudo, por fagócitos mononucleares em resposta aos produtos bacterianos e virais, como o LPS e RNA de dupla fita, respectivamente. Durante uma resposta imune adaptativa, os linfócitos T são as células imunes mais atuantes, por reconhecerem especificamente os antígenos estranhos ao organismo (ABBAS: LICHTMAN, 2003).

Exemplos de citocinas são as interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas, interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal. As citocinas influem na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imunológica, assim como também regulam a produção e atividade de outras citocinas. De acordo com o microambiente em que se encontram, as citocinas podem aumentar a resposta inflamatória (citocinas pró-inflamatórias, resposta Th1) ou atenuá-la (citocinas anti-inflamatórias, resposta do tipo Th2). Entre as consideradas pró-inflamatórias estão as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e o TNF (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β (fator transformador de crescimento β) (SOMMER & WHITE, 2010; CURFS *et al.*, 1997). Tanto nos estudos em seres humanos quanto em roedores, o equilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias é importante para o desfecho de uma infecção (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.3.1.1 - TNF- α

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é produzido por várias células, como monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, neutrófilos, mastócitos, células tumorais e fibroblastos. O TNF é um regulador crítico para outras citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL- β , IL-6 e IL-8. Na defesa normal do hospedeiro, baixos níveis de TNF- α no soro concedem proteção contra agentes infecciosos, tumores e danos teciduais, atuando também no desenvolvimento da resposta humoral em camundongos

(PASPARAKIS *et al.*, 1996). Contudo, uma superprodução do TNF- α pode levar a autoimunidade, malignidade e a doenças inflamatórias e imunopatológicas (BARBARA *et al.*, 1996; TRACEY: CERAMI, 1994).

Por exemplo, uma superprodução do TNF- α durante uma infecção por bactérias gram-negativas induz a um dano tecidual generalizado e, em muitos casos, pode levar à morte por choque circulatório. A importância do TNF- α como responsável pela proteção e pela doença é relatada em um modelo de choque induzido por LPS em ratos, onde a deleção do gene do receptor do TNF- α (55kDa) é totalmente protetora contra a elevação da produção do TNF- α induzida pelo LPS (PFEFFER *et al.*, 1993; ROTHE *et al.*, 1993).

1.3.1.1.1 - TNF- α na malária

A liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos mediante a ruptura de eritrócitos durante a esquizogonia, bem como a complexa interação com as citocinas anti-inflamatórias, é o fator provável desencadeador da fisiopatologia da infecção. Uma resposta pró-inflamatória branda pode limitar a taxa de parasitemia do hospedeiro, mas a resposta exacerbada poderá conduzir a evolução da doença para o êxito letal. Estudos da infecção malárica humana pelo *P. falciparum* associaram os altos níveis plasmáticos de TNF- α às complicações secundárias à infecção, como malária cerebral (MC), anemia grave, hipoglicemia, lesão hepática e comprometimentos renal e pulmonar (ODEH, 2001; DE-SOUZA: RILEY, 2002; FERREIRA DA CRUZ *et al.*, 2005). Por outro lado, a evidência de que a administração de TNF recombinante a camundongos maláricos inibiu a multiplicação dos parasitos no fígado e no sangue, conferindo um papel de proteção no início da infecção, exemplifica a complexidade da questão (SCHOFIELD *et al.*, 1987; TAVERNE *et al.*, 1987; CLARK *et al.*, 1987).

Estudos realizados em modelos murinos de malária letal causada pelo *P. berghei* demonstraram que a linhagem CBA/Ca, susceptível à MC, tinha o TNF circulante no soro em sua forma biologicamente ativa. Porém, na linhagem BALB/c, resistente à malária cerebral, a citocina estava ausente (DE-SOUZA: RILEY, 2002).

Em estudo realizado por Grau *et al.* (1987), apenas os camundongos infectados com o *P. berghei* que possuíam níveis séricos elevados do TNF- α desenvolviam a MC.

A utilização de anticorpos monoclonais (AcM) anti- TNF- α ou anti- IFN- γ impediu o desenvolvimento das lesões cerebrais. Além disso, também foi demonstrado que a anemia (MILLER *et al.*, 1989), a diseritropoiese (CLARK *et al.*, 1990) e o aborto associado à malária (CLARK: CHAUDHRI, 1988) podem ser induzidos e/ou mediados pelo TNF- α .

O TNF- α foi capaz de inibir o crescimento do *P. falciparum in vitro* quando adicionado a co-culturas de células mononucleares humanas e eritrócitos infectados, e de aumentar a fagocitose quando anticorpos anti-*P. falciparum* eram adicionados a estas culturas (MUNIZ-JUNQUEIRA *et al.*, 2001).

O anti-inflamatório pentoxifilina (PTX) suscitou um novo interesse para o tratamento da malária, pois em estudos *in vivo* e *in vitro*, foi demonstrada a sua capacidade de prevenir ou atenuar a liberação do TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias (HAN *et al.*, 1990; KAMBAYASHI *et al.*, 1995; LAUTERBACH *et al.*, 1995). A PTX aumenta os níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) em macrófagos, um efeito inibidor da produção de TNF- α por estas células (SZTRYMF *et al.*, 2004). Além disso, o fármaco diminui os níveis de RNAm, afetando a transcrição da citocina (LIN *et al.*, 2004).

1.3.2 – Óxido Nítrico

O NO é uma importante molécula de sinalização inter e intracelular que está envolvida na regulação de mecanismos patológicos e fisiológicos nos sistemas imune, cardiovascular e nervoso. O NO desempenha vários papéis nos organismos vivos, incluindo a regulação do tônus muscular no sistema vascular e agindo como um mediador biológico que funciona similarmente aos neurotransmissores no sistema nervoso. No sistema imune, o NO é uma molécula importante para a defesa do hospedeiro (AKTA, 2004). Por outro lado, a molécula também pode agir como um agente citotóxico nos processos patológicos (ALDERTON *et al.*, 2001).

Em concentrações fisiológicas, o NO inibe a agregação plaquetária, a adesão mediada pela integrina e a expressão genética induzida pela pró-inflamação, que são todos os fatores que controlam a inflamação vascular e o dano oxidativo. Por outro lado, em altas concentrações, NO e dióxido de nitrogênio (NO₂) podem exercer propriedades

patogênicas, como a produção de um metabólito muito tóxico, peroxinitrito (ONOO^-), que causa uma reversão dos efeitos positivos do NO (GRISHAM *et al.*, 1999).

NO é originado pela conversão da L-arginina em L-citrulina na presença da família das óxido nítrico sintases (NOSs). Três isoformas de NOS foram encontradas em vários tipos celulares. A óxido nítrico sintase induzível (iNOS ou NOS2) tem o potencial de sintetizar altas concentrações de NO durante processos inflamatórios em diversos tipos celulares, como: células endoteliais, hepatócitos, monócitos, mastócitos, macrófagos e células musculares que foram estimuladas por citocinas ou produtos bacterianos (XIE *et al.*, 1992).

O NO é produzido por macrófagos ativados por estímulos, como o LPS, que pode ser quantificado na forma de nitrito e nitrato, uma vez que a molécula é efêmera e rapidamente oxidada. A molécula pode agir como sinalizador celular, mas também como toxina em muitos processos patológicos, o que irá depender da sua concentração nos tecidos (STUEHR e MARLETTA, 1985).

1.3.2.1 – NO na malária

O papel do NO na malária é ambíguo, podendo atuar tanto na resolução da doença, como na sua patogênese. O NO que é produzido pelos macrófagos em resposta à liberação de $\text{INF-}\gamma$ pelos linfócitos estimulados pelo plasmódio tem ação proteora na infecção aguda. Porém, a sua captura pela hemoglobina (presente na circulação sanguínea como consequência da esquizogonia) permite que o parasito circule livremente no sangue, como merozoíta. Dentro da hemácia, o vacúolo parasitóforo protege o parasito contra a ação de moléculas externas, visto que a hemoglobina que o circunda funciona como uma “blindagem” de proteção (LIU *et al.*, 1998; TAYLOR-ROBINSON; SMITH, 1999; NAHREVANIAN; DASCOMBE, 2001; SOBOLEWSKI *et al.*, 2005).

A baixa biodisponibilidade de NO exerce um papel na patogênese da malária humana, assim como na malária cerebral experimental (MCE) causada por *P. berghei* ANKA. A MCE é parcialmente impossibilitada pela administração do doador de NO dipropilenotriamina NONOato (DPTA-NO) em uma concentração de 1 mg/animal, inclusive induz efeitos secundários importantes, assim como uma diminuição acentuada

da pressão arterial. Dessa forma, a investigação de estratégias alternativas para melhorar a biodisponibilidade com menores efeitos colaterais também seriam eficazes na prevenção da MCE (CABRALES *et al.*, 2011; GRAMAGLIA *et al.*, 2006).

Martins *et al.* (2012) infectaram camundongos C57BL/6, que foram tratados duas vezes ao dia com injeções de bolus de L-arginina, Nco-hidroxi-nor-arginina (nor-NOHA), tetrahidrobiopterina (BH4), isoladamente ou em conjunto, o nitrito de sódio, o sildenafil ou sildenafil, mais DPTA-NO, começando no dia 0 de infecção.

A suplementação com L-arginina e BH4, com ou sem a inibição da arginase por nor-NOHA, aumentou os níveis do nitrito plasmático, mas não foi eficaz na proteção contra o desenvolvimento da MCE. Do mesmo modo, o tratamento com um fornecimento contínuo de L-arginina por meio de bombas osmóticas também não melhorou a sobrevivência. Resultados semelhantes foram observados com sildenafil nitrito de sódio (que visa inibir a fosfodiesterase-5) ou com DPTA-NO. No entanto, a administração do sildenafil (0,1 mg/animal) em conjunto com uma dose baixa de DPTA-NO (0,1 mg/animal) diminuiu a incidência da MCE. A profilaxia combinada não aumentou a anemia, atrasou os efeitos das pressões sistólica, diastólica e da pressão sanguínea arterial média e induziu baixos efeitos na pressão de pulsação se comparada ao DPTA-NO (1 mg/rato) (MARTINS *et al.*, 2012).

Os dados obtidos mostraram que o sildenafil diminui a quantidade de doadores de NO necessários para a prevenção da ECM, aminizano, também, os efeitos colaterais. A administração de L-arginina, em bólus ou contínua e a suplementação em bólus de BH4, com ou sem a inibição da arginase, foram eficientes para aumentar a biodisponibilidade de NO em camundongos infectados pelo *P. berghei* ANKA, mas falhou na redução da incidência de MCE nas doses e protocolo utilizados (MARTINS *et al.*, 2012).

1.4 – Tratamento da malária

A malária é uma doença que pode ser evitada e curada. O principal propósito do tratamento é eliminar rapidamente o parasito do sangue do hospedeiro, impedindo a evolução da doença de uma forma não complicada para a forma grave da doença ou a morte. Do ponto de vista da Saúde Pública, o tratamento serve para impedir que a

transmissão da infecção ocorra para outras pessoas e para evitar que a resistência aos medicamentos se propague (WHO, 2014).

Para o tratamento da malária falciparum, a OMS recomenda combinações terapêuticas com a artemisinina. O tratamento combinado deve envolver dois princípios ativos com mecanismo de ação diferentes, o que torna a artemisinina o medicamento de escolha. A malária pelo *P. vivax* deve ser tratada com a cloroquina associada à primaquina nos locais onde não há resistência à cloroquina, como na maior parte do Brasil. Nas áreas onde houver resistência, a combinação artemisinina e um medicamento de meia vida longa deve ser o tratamento de eleição. Para o tratamento da malária grave, como a MC, é recomendado o artesunato injetável (Agência Fiocruz de Notícias).

A PTX como uma terapia adjunta para a malária complicada foi inicialmente proposta nos anos 90. A PTX já é utilizada no tratamento de doenças vasculares, isquemia aguda cerebral, doenças infecciosas, choque septicêmico, na síndrome da angústia respiratória e na endotoxemia (LENOBLE, 1989; ADHIKARI, 2004; JI, 2004).

O objetivo de tratar a malária com a PTX foi justificado por alguns autores: para desfazer as rosetas eritrocitárias (LEHMAN *et al.*, 1997), prevenir o dano neuronal (STOLTENBURG-DIDINGER *et al.*, 1993), e pela capacidade de reduzir os níveis de TNF e outras citocinas pró-inflamatórias, demonstrada em estudos *in vivo* e *in vitro* (HAN *et al.*, 1990; KREMSNER *et al.*, 1991; PRADA *et al.*, 1993; DI PERRI *et al.*, 1995; KAMBAYASHI *et al.*, 1995; LAUTERBACH *et al.*, 1995; WENISCH *et al.*, 1998).

A redução dos níveis de TNF pela PTX se dá em função do aumento dos níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) em macrófagos (SZTRYMF *et al.*, 2004). Além disso, o fármaco diminui os níveis do RNAm de TNF, afetando a transcrição da citocina (LIN *et al.*, 2004). Além do efeito inibitório sobre TNF, a PTX inibe a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8 (NEUNER *et al.*, 1994), IFN- γ e IL-2 (RIENECK *et al.*, 1993). A PTX também exerce um grande efeito inibidor de NO em camundongos (VADIEI *et al.*, 1996).

Em função do efeito inibidor da PTX sobre o TNF, foi proposto que o anti-inflamatório poderia melhorar o curso da malária grave (malária cerebral) pela inibição

da expressão das moléculas de adesão, pela regulação das citocinas pro-inflamatórias, reduzindo, assim, a fixação dos glóbulos vermelhos infectados na parede do vaso (LOOAREESUWAN *et al.*, 1998).

A pesquisa na base de dados Pubmed mostrou alguns ensaios clínicos que investigaram a eficácia da droga na malária grave em seres humanos. Os resultados demonstraram resultados conflitantes. Um trabalho foi realizado na Índia e relatou uma redução significativa da duração do coma e da mortalidade (DAS *et al.*, 2003). Um estudo com crianças com malária cerebral em Burundi também relatou uma redução significativa do coma, mas o tamanho das amostras era pequeno e uma dose ótima não pôde ser estabelecida (DI PERRI *et al.*, 1995). Os estudos conduzidos na Tailândia (LOOAREESUWAN *et al.*, 1998) e Alemanha (HEMMER *et al.*, 1997) não demonstraram efeitos benéficos. O trabalho mais recente é o de LELL *et al.* (2010). Os autores descrevem que crianças infectadas receberam quinina e uma infusão contínua de PTX (10 mg/kg) por 72 h. Os resultados não foram animadores, visto que foi observada uma alta taxa de mortalidade entre os pacientes que receberam o tratamento combinado.

Outros anti-inflamatórios foram utilizados no tratamento da malária. A dexametasona (inibidora de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico sintase) foi associada a anti-maláricos, numa tentativa de reverter o processo inflamatório da MC. Em um estudo duplo-cego com cem pacientes comatosos, o resultado não foi promissor, uma vez que as taxas de mortalidade não foram reduzidas, o quadro comatoso não foi alterado e complicações graves surgiram (WARELL *et al.*, 1982; MUNIZ-JUNQUEIRA, 2007).

O iloprost para o tratamento da MC teve êxito em camundongos. A análise por *northern blotting* do TNF, induzido pelo antígeno malárico, mostrou que a citocina foi reduzida pelo medicamento ao nível transcricional (SLIWA *et al.*, 1991).

Em modelo *in vitro* de MC (com células endoteliais derivadas de cérebro humano), a demonstração do efeito anti-inflamatório da purina LMP-420 trouxe novas esperanças para o tratamento da MC. LMP-420 administrada prévia ou concomitantemente com o TNF às células, inibe a sua ativação e, consequentemente, a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (WASSMER *et al.*, 2005).

Como há semelhanças entre a patogenia da malária e da sepse, apresentamos alguns estudos que utilizaram a PTX para o tratamento do choque séptico.

1.5 – Tratamento da Sepse

Em prematuros, foi demonstrado que a infusão contínua da PTX (5mg/kg/h por 6 horas) durante 3 dias consecutivos diminuiu a taxa de mortalidade. Dessa forma, os autores sugeriram que a PTX pode ser uma droga eficaz no tratamento da sepse em prematuros, porém, um estudo duplo-cego randomizado deve ser realizado como teste (LAUTERBACH *et al.*, 1994).

Um estudo prospectivo comparando o grupo tratado com a PTX ao grupo controle foi conduzido por STAUDINGER *et al.* (1996) com vinte e quatro pacientes que preenchiam os critérios de choque séptico. Doze pacientes receberam PTX (grupo tratado) e doze pacientes pareados por diagnóstico, idade e gênero serviram como grupo controle. A dose de 1 mg/kg por hora durante 24 h de PTX foi administrada ao grupo tratado. Foram realizadas duas análises sanguíneas: a primeira 24 h antes do início do tratamento e a segunda, 24 h depois. As análises revelaram que o TNF estava significativamente reduzido após 24 h no grupo de pacientes com choque séptico e tratado com o fármaco, se comparado ao grupo de pacientes que não recebeu a PTX. Os níveis sanguíneos da citocina IL-6 foram elevados com o tratamento com o anti-inflamatório. Os autores concluíram que apenas a inibição do TNF não impediu que se estabelecesse uma grave reação inflamatória, embora os níveis de TNF tenham sido reduzidos significativamente pelo tratamento com a PTX.

Além da sepse, a superprodução de citocinas estimulada pelo LPS leva a outros quadros clínicos graves, como coagulação intravascular disseminada (DIC) e trombose vascular. Ocorrem complicações no fígado, pulmões, rins, intestinos, coração e músculo liso (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Vale lembrar o mecanismo pelo qual o LPS ativa o sistema imune: quando presente no sangue, a endotoxina liga-se a uma glicoproteína hepática, LBP (*LPS binding protein* - proteína ligante do LPS), compondo o complexo LPS-LBP. Quando se liga a receptores presentes em monócitos/macrófagos (CD14), ativa estas células a secretar citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α), que imediatamente induzem a

secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, entre outras), sendo o melhor indicador sistêmico de ativação da cascata inflamatória (SHAPIRO: GELFAND, 1993 apud BIENVENU *et al.*, 2000).

O LPS também é capaz de induzir a secreção de NO por macrófagos e outras células, como músculo liso, células de Kupffer e hepatócitos, agindo como um poderoso vasodilatador, o que favorece a comunicação entre as diferentes células imunes durante uma RFA (BIENVENU *et al.*, 2000; PRANDOTA, 2005).

1.5 - Anti-maláricos como substratos de CYP

Muitos medicamentos encontrados na prática clínica são substratos, indutores ou inibidores de CYP. Como CYP3A4 metaboliza muitos medicamentos, não causa surpresa evidenciar que também os antimaláricos são substratos dessas isoformas humanas. Os anti-maláricos substratos de CYP3A4 são mefloquina, lumefantrina, cloroquina, artesunato, artemeter, primaquina, quinina e artemisinina. A amodiaquina, a artemisinina, a cloroquina e a dapsona são substratos de CYP2C8. CYP2C19 metaboliza a dapsona, o cicloguanil, o clorcicloguanil, o proguanil, a quinina e a artemisinina (ZHANG *et al.*, 1997; LEFÈVRE: THOMSEN, 1999; FONTAINE *et al.*, 2000; GIAO & DE VRIES, 2001; KIM *et al.*, 2003; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2008; KERB *et al.*, 2009; SOYINKA *et al.*, 2009; JANHA *et al.*, 2009).

Foi descrito que a inibição de enzimas da família CYP1 é capaz de provocar a elevação dos níveis sanguíneos da PTX e de seu metabólito 1, M-1. A inibição específica de CYP1A2 é capaz de provocar a redução do metabolismo da PTX ao metabólito-6, reduzir o metabolismo do M-1 ao metabólito-7. Paralelamente, o metabólito altamente potente M-1R é produzido quando CYP1A2 é inibida.

2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo do trabalho aqui apresentado foi investigar se a atenuação da resposta inflamatória provocada pelo tratamento prolongado com a administração de um anti-inflamatório poderia reverter as alterações das atividades das enzimas microsossmais hepáticas de biotransformação de xenobióticos que são provocadas pela malária letal e na sepse em linhagem de camundongos isogênicos.

2.2 – Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Investigar se o tratamento prolongado (cinco e nove dias) com diferentes doses do anti-inflamatório PTX poderia reverter as alterações das atividades microsossmais hepáticas de Cyp1a, Cyp2b e Cyp2a5 evidenciadas na malária letal provocada pelo *Plasmodium berghei* (ANKA);
- Investigar se as citocinas estariam associadas às alterações hepáticas de Cyp1a, Cyp2b e Cyp2a5 observadas na malária letal com a infecção pelo *P. berghei* (ANKA);
- Investigar se o tratamento prolongado (nove dias) na dose de 7 mg/kg do anti-inflamatório PTX poderia reverter as alterações das atividades microsossmais hepáticas de Cyp1a e Cyp2b evidenciadas na sepse induzida pelo LPS de *E. coli*;
- Investigar se o NO estaria associado às alterações hepáticas de Cyp1a e Cyp2b na sepse induzida pelo LPS de *E. coli*.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem DBA-2 com 8-11 semanas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ.

Durante o período de aclimação (uma a duas semanas) e em todo o experimento, os animais foram alojados em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco. As trocas das camas de maravalha, água e ração foram realizadas três vezes por semana. O ambiente foi mantido estável com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de aproximadamente 70% e ciclo claro/escuro de doze horas (ciclo claro, de 8:00 às 20:00 h).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente e alojados em grupos de cinco a sete animais em cada gaiola, tendo livre acesso à água e alimento (ração para camundongos Nuvital CR1, Nuvilab® Curitiba, PR, Brasil).

Este estudo foi examinado e aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ). O documento se encontra anexado (Anexo 1).

3.2 – Desenho Experimental

Neste estudo, foram utilizados dois modelos animais: um modelo de malária murina letal utilizando o parasito patogênico para roedores *P. berghei* (ANKA) e um modelo de sepse com o LPS de *E. coli*.

3.2.1 - Modelo Experimental de Malária Murina Letal - Infecção com *Plasmodium berghei* (ANKA)

Para avaliar as alterações de CYP decorrentes da modificação da resposta imunológica na malária murina pelo *P. berghei*, foi utilizado o medicamento anti-inflamatório pentoxifilina (PTX). Foram constituídos quatro grupos de animais:

1. Animais tratados com o diluente PBS
2. Animais infectados com o plasmódio
3. Animais tratados com PTX
4. Animais infectados com o plasmódio e tratados com PTX

3.2.1.1 – Parasitos e Infecção

O parasito utilizado foi uma espécie de plasmódio que infecta roedores de laboratórios e provoca a doença letal, *P. berghei* (ANKA). Os plasmódios foram mantidos em nitrogênio líquido (temperatura de – 196 °C) em solução de Alsever.

No momento da infecção dos animais, alíquotas do sangue infectado pelos plasmódios em solução de Alsever foram descongeladas, centrifugadas em minicentrífuga 5418 *Eppendorf* a 400 x *g* por 5 min e suspendidas em salina 0,85%. Este processo foi repetido até o desaparecimento da hemólise. Em seguida, 200 µL desta solução foram administrados em dois camundongos por via i.p., que foram os doadores dos animais do experimento.

Após 24 horas deste procedimento, foi realizada a distensão sanguínea com uma gota de sangue retirada da cauda do doador, para estabelecer a taxa de parasitemia do animal. O número de hemácias/mL de sangue foi determinado com a contagem de hemácias em Câmara de Neubauer. Em seguida, estabeleceu-se o volume de sangue do doador que seria usado para obter 1×10^6 eritrócitos parasitados em 200 uL de sangue. Inoculados os animais, estabelecia-se este como o dia 0 de infecção (DI0).

O grupo de animais utilizado como controle da infecção recebeu uma injeção de PBS i.p. no dia da infecção, DI0.

3.2.1.2 – Tratamentos

No momento do tratamento com PTX (SIGMA P1784), o antiinflamatório foi solubilizado em PBS e administrado como injeção única diária via i.p. durante 5 (Experimento I) ou 9 (Experimento II) dias aos animais infectados com o *P. berghei* ou a animais não infectados. Estes últimos constituíram o grupo utilizado como controle do tratamento com a pentoxifilina dos animais infectados. Os animais receberam uma injeção única diária de pentoxifilina i.p. durante o mesmo período de tempo que foi administrado para o grupo infectado e tratado.

3.2.1.3 – Experimento I

O presente trabalho foi baseado em estudo realizado para avaliar o envolvimento de mediadores inflamatórios (citocinas, NO e prostaglandinas) na mucosite intestinal provocada pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11), em que ratos Swiss machos foram tratados durante sete dias consecutivos com a PTX. O tratamento teve início um dia antes da indução da mucosite e as doses utilizadas foram 1,7, 5 e 15 mg/kg. Os autores observaram que a menor dose de PTX (1,7 mg/kg) era capaz de reduzir os níveis de TNF- α nos animais (MELO *et al.*, 2008).

Nesse sentido, foi planejado um experimento para saber se a redução do TNF também seria vista na malária murina. Como no trabalho de Melo *et al.* (2008) a menor dose (1,7 mg/kg) tinha maior efeito redutor dos níveis do TNF, essa foi a dose utilizada. Os animais do grupo malárico foram infectados com o *P. berghei* (ANKA) no dia 0 (DI0) do experimento (grupo II). Já o grupo III, tratado com a PTX (Sigma P1784) recebeu a dose de 1,7 mg/kg durante cinco dias a contar do dia 8 da infecção (DI8) dos animais maláricos até o dia 13 (DI13). O grupo IV foi infectado com o plasmódio no DI0 e recebeu cinco doses da PTX, com início em DI8 e término em DI12. O grupo I foi composto pelos animais controles, recebendo uma única dose da, solução salina com tampão fosfato de potássio (PBS) (Tabela 1).

O tratamento com a PTX foi iniciado no DI8 porque em experimentos realizados anteriormente no Laboratório de Toxicologia Ambiental, foi observado que a inibição da atividade de BROD (Cyp2b) começava a partir desse dia. O dia do sacrifício

foi escolhido baseado na morte do primeiro animal do experimento, que foi no DI13, momento em que todos os outros animais foram sacrificados.

O volume das soluções administrado para tratamento com a PTX foi de 8 mL/kg de peso, correspondente a uma injeção de 200 µL para um camundongo de 25 g.

O Quadro 5 resume o que foi realizado durante todo o experimento:

Quadro 5 - Experimento I de Malária Murina Letal: grupos e números de animais, infecção, tratamento, doses e vias utilizadas				
Grupo	(N)	Infecção	Tratamento	Dose, via
Controle (I)	10	–	PBS	8 mL/kg via i.p.
Infectado (II)	9	10 ⁶ HP <i>P. berghei</i>	–	200 µL por animal via i.p.
Tratado (III)	9	–	PTX 1,7 mg/kg/dia	8 mL/kg via s.c.
Infectado e tratado (IV)	10	*10 ⁶ HP <i>P. berghei</i>	**PTX 1,7 mg/kg/dia	*200 µL por animal via i.p. **8 mL/kg via s.c.

N: número de animais; PBS: salina tamponada; i.p.: via intra-peritoneal; DI: dia de infecção; HP: hemácias parasitadas; PTX: pentoxifilina; s.c.: via subcutânea.

3.2.1.4 – Experimento II

Esta parte do trabalho foi realizada com base nos dados obtidos no primeiro experimento. Com o objetivo de inibir o processo inflamatório no nosso modelo de malária, e com isso provocar a inibição de NO e TNF, para o tratamento prolongado de nove dias no nosso estudo, foi selecionada uma dose intermediária de PTX, 7 mg/kg/dia.

Da mesma forma que no experimento I, o estudo compreendeu quatro grupos de animais: infectados, tratados com PTX, tratados com PBS e infectados e tratados com PTX.

Da mesma forma que no Experimento I, a administração do anti-inflamatório teve início em DI8, mas foi prolongado até DI16, porque experimentos realizados anteriormente no LTA demonstraram que a partir deste dia, havia depressão da atividade de outra isosforma CYP nos camundongos DBA-2 infectados com o *P. berghei*, Cyp2a5.

O volume das soluções administrado para tratamento com a PTX foi de 8 mL/kg de peso, correspondente a uma injeção de 200 µL para um camundongo de 25 g.

O desenho experimental do modelo de Malária Murina Letal usado no Experimento II está representado esquematicamente no Quadro 6:

Quadro 6 - Experimento II de Malária Murina Letal: grupos e números de animais, infecção, tratamento, doses e vias utilizadas				
Grupo	(N)	Infecção	Tratamento	Dose, via
Controle	10	—	PBS	8 mL/kg via i.p.
Infectado	10	10 ⁶ HP <i>P. berghei</i>	—	200 µL por animal via i.p.
Tratado	9	—	PTX 7 mg/kg/dia	8 mL/kg via s.c.
Infectado e tratado	10	*10 ⁶ HP <i>P. berghei</i>	**PTX 7 mg/kg/dia	*200 µL por animal via i.p. **8 mL/kg via s.c.

N: número de animais; PBS: salina tamponada; i.p.: via intra-peritoneal; DI: dia de infecção; HP: hemácias parasitadas; PTX: pentoxifilina; s.c.: via subcutânea.

3.2.2 – Modelo Experimental de Sepsé – Tratamento com LPS de *E. coli*

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) é um elemento da parede celular bacteriana, apenas presente nas bactérias gram-negativas, que tem a capacidade de promover as respostas imunológicas inata e adquirida em seres humanos. O LPS é um ativador eficaz de macrófagos e ativador da produção de IL-1 e TNF (o principal mediador da lesão induzida por LPS) pelos leucócitos (ABBAS *et al*, 2008).

Para fins comparativos, foi utilizado um modelo de sepsé provocado pelo LPS de *E. coli* sorotipo 0127:B8 (Sigma L3129, Lote 020M4012, que compreendeu quatro grupos de animais:

1. Animais tratados com o diluente PBS
2. Animais tratados com PTX
3. Animais tratados com LPS
4. Animais tratados com PTX e desafiados com LPS

3.2.2.1 - Tratamento

Em estudo anterior realizado no LTA usando o modelo de sepsé induzido pela administração do LPS de *E. coli*, foi possível detectar a elevação dos níveis de NO nos soros dos animais. Nesse estudo, camundongos fêmeas da linhagem DBA-2 receberam injeções com diversas doses da endotoxina, de 0,025 a 20 mg/kg de peso corpóreo/dia. Após 24 h da administração, os níveis de NO estavam aumentados nas maiores doses (de 5 mg/kg até 20 mg/kg). Desse modo, selecionamos a dose de 10 mg/kg de LPS para a realização do estudo aqui apresentado (POÇA, 2013).

Os animais tratados com o medicamento receberam uma dose de 7 mg/kg diariamente por via s.c. durante nove dias.

Para o tratamento com o LPS, os animais receberam uma injeção de 10 mg/kg via i.p. A solução de LPS em salina 0,9% era mantida congelada a -20 °C. No momento

do tratamento, a solução era levada ao banho ultra-som por 30 min. Em seguida, a solução era diluída em salina 0,9% para obter a solução de uso e novamente era levada a mais 30 min no banho ultra-som.

Os animais que foram tratados com PTX e desafiados com o LPS, receberam as injeções diárias de 7 mg/kg de PTX via s.c. e no oitavo dia do tratamento com PTX, receberam uma injeção única de LPS 10 mg/kg via i.p. A solução de LPS foi preparada como descrita acima.

Os animais controles do experimento receberam uma injeção única de PBS no 8º dia do tratamento dos grupos tratados com PTX.

O desenho experimental do estudo usando a sepse como modelo de processo inflamatório está representado esquematicamente no Quadro 7.

Quadro 7 – Modelo Experimental de Sepse: grupos e números de animais, tratamentos, doses e vias utilizadas			
Grupo	(N)	Tratamento	Dose, via
Controle	11	PBS	8 mL/kg via i.p.
Tratado com PTX	11	PTX 7 mg/kg/dia	8 mL/kg via s.c.
Tratado com LPS	11	LPS 10 mg/kg	8 mL/kg via i.p.
Tratado com PTX e LPS	11	*PTX 7 mg/kg/dia	*8 mL/kg via s.c.
		**LPS 10 mg/kg	**8 mL/kg via i.p. s.c.

N: número de animais; PBS: salina tamponada; via i.p.: via intra-peritoneal; PTX: pentoxifilina; via s.c.: via subcutânea; LPS: lipopolissacarídeo de *E. coli*.

3.3- Acompanhamento das Taxas de Parasitemia

A evolução da infecção malárica foi acompanhada com o estabelecimento das taxas de parasitemia através da análise microscópica da distensão sanguínea dos animais infectados nos dias pós-infecção e observação da evolução clínica da doença. As

distensões sanguíneas foram preparadas com uma gota de sangue retirada da ponta da cauda do animal infectado. A coloração das lâminas foi feita pelo método Romanowski com o *kit* de corantes Panóptico Rápido (Laborclin[®], Pinhais, PR, Brasil). A microscopia foi realizada utilizando microscópio óptico sob imersão na objetiva de 100 x. Ao menos mil células foram contadas em diferentes campos para estabelecer a taxa de parasitemia de cada animal.

A porcentagem de hemácias parasitadas foi calculada dividindo o número de hemácias parasitadas pelo número total de hemácias e multiplicando por cem, com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ HP} = \text{Número de hemácias parasitadas} / \text{Número total de hemácias} \times 100$$

3.4 – Eutanásia

A eutanásia dos animais ocorreu 24 h após o último tratamento no caso dos animais tratados com PTX ou LPS. Nos experimentos de malária, a eutanásia ocorreu nos dias especificados para cada um dos dois experimentos, 13º dia para o Experimento I de malária e 17º dia para o Experimento II.

Nos experimentos de malária e sepse, anteriormente à eutanásia, o sangue foi coletado do plexo orbitário. Em seguida, os animais foram mortos por deslocamento cervical. O soro foi separado por centrifugação a 5.000 rpm durante vinte minutos em minicentrífuga 5418 Eppendorf. As amostras de soro foram acondicionadas em tubos próprios para criogenia e armazenadas a – 196 °C (nitrogênio líquido) até o momento das análises. Os fígados foram rapidamente removidos, postos em placas de Petri de vidro mantidas sobre gelo em uma caixa de isopor e pesados. Os órgãos foram, então, embrulhados em papel laminado, identificados e congelados em nitrogênio líquido (- 196 °C) para utilização posterior. Depois de pesados, os baços foram descartados.

3.5– Preparo da fração microssomal

As frações microssomais hepáticas contendo as enzimas ligadas ao retículo endoplasmático liso, incluindo as enzimas CYP, foram obtidas para o estudo das

atividades enzimáticas, basicamente como descrito por De-Oliveira *et al.* (1997), como é relatado resumidamente a seguir.

Para o preparo da fração microsomal, os fígados foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho de gelo. Posteriormente, os órgãos foram pesados, lavados com uma solução de sacarose 250 mM e secos com papel de filtro. Os órgãos foram homogeneizados com solução Tris 100 mM KCl 150 mM pH 7,4 em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem a uma velocidade de 1200 rpm, utilizando o volume correspondente a quatro vezes o peso do fígado do animal. Em seguida, o homogeneizado hepático foi levado à centrifugação a 9.000 x g por 30 min a 4 °C. Após este processo, o sobrenadante contendo todos os componentes citosólicos foi levado à ultracentrifugação a 100.000 x g por 60 min a 4 °C. Em seguida, o sedimento obtido foi homogeneizado a uma velocidade de 250 rpm em Tampão Fosfato de Potássio 100 mM com 20 % de glicerol e EDTA 1 mM pH 7,4. A fração microsomal obtida foi distribuída em tubos próprios para criogenia e levados ao nitrogênio líquido para o congelamento até o momento de uso.

3.6 – Quantificação de proteínas

A concentração total de proteína microsomal foi determinada antes da realização dos ensaios das atividades enzimáticas, de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976). Foi utilizado padrão de proteína (SIGMA P5619), reagente de Bradford (Sigma B6916) e solução fosfato de potássio monobásico 50 mM e NaCl 150 mM pH 7,2 como tampão.

A leitura de absorvância foi feita a 595 nm no espectrofotômetro *Molecular Devices*® *Spectra max plus384*, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0. As leituras foram feitas em microplacas de 96 poços. As medidas foram realizadas em triplicata e a concentração de proteínas foi expressa em mg de proteína/mL de fração microsomal.

3.7– Atividades de CYP

As atividades hepáticas das isoformas Cyp2a5, Cyp2b9/10 e Cyp1a1/2 foram avaliadas usando ensaios espectrofluorimétricos já padronizados no LTA.

3.7.1 – Atividade da Cyp2a5

3.7.1.1 - Ensaio da Cumarina 7-Hidroxilase na Cubeta

O ensaio da cumarina-7-hidroxilase (COH), específico para CYP2A5 murina, foi utilizado neste estudo (VAN IERSEL *et al*, 1994). Tubos de ensaio de vidro contendo Tampão Tris 50 mM pH 7,4, cumarina 10 μ M (substrato da reação, SIGMA C4261) e 0,4 mg de proteínas da fração microsomal foram levados a um banho-maria com agitação mantido a 37°C. Para iniciar a reação, uma solução regeneradora de NADPH para fornecer β -NADP (SIGMA N0505) 0,5 mM, D-glicose-6-fosfato (SIGMA, G7250) 10 mM, 0,5 U/mL de glicose 6-fosfato desidrogenase (SIGMA G6378) e cloreto de magnésio (MERCK 1.05833.1000) 10 mM foi adicionada a todos os tubos a intervalos regulares. Após 10 min, a reação foi interrompida com a adição de HCl 2N. O produto da reação (umbeliferona ou 7-hidroxycumarina) foi extraído com clorofórmio, estabilizado em solução de glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4 e, em cubeta de quartzo, levado à quantificação em espectrofluorímetro (Shimadzu RF5301 PC[®]) com parâmetros estabelecidos em 355 e 460 nm para os comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, e 3 nm para a abertura de fenda. Uma curva padrão com umbeliferona (SIGMA U-7626) era construída para calcular a concentração do produto da reação. A atividade da COH foi expressa como picomoles de umbeliferona / mg de proteína / min.

3.7.1.2 – Ensaio da Cumarina 7-Hidroxilase na Microplaca

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços. A concentração do substrato, cumarina, no poço da microplaca onde ocorre a reação foi de 10 μ M e a quantidade de proteínas da fração microsomal, 0,040 mg. O tampão utilizado foi Tris 50 mM pH 7,4.

Após um período de pré-incubação de 3 minutos em banho com agitação (Heto[®]) a 37°C, a reação teve início com a adição do sistema regenerador de NADPH, como descrito acima. Decorridos 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (MERCK 1.00807.0250) 10%. A fluorescência produzida pela umbeliferona foi mensurada em espectrofluorímetro para microplaca modelo Spectramax GeminiXS (Molecular Devices[®]), usando software Softmax Pro versão 4.0,

com os parâmetros de excitação e emissão fixados em 355 e 460 nm respectivamente, e precisão normal.

Uma curva padrão com solução de umbeliferona 1 μ M em solução tampão glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4 foi usada para o cálculo da atividade de COH. A reação para cada amostra foi realizada em triplicata e a atividade enzimática expressa como picomoles de umbeliferona / minuto / miligrama de proteína

3.7.2 – Atividades da Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10

3.7.2.1 - Ensaios da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase e etoxiresorufina-*O*-desetilase

As atividades de benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) e etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) resorufina-*O*-desalquilases foram determinadas em microplacas de 96 poços, como descrito por Kennedy e Jones (1994), com algumas modificações. A concentração dos substratos (benziloxiresorufina para a reação de BROD – SIGMA B1532 - e etoxiresorufina para EROD – SIGMA E3763) no poço da microplaca onde ocorre a reação foi de 5 μ M e a quantidade de proteínas da fração microsomal, 0,025 mg. O tampão utilizado foi tampão fosfato dibásico (K_2HPO_4) 50 mM pH 7,8. A reação foi iniciada com a adição do sistema regenerador de NADPH (glicose-6-fosfato 5 mM; β -NADP 0,25 mM; $MgCl_2$ 2,5 mM; glicose-6-fosfato-desidrogenase 0,5 U/mL), e após transcorridos 10 min, a reação foi interrompida com a adição de acetonitrila (TEDIA AS1122-001). O produto da reação é a resorufina que foi quantificada em espectrofluorímetro para microplacas da Molecular Devices modelo Spectramax Gemini XS e *software* Softmax Pro versão 4.0 para Macintosh e Windows, com comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 e 590 nm, respectivamente. Uma curva padrão com solução de resorufina (SIGMA R3257) 1 μ M em solução tampão fosfato dibásico (K_2HPO_4) 50 mM pH 7,8. As atividades de BROD e EROD foram expressas como picomoles de resorufina / mg de proteína / min.

3.8 - Quantificação dos Níveis de Óxido Nítrico no Soro

Os níveis totais de óxido nítrico foram quantificados como nitrito e nitrato e determinados no soro dos animais com a reação de Griess (1879). O nitrato presente no soro, com a adição da enzima nitrato redutase, foi reduzido a nitrito como descrito por Schmidt *et al.* (1989). Foram construídas duas curvas padrão, uma para o nitrito com nitrito de sódio (MERCK 1.06544.1000) e outra para o nitrato, com o nitrato de sódio (SIGMA S5506), sendo os resultados expressos como μM de nitrito.

3.8.1 - Curva Padrão de Nitrito

Para a construção da curva de nitrito, foi preparada uma solução de nitrito de sódio 0,2 mM em água milliQ. A partir dessa solução, foram feitas diluições seriadas de 1:2 em água milliQ, de modo a compor um total de onze concentrações que foram de 0,2 mM até 0,1953 μM . As diferentes diluições foram transferidas (50 μL) a micropoços de uma placa de 96 poços e ao branco foi adicionada água milliQ, sempre em triplicata. Em seguida, foi adicionado aos poços da microplaca, o reagente de Griess (50 μL), preparado como uma solução constituída de partes iguais de sulfanilamida (SIGMA S9251) 2% em ácido fosfórico (FLUKA 79606) 5%, dicloridrato de N-1-naftilenodiamino (NEED, SIGMA N9125) 0,2% em água milliQ, ácido fosfórico 5% em água milliQ e água milliQ. A microplaca foi levada à leitura da absorvância em espectrofotômetro para leitura em microplacas (*Molecular Devices*® *Spectra max plus384*®), com comprimento de onda fixado em 540 nm, usando o software Softmax Pro versão 4.0 para Macintosh® e Windows®.

3.8.2 - Curva Padrão de Nitrato

Para a construção da curva de nitrato, foi construída com uma solução de nitrato de sódio 0,4 mM em água milliQ e diluições seriadas de 1:2, de modo a compor um total de onze concentrações que foram de 0,2 mM até 0,1953 μM . As diluições foram transferidas (40 μL) a micropoços de uma placa de 96 poços e ao branco foi adicionado água milliQ, sempre em triplicata. Em seguida, 40 μL de um coquetel constituído de nitrato redutase (SIGMA N7265) 4 U/mL, NADPH (SIGMA N1630) 1 mg/mL, tampão

KH₂PO₄ 0,2 M pH 7,5 e água milliQ foram acrescentados a todos os poços da microplaca, que foi levada à incubação *overnight* (16 horas) a 37°C. No final da incubação, 80 µL do reagente de Griess foi adicionado a todos os poços, e a absorvância registrada em espectrofotômetro para microplacas (*Molecular Devices*® *Spectra max plus384*®), com comprimento de onda fixado em 540 nm, usando o software Softmax Pro versão 4.0 para Macintosh® e Windows®.

3.8.3 - Quantificação de Nitrito nas Amostras de Soro

Nos poços restantes da microplaca que foi utilizada para construir a curva padrão de nitrato foram adicionados, também em triplicata, 40 µL das amostras de soro e 40 µL do coquetel, como descrito acima. Ao final do período de incubação (*overnight*) a 37 °C, o reagente de Griess foi adicionado (80 µL) e a leitura da absorvância ocorreu como descrito acima para as curvas padrão de nitrito e nitrato.

3.9 – Dosagem das citocinas

Inicialmente, a análise dos níveis séricos do TNF foi realizada por citometria de fluxo, com a vantagem de conseguir avaliar outras citocinas, mas obtivemos muitos resultados negativos, o que dificultou a interpretação dos resultados. Dessa forma, no Experimento II, decidimos utilizar outro método para a detecção do TNF, o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3.9.1 – Citometria de Fluxo

A dosagem das citocinas foi realizada com o *kit* comercial da Becton & Dickinson® – BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse Th1/Th2/TH17 Cytokine Kit*, (Referência 560485), para a detecção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF-γ, TNF, IL-17 e IL-10 em soro e sobrenadante de cultura de células de camundongos.

O procedimento seguiu em linhas gerais as instruções do fabricante. A partir deste *kit*, *beads* magnéticas de tamanho conhecido conjugadas com anticorpos conjugados com fluoróforo em diferentes quantidades se ligam às diferentes citocinas e

emitem intensidades de fluorescência diferentes, que são detectadas em citômetro de fluxo no filtro FL3 ou FL4. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.9.2 – ELISA

A detecção da produção de TNF por ELISA foi realizada com o *kit* BD Opteia *Mouse* TNF (Mono/Mono) *ELISA Set* (BD Bioscience), segundo as instruções do fabricante.

Foram utilizadas placas de 96 poços de poliestireno que foram sensibilizadas com 100 µL da solução de anticorpo monoclonal Anti-TNF de camundongos duliúda no tampão de revestimento. As placas foram seladas com parafilm e incubadas *overnight* (16 horas) a 4°C.

Posteriormente, o líquido foi retirado e as placas foram lavadas por três vezes com o tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20). Após a última lavagem, as placas foram invertidas no papel absorvente para a remoção de qualquer tampão residual, bloqueadas com 200 µL do diluente do ensaio (PBS com 10% de soro fetal bovino – SFB) e incubadas à temperatura ambiente por 1 h.

Finalizado o período de incubação, o líquido foi retirado e as placas foram lavadas por três vezes. Removido o tampão residual, foram adicionados 100 µL das amostras por poço, e as soluções que iriam compor a curva padrão de TNF (1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml e 15,6 pg/ml de padrão de TNF), sempre em triplicata. As placas foram seladas e incubadas à temperatura ambiente por 2 h.

O líquido foi retirado e as placas foram lavadas por cinco vezes, sendo removido o tampão residual. Foram adicionados 100 µL de uma solução contendo o anticorpo de detecção mais o reagente estreptavidina-HRP. As placas foram seladas e incubadas a temperatura ambiente por 1 h. O líquido foi retirado e as placas foram lavadas por sete vezes. Igualmente como nas outras etapas, o tampão residual foi removido.

Foram adicionados 100 µL da solução do substrato (tetrametilbenzidina, TMB, mais peróxido de hidrogênio) e as placas foram incubadas à temperatura ambiente sem o parafilm por 30 min. Foram adicionados 50 µL da solução H₃PO₄ (1M). Em seguida, a

leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro *Molecular Devices® Spectra max plus384*, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 a 450 nm.

3.10 – Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4 - RESULTADOS

4.1 – Experimento I

4.1.1 – Estado geral dos animais

A infecção dos camundongos DBA-2 fêmeas com *P. berghei* (ANKA) avançou progressivamente com o aumento da parasitemia e piora dos sinais da doença. Os sinais específicos da malária começaram a aparecer a partir do DI6.

No dia da eutanásia, os camundongos infectados apresentaram perda de peso acentuada com relação ao peso no dia 0 de infecção (DI0), assim como sinais da progressão da infecção, como piloereção, taquipnéia e hipoatividade. Os órgãos removidos para o estudo estavam de acordo com as alterações observadas na malária: baços e fígados aumentados e com coloração escura (depósito do pigmento malárico).

Os animais que receberam a PTX mostraram hiperatividade a partir do terceiro dia. Os animais infectados e tratados também exibiram os sinais característicos da doença (piloereção, taquipnéia e hipoatividade).

4.1.2. – Mortalidade

Os animais controles apresentaram um percentual de sobrevivência de 100%, não havendo mortes. O grupo dos animais infectados teve um percentual de sobrevivência de 90%, uma vez que houve perda de um animal, de um total de 10 animais. A perda ocorreu no DI13, sendo este o dia escolhido para a eutanásia dos demais animais. Não foram registradas perdas de animais no grupo infectado e tratado, sendo, portanto a taxa de sobrevivência de 100%. Já no grupo dos animais tratados com o anti-inflamatório, houve uma perda em DI11, sendo, portanto, a sobrevivência de 90% (N inicial = 10). A sobrevivência dos quatro grupos de animais está representada na Figura 6.

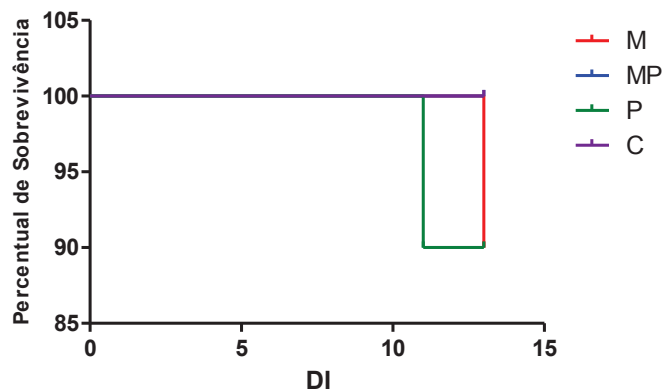


Fig. 6 – Sobrevivência das fêmeas DBA-2 infectadas por via i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=10), tratadas com pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (MP, N=10) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a PTX na mesma dose (MP, N=10).

4.1.3 - Parasitemias

As taxas de parasitemia alcançaram as médias de 17,81% nos camundongos infectados i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) e de 19,93% nos camundongos infectados e tratados com pentoxifilina na dose de 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias. Os resultados mostraram que não houve interação entre a infecção e o tratamento (Figura 7).

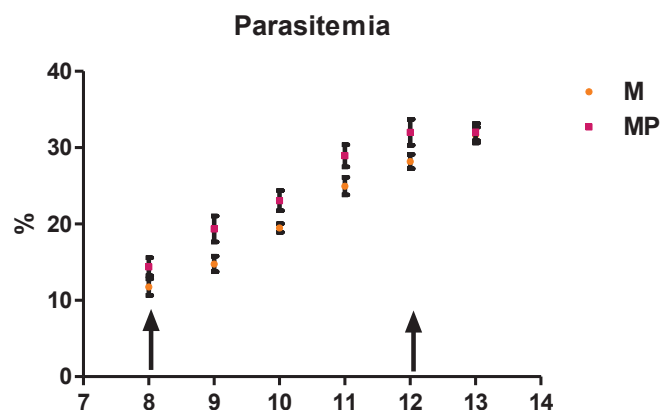


Fig. 7 - Médias das taxas de parasitemia das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* (M, N=9) e infectadas e tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (MP, N=9) do início do tratamento com o anti-inflamatório (DI8) até o dia da eutanásia (DI13). As taxas de parasitemia apenas dos animais infectados estão representadas em marrom e as dos animais infectados e tratados com P estão representadas em roxo. A análise estatística foi ANOVA a dois critérios.

4.1.3.2 – Parasitemia por Animal

As parasitemias de cada animal estudado no experimento nos grupos dos animais infectados e nos infectados e tratados com a PTX encontram-se representadas em gráficos nas figuras 8 e 9.

Os animais nos dois grupos apresentaram uma curva ascendente com o aumento diário da parasitemia.

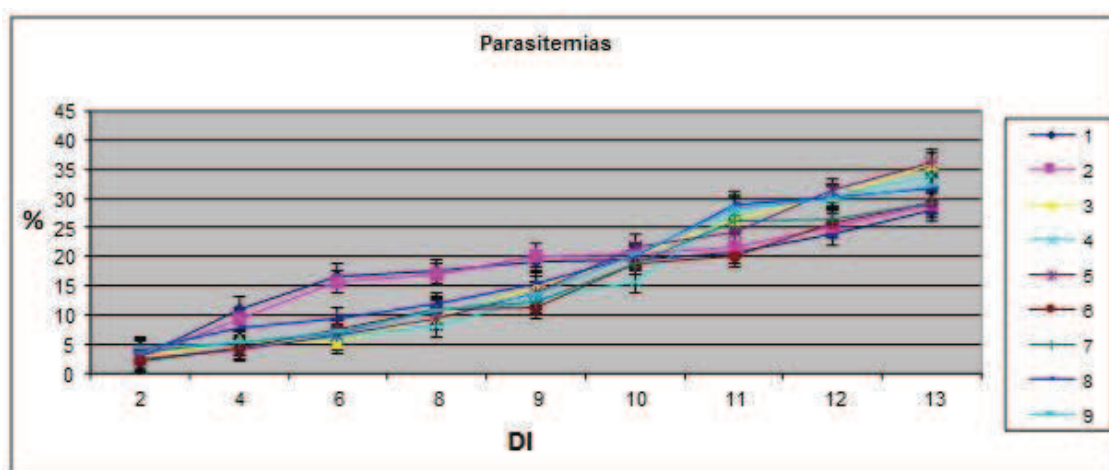


Fig. 8 – Parasitemias das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP do *P. berghei* ANKA (N=9).

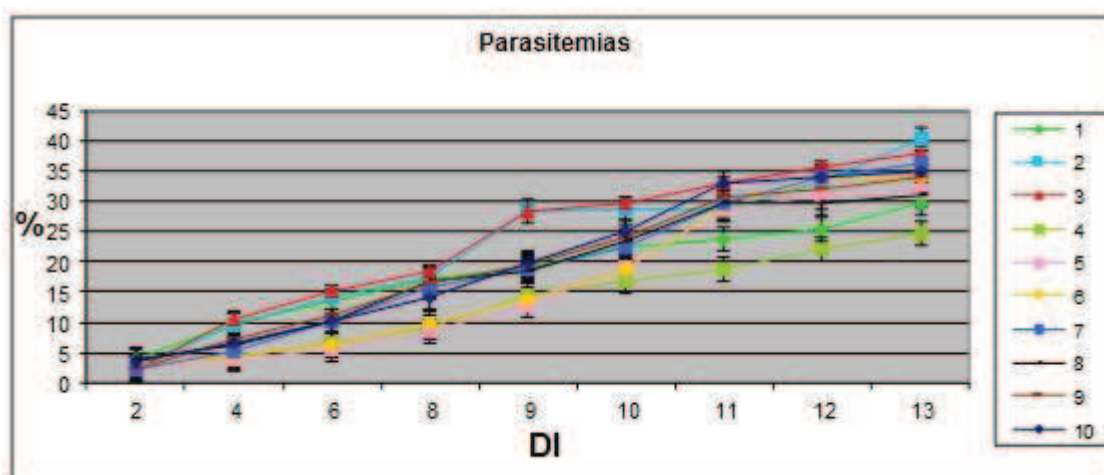


Fig. 9 – Parasitemias das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP do *P. berghei* ANKA e tratadas com a PTX (dose de 1,7 mg/kg) durante cinco dias (N=10).

4.1.4 – Peso dos animais

Avaliamos a evolução do peso corporal dos animais durante a evolução da doença. A Figura 10 representa as diferenças de peso corporal entre o dia do sacrifício (DI13) e o DI0 em cada grupo de animais. O grupo controle (C, N=10) que recebeu apenas o PBS teve um ganho de peso de 0,98 g de peso; o grupo dos infectados com o plasmódio (M, N= 9) apresentou perda de peso de 1,32 g; o grupo tratado com PTX 1,7 mg/dia s.c. durante cinco dias (P, N=9) apresentou um aumento de peso de 0,38 g e o grupo infectado com o plasmódio e tratado com PTX (MP, N= 10) teve perda de peso de 2,14 g. De acordo com os dados obtidos, ambos os grupos apenas infectado e infectado e tratado com PTX perderam peso, sendo que o grupo infectado e tratado com PTX apresentou uma perda de peso mais acentuada (quase duas vezes maior) do que foi visto nos animais apenas infectados.

A análise estatística (ANOVA, seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni) da evolução ponderal dos quatro grupos estudados mostrou que a evolução ponderal dos animais infectados pelo *P. berghei* e os infectados e tratados com PTX diferiram do grupo controle. Do mesmo modo, a evolução de peso do grupo infectado e tratado com PTX diferiu dos animais tratados apenas com a PTX (Fig. 10).

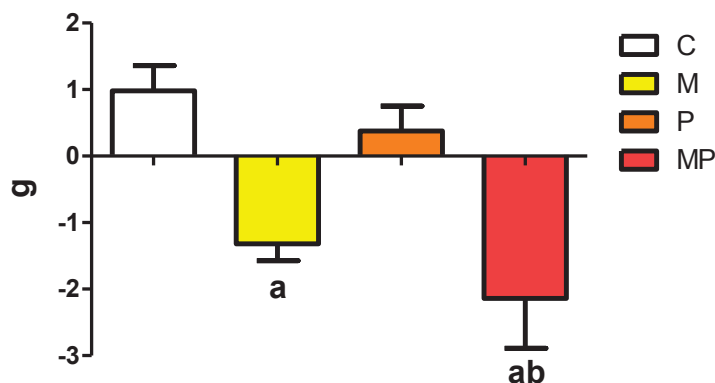


Fig. 10 - Médias do ganho de peso corporal (g) entre o dia da eutanásia (DI13) e o DI0 de infecção das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas por via i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a PTX na mesma dose (MP, N=10). Os resultados estão apresentados como média+EPM. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem dos controles e **b**: médias diferem dos tratados com PTX.

4.1.5 – Peso dos órgãos

4.1.5.1 – Peso Absoluto

O peso médio absoluto dos fígados nos camundongos DBA-2 infectados com 10^6 HP (1,34 g, N=9) no DI13, momento em que os animais foram mortos, foi maior do que nos animais controles (1,00 g, N=10). Nos animais tratados com PTX e nos que receberam a PTX após a infecção pelo *P. berghei*, os pesos dos fígados não diferiram dos animais não infectados e não tratados (Fig. 11).

O aumento do peso médio absoluto dos baços nos camundongos DBA-2 infectados com o plasmódio (0,6 g, N=9) foi 6,5 vezes maior que os valores dos controles (0,086 g, N=10). Peso médio semelhante aos controles foi observado nos animais que receberam apenas a PTX, 0,085 mg (N=9). Os infectados com o *P. berghei* e tratados com o antiinflamatório apresentaram pesos médios absolutos dos baços de 0,28 g (N=10), metade do valor encontrado para os animais maláricos (Fig. 12).

As diferenças dos pesos dos fígados e dos baços entre os grupos dos animais estudados foram analisadas pela ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

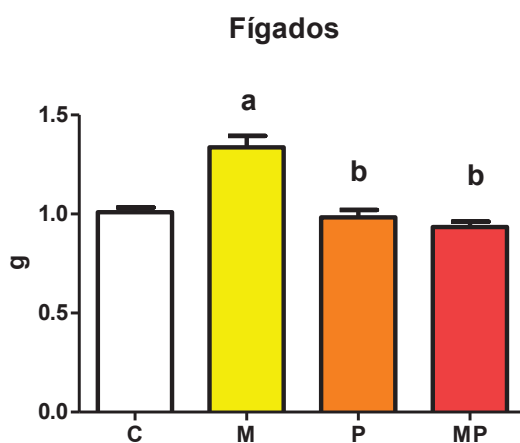


Fig. 11. Pesos médios absolutos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem dos controles e **b**: médias diferem dos infectados.

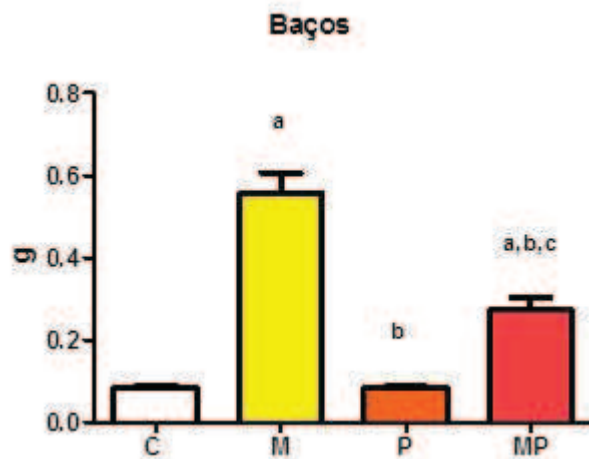


Fig. 12 - Pesos médios absolutos dos baços das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem dos controles; **b**: médias diferem das infectadas e **c**: médias diferem das tratadas com pentoxifilina.

4.1.5.2 – Pesos Relativos

Com relação ao peso relativo dos fígados, os animais infectados ($0,07167 \text{ g} \pm 0,004$) diferiram dos animais controle ($0,0496 \text{ g} \pm 0,001$). Nos animais que foram apenas tratados com a PTX o peso relativo médio foi de $0,0484 \text{ g} \pm 0,002$. O tratamento com a PTX nos animais infectados ocasionou uma diminuição significativa do peso relativo dos fígados com relação aos animais apenas infectados ($0,0561 \text{ g} \pm 0,003$) (Fig. 13).

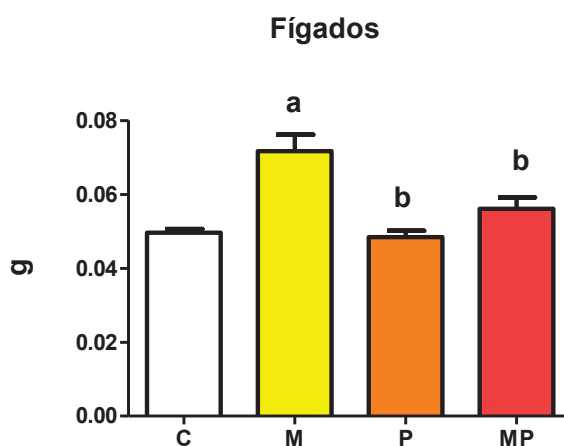


Fig. 13 - Pesos relativos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem dos controles e **b**: médias diferem das infectadas.

O peso relativo dos baços nos animais controle foi de $0,0043 \text{ g} \pm 0,00015$. Os animais infectados apresentaram um aumento significativo do peso relativo dos baços ($0,5589 \text{ g} \pm 0,04721$) com relação aos animais controles. O grupo que recebeu o fármaco teve o peso relativo dos baços de $0,004 \text{ g} \pm 0,0002108$. Já o peso relativo dos animais infectados que receberam o tratamento com a PTX ($0,3070 \text{ g} \pm 0,02409$) apresentou um aumento significativo com relação aos controles não-infectados e uma diminuição, também significativa, com relação aos animais apenas doentes (Fig. 14).

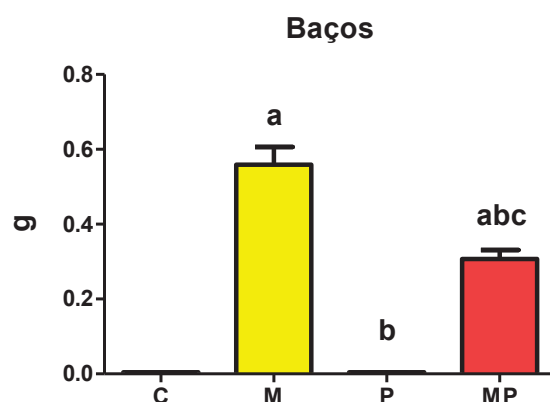


Fig. 14 - Pesos relativos dos baços das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam PBS, infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=9), tratadas com a pentoxifilina 1,7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=9) e maláricas tratadas com a pentoxifilina na mesma dose (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem dos controles; **b**: médias diferem das infectadas e **c**: médias diferem das tratadas com pentoxifilina.

4.1.5– Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas nos fígados dos animais que constituíram os grupos experimentais estão descritas a seguir.

4.1.5.1 Atividades das alcoxi-resorufinas *O*-desalquilases

As atividades das alcoxi-resorufinas-*O*-desalquilases - etoxi-resorufina-*O*-desetilase (EROD), marcadora de Cyp1a1/2 e benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD), marcadora de Cyp2b9/10 – nas frações microsossomais hepáticas das fêmeas DBA-2 estão expressas como picomoles de resorufina/ mg de proteína / min e representadas nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Nesta etapa do presente trabalho, a atividade catalítica de Cyp1a (EROD) nos camundongos infectados ($50,66 \pm 10,10$) foi, aparentemente, menor do que as registradas no grupo dos camundongos não infectados ($81,9 \pm 14,2$). Os animais que receberam apenas a pentoxifilina tiveram atividade de EROD igual $57,35 \pm 13,41$ e os animais infectados e tratados, de $53,09 \pm 4,97$. A análise estatística não detectou diferenças entre os grupos (ANOVA: $P > 0,05$) (Fig. 15).

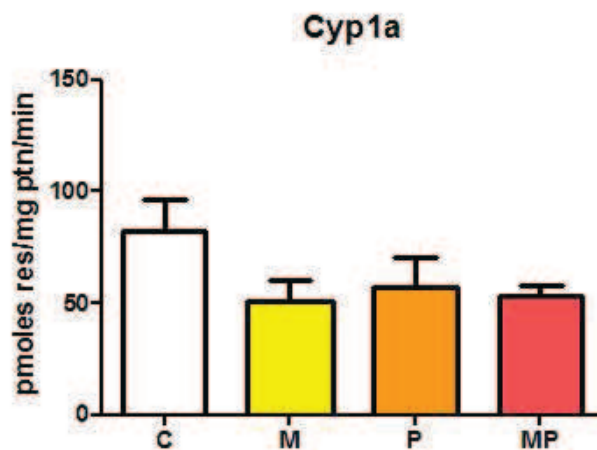


Fig. 15 - – Médias das atividades de Cyp1a1/2 (EROD, picomoles de resorufina/mg ptn/min) nas frações microsossomais hepáticas de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles (C, N=10) que receberam apenas PBS i.p., infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratadas com a dose de 1,7 mg/kg de pentoxifilina (P, N=9) s.c. e infectadas com o plasmódio e tratadas com a mesma dose do anti-inflamatório (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA ($P > 0,05$).

A dose de 1,7 mg/kg de PTX administrada pela via s.c. durante 5 dias induziu as atividades de Cyp2b (BROD) nos camundongos apenas tratados com o anti-inflamatório ($105,5 \pm 7,04$, N=9), quando comparados aos seus controles, que receberam apenas o PBS, diluente da pentoxifilina ($67,75 \pm 6,64$, N=10). A infecção malárica associada ao tratamento com a PTX ($90,67 \pm 6,67$, N=10) aumentou a atividade de BROD em relação aos animais infectados, cujas atividades de Cyp2b foram de $60,06 \pm 8,58$. A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$ (Fig. 16).

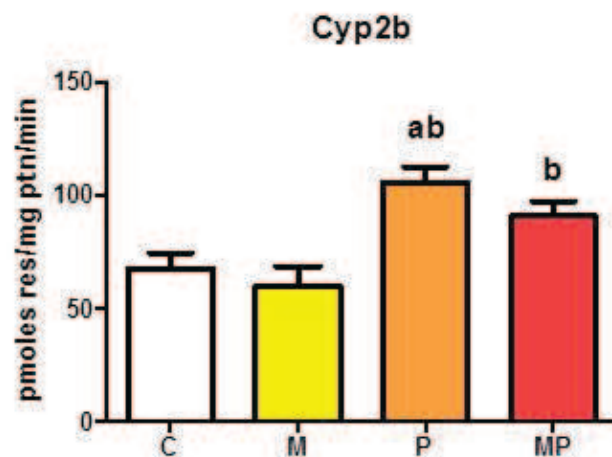


Fig 16 - Médias das atividades de Cyp2b9/10 (BROD, picomoles de resorufina/mg ptn/min) nas frações microsossomais hepáticas de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles (C, N=10) que receberam apenas PBS i.p., infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratadas com a dose de 1,7 mg/kg s.c. de pentoxifilina (P, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a mesma dose do anti-inflamatório (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, sendo considerada significativa quando $P < 0,05$: **a**: médias diferem dos controles e **b**: médias diferem das infectadas.

4.1.5.2 - Atividade da cumarina 7-hidroxilase

Há uma grande diferença na expressão de Cyp2a5 entre as linhagens murinas, porém, como já mencionamos anteriormente, é sabido que a linhagem DBA-2 é a que melhor expressa essa isoforma. Neste estudo, as atividades da cumarina 7-hidroxilase (COH, marcadora de Cyp2a5) não foram alteradas pela infecção ($173,1 \pm 26,36$) quando analisadas no DI13 da evolução da doença, pelo tratamento com a PTX ($156,4 \pm 19,49$) ou pela combinação da infecção e o antiinflamatório ($156,5 \pm 18,15$). Os controles apresentaram a atividade de $204,0 \pm 27,25$ (ANOVA, $P > 0,05$) (Fig. 17). As atividades da COH são expressas como picomoles de umbeliferona/ mg/ ptn/min.

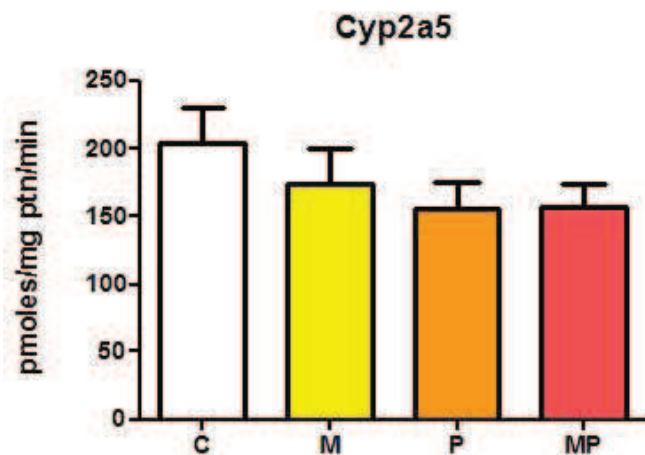


Fig 17 - Médias das atividades de Cyp2a5 (picomoles de umbeliferona/mg ptn/min) nas frações microsossomais hepáticas de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles (C, N=10) que receberam apenas PBS i.p., infectadas com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratadas com a dose de 1,7 mg/kg s.c. de pentoxifilina (P, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com a mesma dose do anti-inflamatório (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA ($P > 0,05$).

4.1.6 - Níveis séricos de Citocinas

Os níveis séricos das citocinas TNF, IL-2, IL-6, IFN e IL-17A estão representados nas figuras abaixo.

4.1.6.1 - TNF

A análise dos níveis séricos do TNF (pg/mL) mostrou que houve um aumento significativo desta citocina nos animais maláricos ($41,78 \pm 39,42$) com relação aos animais controles ($1,63 \pm 2,53$). Os animais tratados com o fármaco apresentaram valores inferiores aos controles ($0,27 \pm 0,76$). Os níveis de TNF no grupo infectado e tratado com a PTX 1,7 mg/kg durante cinco dias ($19,49 \pm 16,02$) foram menores do que os observados nos animais maláricos, porém, essa diminuição não foi significativa. A análise estatística foi Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney com $P < 0,05$.

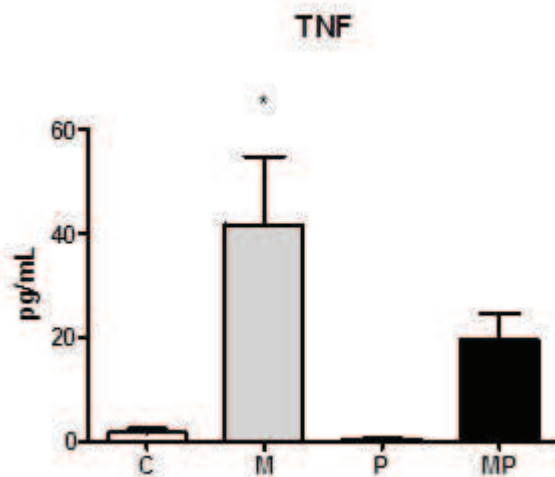


Fig. 18 - Níveis de TNF (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). A análise estatística foi Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney (*: $P < 0,05$).

4.1.6.2 – Interleucina 2 (IL-2)

De acordo com os resultados obtidos, a malária aumentou os níveis de IL-2 (pg/mL) nos animais infectados ($0,2533 \pm 0,1153$) com relação aos animais controles ($0,034 \pm 0,22$), porém esse aumento não foi significativo. Não foi possível detectar os níveis de IL-2 nos animais que receberam a PTX na dose de 1,7 mg/kg durante cinco dias. Já os animais infectados e tratados ($0,0750 \pm 0,06$) apresentaram uma diminuição com relação aos animais apenas infectados (não significativa). A análise estatística foi Kruskal-Wallis ($P > 0,05$).

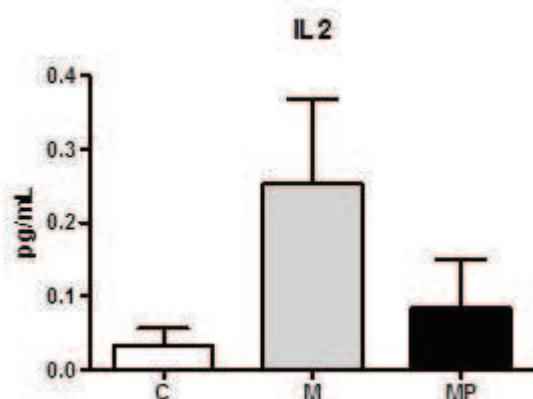


Fig. 19 - Níveis de IL-2 (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=9). A análise estatística foi Kruskal-Wallis.

4.1.6.3 – Interleucina 6 (IL-6)

A quantificação dos níveis séricos de IL-6 (pg/mL) nos animais controles foi de $0,5160 \pm 0,3044$, nos animais maláricos foi de $6,640 \pm 2,359$, nos animais tratados com PTX foi de $11,33 \pm 9,160$ e nos animais infectados e tratados com a PTX foi de $3,940 \pm 0,8962$ (Fig. 20). A análise estatística, Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney ($P < 0,05$), mostrou que os animais com a infecção malárica tiveram níveis de IL-6 no soro maior que os animais não infectados (controles).

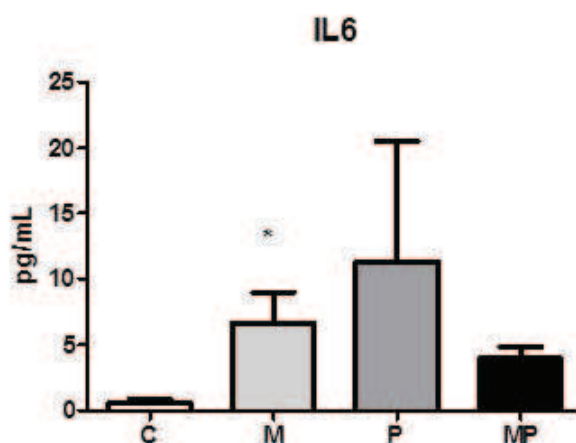


Fig. 20 - Níveis de IL-6 (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). A análise estatística foi Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney (*: $P < 0,05$).

4.1.6.4 – Interferon (IFN)

A quantificação dos níveis séricos de IFN (pg/mL) nos animais controles foi de $0,2 \pm 0,1$, nos animais maláricos foi de $13,26 \pm 43,87$, nos animais tratados com PTX foi de $0,8 \pm 0,65$ e nos animais infectados e tratados com a PTX foi de $5,8 \pm 1,6$.

A análise estatística (Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney) revelou que os animais maláricos apresentaram um aumento desta citocina com relação aos animais controles ($P < 0,05$). Os resultados estão apresentados na figura 21.

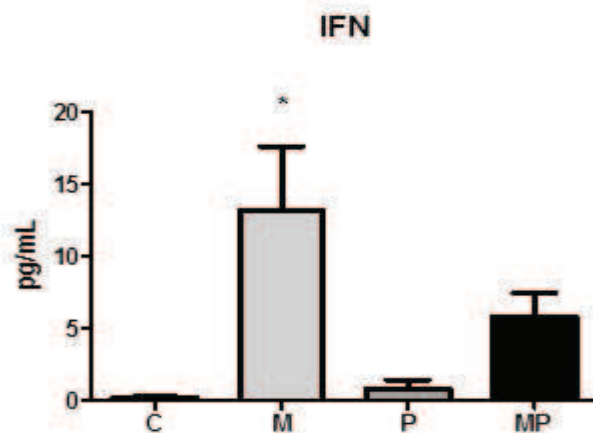


Fig. 21 - Níveis de IFN (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). A análise estatística foi Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney (*: $P < 0,05$).

4.1.6.5 – Interleucina 17 (IL-17)

Os níveis séricos de IL-17 (pg/mL) nos animais controles foi de $0,77 \pm 0,2$, nos animais maláricos foi de $0,34 \pm 0,1$, nos animais tratados com PTX foi de $0,51 \pm 0,23$ e nos animais infectados e tratados com a PTX foi de $0,30 \pm 0,14$. A análise estatística foi Kruskal-Wallis e não mostrou diferenças entre os grupos ($P > 0,05$) (Fig. 22).

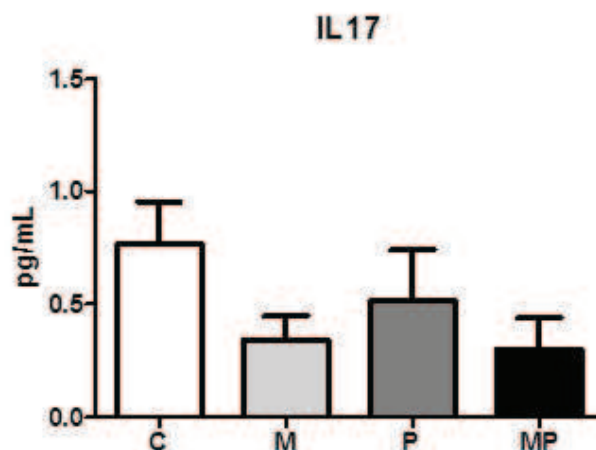


Fig. 22 - Níveis de IL-17 (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=10), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=9), tratados com pentoxifilina 1, 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=8) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com pentoxifilina na mesma dose (MP, N=10). A análise estatística foi Kruskal-Wallis.

4.2 – Experimento II

4.2.1 – Estado geral dos animais

Sinais clínicos de infecção, como piloereção, hipoatividade e taquipneia, começaram a ser vistos nos animais a partir do sexto dia de infecção (DI6).

Os órgãos, fígados e baços, retirados para estudos posteriores estavam de acordo com as alterações observadas na malária: baços e fígados aumentados e com coloração escura (depósito do pigmento malárico).

4.2.2 – Mortalidade

O grupo dos animais infectados teve um percentual de sobrevivência de 83,3%, havendo duas perdas de um total de doze animais uma no DI12 e outra no DI15. No grupo dos animais infectados e tratados foi registrada uma perda de um total de onze, sendo o percentual de sobrevivência de 90,9%. No grupo de animais tratados com o medicamento não foram registradas até o dia da eutanásia, sendo o percentual de sobrevivência de 100% (N=9).

A sobrevivência dos animais infectados com o *P. berghei* ANKA, infectados e tratados com PTX na dose de 7 mg/kg s.c. durante nove dias e os apenas tratados com o fármaco está representada na Fig. 23.

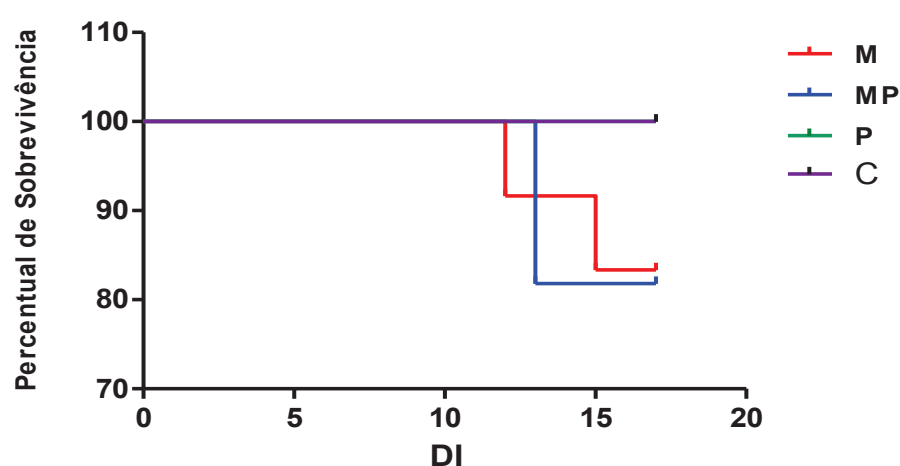


Fig. 23 – Sobrevivência das fêmeas DBA-2 infectadas por via i.p. com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M, N=10), tratadas com a PTX na dose de 7 mg/kg s.c. durante nove dias (P, N=9) e infectadas e tratadas com a PTX (MP, N=10).

4.2.3 – Parasitemias

4.2.3.1 - Parasitemia Média

As taxas de parasitemia dos animais infectados, e dos animais infectados e tratados com a PTX foram avaliadas a cada dia, a partir de DI1 até DI17, isto é, durante toda a evolução da doença. Um total de ao menos mil células eram contadas em diferentes campos da distensão sanguínea de cada animal do experimento.

As médias das taxas de parasitemia no DI17 eram de 40,3 % no grupo apenas infectado com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) e 43% no grupo infectado que recebeu o tratamento prolongado com uma dose diária de 7 mg/kg de PTX. A análise estatística foi a ANOVA a dois critérios. Embora os valores das parasitemias fossem muito próximos, a análise estatística mostrou que o tratamento com PTX interferiu com as taxas de parasitemia durante a evolução da doença, sendo $P < 0,0001$.

A Fig. 24 mostra a evolução da parasitemia nos grupos de animais infectados e infectados e tratados com o antiinflamatório durante o período de tratamento até o dia da eutanásia.

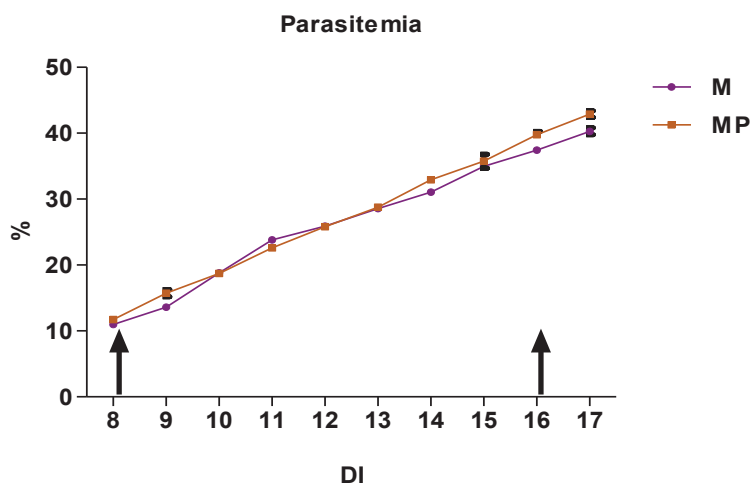


Fig. 24 – Médias das taxas de parasitemia das fêmeas DBA-2 infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* (M, N=10) e infectadas e tratadas com a pentoxifilina 7 mg/kg s.c. durante nove dias (MP, N=10) do início do tratamento com o anti-inflamatório (DI8) até o dia da eutanásia (DI17). As taxas de parasitemia apenas dos animais infectados estão representadas em marrom e as dos animais infectados e tratados com P estão representadas em roxo. A análise estatística (ANOVA a dois critérios) mostrou que houve interferência do tratamento com PTX sobre a infecção ($P < 0,0001$).

4.2.3.2 – Parasitemia Diária

A parasitemia diária de cada animal estudado no experimento nos grupos dos animais infectados e dos infectados e tratados com a PTX encontra-se representada em gráficos nas figuras 25 e 26. Assim como no Experimento I, os animais nos dois grupos apresentaram uma curva ascendente com o aumento diário da parasitemia.

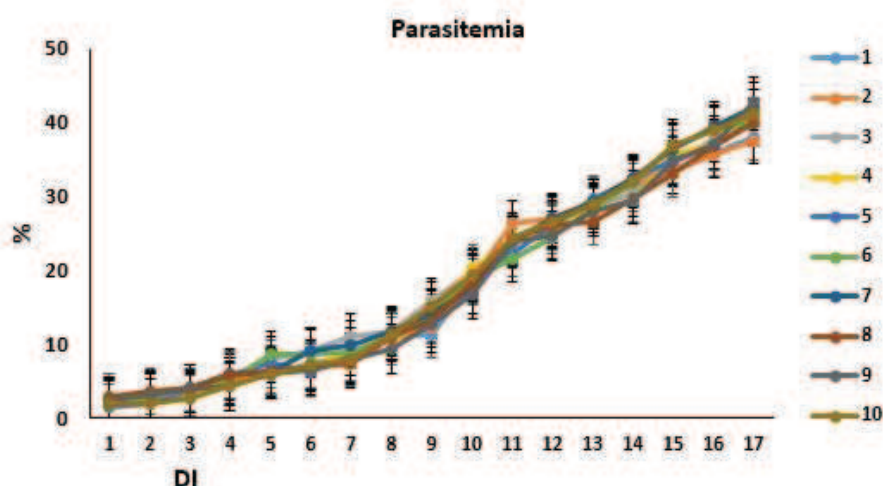


Fig.

25 – Parasitemias dos animais infectados com 10^6 HP do *P. berghei* ANKA do DI1 ao DI17 (N=10).

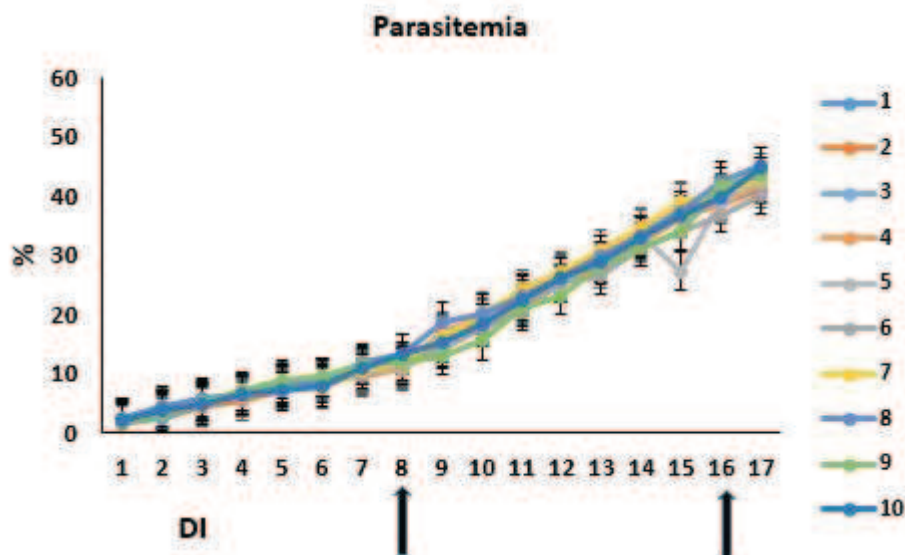


Fig. 26 – Parasitemias dos animais infectados com 10^6 HP do *P. berghei* ANKA e tratados com 7 mg/kg de PTX s.c. do DI1 ao DI17. As setas nos DI8 e DI16 indicam o início e o fim do tratamento com a PTX, respectivamente (N=10).

4.2.4 – Efeitos dos Tratamentos sobre o Peso dos Animais

Para o cálculo da evolução ponderal durante a evolução da doença, foi subtraído o peso dos animais, em gramas, no dia da morte (DI17) pelo peso no início da infecção (DI0). Os resultados foram expressos como as médias das evoluções ponderais de cada grupo de animais. A média da evolução ponderal entre os animais controles foi de $0,8 \pm 0,4$ g; nos animais infectados foi de $-2,5 \pm 0,17$ g; nos animais que receberam PTX foi de $0,1 \pm 0,34$ g e nos infectados que receberam o tratamento prolongado com PTX foi de $-3,3 \pm 0,3$ g. A análise estatística ANOVA detectou diferenças entre os grupos e revelou que a maior perda de peso ocorreu nos animais infectados e tratados com o anti-inflamatório, seguida pelo grupo dos animais infectados ($P < 0,05$). Tanto os animais infectados, como os infectados e tratados com o medicamento, mostraram evolução ponderal diferente da observada no grupo dos animais controles. Embora o grupo dos animais maláricos e o grupo dos animais maláricos e tratados com o anti-inflamatório tenham apresentado perda de peso durante o curso da doença letal, $-2,5$ g nos infectados e $-3,3$ g nos infectados e tratados, a diferença entre os grupos não se mostrou significativa na análise estatística (Fig. 27).

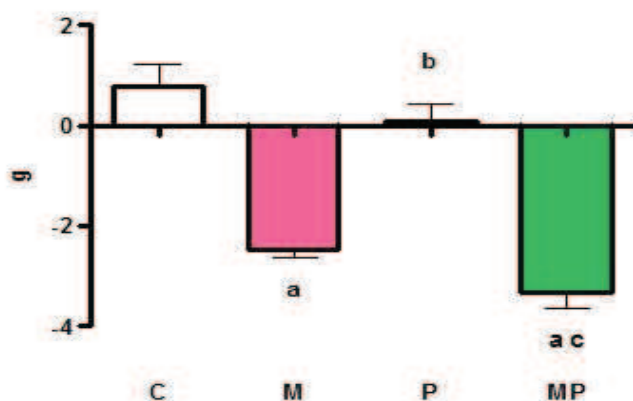


Fig. 27 – Médias das evoluções ponderais (g) no período entre DI0 (dia 0 de infecção) e DI17 (dia da eutanásia) das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=10), infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem de C; **b**: médias diferem de M e **c**: médias diferem de P.

4.2.5 - Efeitos da Infecção pelo *Plasmodium berghei* (ANKA) e do Tratamento com a Pentoxifilina sobre os Pesos dos Órgãos

Os efeitos da infecção, do tratamento com PTX, assim como a combinação infecção e tratamento sobre os pesos absolutos e relativos dos fígados e baços estão representados abaixo.

4.2.5.1 - Pesos dos Fígados e Baços

Os pesos médios absolutos dos fígados e baços estão representados nas Figuras 28 e 29, respectivamente. Já que os dois grupos de animais infectados (infectados e os infectados e tratados) perderam peso durante a evolução da doença, foi realizado o cálculo dos pesos relativos dos fígados e baços, dividindo o peso de cada órgão pelo peso corporal do animal correspondente. Os resultados estão representados nas Figuras 30 (fígados) e 31 (baços).

4.2.5.1.1 – Peso Absoluto dos Órgãos

Os pesos dos fígados dos animais controles no DI17 foi de $1 \pm 0,01$ g, dos animais infectados foi de $1,4 \pm 0,04$ g, dos animais tratados com PTX foi de $1,11 \pm 0,02$ g e dos animais infectados e tratados com PTX foi de $1,16 \pm 0,01$ g. A análise estatística (ANOVA) detectou diferenças entre os pesos dos fígados dos animais infectados, e infectados e tratados e com relação aos controles. A média dos pesos dos fígados dos animais maláricos foi 1,4x maior do que o peso médio dos animais controles, e a média entre os animais infectados e tratados diferiu do peso médio dos animais infectados, isso é, o tratamento com a PTX reduziu o tamanho médio do órgão, aumentado pela infecção (Fig. 28).

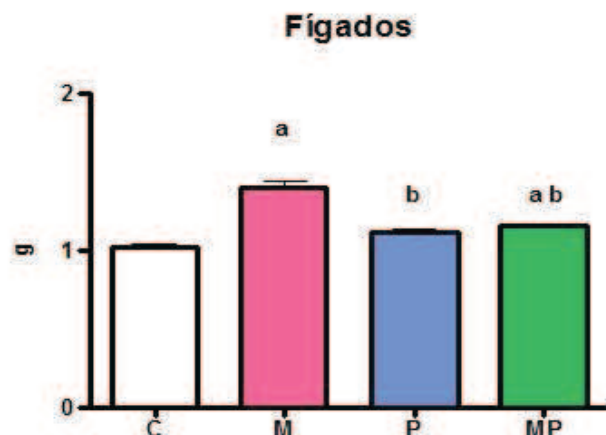


Fig. 28 - Pesos absolutos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P<0,05$): a: $\neq$ C; b $\neq$ M.

O peso médio dos baços no grupo controle foi de $0,1\pm0,005$ g; nos animais maláricos foi de $0,5\pm0,04$ g; nos animais que receberam PTX foi de $0,1\pm0,004$ g e nos animais doentes que receberam o tratamento prolongado com a PTX foi de $0,3\pm0,03$ g. O peso médio dos baços dos animais infectados foi 5x maior do que o valor encontrado nos controles e nos infectados e tratados, foi de 3x o valor dos animais controles. A ANOVA revelou diferenças entre o peso médio dos baços nos animais infectados quando comparado ao peso médio dos baços no grupo infectado e tratado, mostrando que a PTX também reduziu o peso médio do baço, aumentado pela doença (Fig. 29).

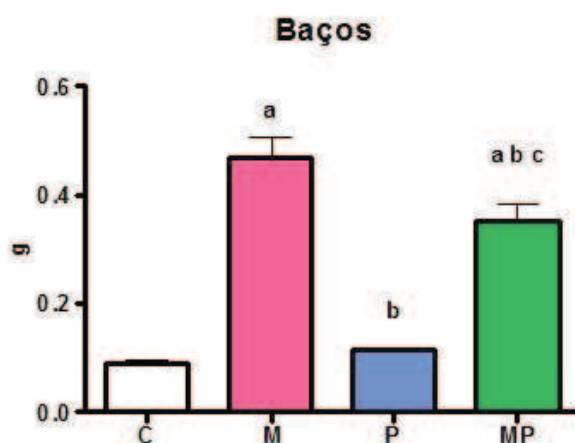


Fig. 29 - Pesos absolutos dos baços das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=10), infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* (M, N=10), tratadas com PTX (7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P<0,05$): a: $\neq$ C; b $\neq$ M; c $\neq$ P.

4.2.5.1.2 – Peso Relativo dos Órgãos

Os fígados dos camundongos DBA-2 fêmeas controles apresentaram o peso relativo de $0,05 \pm 0,001$ g, dos animais com malária foi de $0,08 \pm 0,003$ g, dos animais que receberam somente a PTX foi de $0,06 \pm 0,002$ g e dos infectados que receberam PTX foi de $0,07 \pm 0,003$ g. A ANOVA mostrou diferenças entre os pesos relativos dos fígados dos animais infectados em relação aos controles. O aumento do peso relativo dos fígados dos animais infectados foi de 1,6x com relação aos valores dos pesos relativos dos fígados dos animais controles, e nos infectados que também receberam a PTX, o aumento foi 1,4x quando comparado aos controles. Não foram observadas diferenças entre a média dos pesos relativos dos fígados dos animais infectados e a dos animais infectados e tratados, não sendo semelhante ao que ocorreu com os pesos absolutos do fígado (Fig. 30).

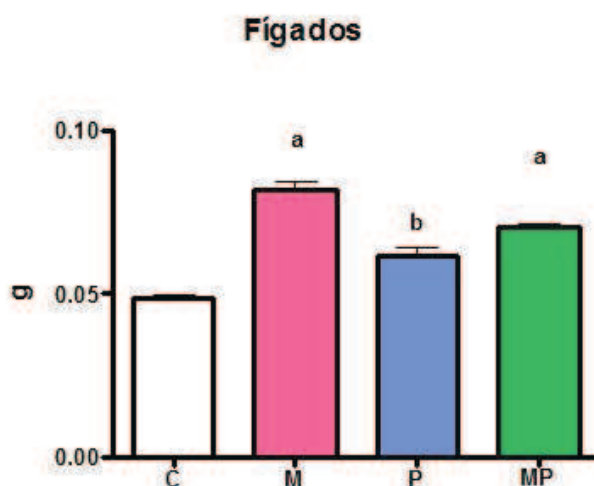


Fig. 30 - Pesos relativos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): a: $\neq$ C; b $\neq$ M.

Nos baços, os pesos relativos nos dos animais controles foi de $0,004 \pm 0,0003$ g, dos animais com malária foi de $0,03 \pm 0,002$ g, dos animais que receberam o antiinflamatório foi de $0,006 \pm 0,0003$ g e dos infectados que receberam PTX foi de $0,02 \pm 0,002$ g. A ANOVA revelou que houve diferenças entre os pesos relativos dos baços dos animais infectados, e infectados e tratados em relação aos controles. O aumento relativo dos baços dos animais infectados com o *P. berghei* ANKA foi 7,5x

maior do que a média dos pesos relativos do grupo controle, e no grupo infectado e tratado, esta diferença em relação ao grupo controle foi um pouco menor (5x). As diferenças entre os grupos infectado e infectado e tratado não foram significativas quando os valores foram analisados estatisticamente pela ANOVA, o que não ocorreu com os pesos absolutos desses mesmos órgãos (Fig. 31).

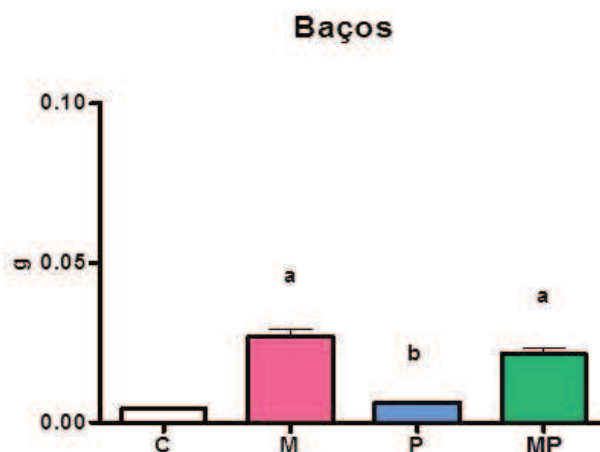


Fig. 31 - Pesos relativos dos baços dos camundongos fêmeas DBA-2 controles (C, N=10), infectadas com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg, N=9) e infectadas e tratadas (MP, N=10). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): a: $\neq$ C; b $\neq$ M e c $\neq$ P.

4.2.6 - Efeitos da Infecção pelo *Plasmodium berghei* (ANKA) e do Tratamento com a Pentoxifilina sobre as Atividades das Monooxigenases Hepáticas

As atividades das monooxigenases hepáticas nos diferentes grupos experimentais estão descritas adiante.

4.2.6.1 – Atividades da etoxi-resorufina-O-desetilase (EROD)

As atividades de Cyp1a1/2, evidenciadas pela reação de EROD, e as atividades das reações de Cyp2b9/10, marcadas com as reações de BROD, estão representadas nas Figuras 32 e 33, respectivamente.

As atividades microsossomais hepáticas de EROD (picomoles de resorufina/mg de proteína/min) nos animais controles (N=10) foram de $76 \pm 4,8$ picomoles de

resorufina/mg de proteína/min. As atividades dos animais maláricos (N=10) foi inferior à dos animais controles, $55 \pm 3,0$ (uma diminuição de aproximadamente 30%), nos animais tratados com P (N=9) foi de $80,6 \pm 7,01$, e nos animais infectados e tratados (N=9) foi de $47 \pm 4,6$ picomoles de resorufina/mg de proteína/min, também inferior à dos animais controles (diminuição de aproximadamente 30%). As diferenças estatisticamente significativas (ANOVA com $P < 0,05$) estão representadas na Fig. 32.

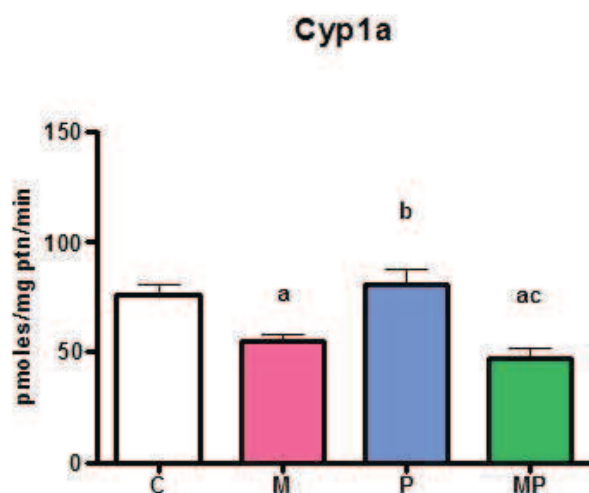


Fig. 32 – Atividades de EROD (Cyp1a) das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam apenas PBS, infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg durante nove dias, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com o anti-inflamatório (MP, N=9). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): a: $\neq$ C; b $\neq$ M e c $\neq$ P.

4.2.6.2 – Atividades da benzilozi-resorufina-O-desbenzilase (BROD)

A média das atividades hepáticas de BROD (picomoles de resorufina/mg de proteína/min) nos animais que receberam apenas o PBS (controles, N=10) foi $94,1 \pm 5,9$ picomoles de resorufina/mg de proteína/min. A média das atividades dos animais infectados ($40,5 \pm 2,2$; N=10) apresentou uma redução de 43% com relação aos controles, já nos animais tratados com PTX (N=9), a média foi de $102,4 \pm 10,8$ e nos animais infectados e tratados (N=9) foi de $72,1 \pm 11,94$, valores próximos aos dos animais controles, que receberam apenas o veículo. As diferenças estatisticamente significativas (ANOVA com $P < 0,05$) estão representadas na Fig. 33.

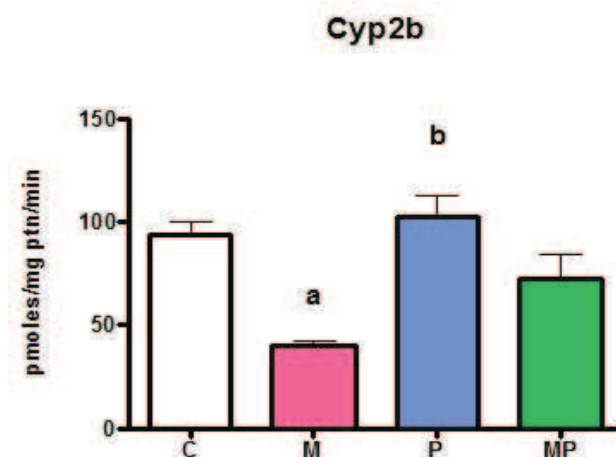


Fig. 33 – Atividades de BROD (Cyp2b) das fêmeas DBA-2 controles (C, N=10) que receberam apenas PBS, infectadas com 10^6 HP com *P. berghei* ANKA (M, N=10), tratadas com PTX (P, 7 mg/kg durante nove dias, N=9) e infectadas com o plasmódio e tratadas com o anti-inflamatório (MP, N=9). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): a: $\neq$ C e b $\neq$ M.

4.2.6.3 – Atividade da cumarina 7-hidroxilase

A atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH, picomoles de umbeliferona/mg de proteína/min) dos animais controles foi de $90,5 \pm 7,8$ e dos animais tratados com o medicamento foi de $91,7 \pm 7,6$. Nos animais maláricos a atividade de COH foi de $80,7 \pm 4,2$ e nos animais parasitados e tratados com PTX foi de $112,2 \pm 10,87$. A análise estatística (ANOVA) revelou diferenças entre os grupos (Fig. 34).

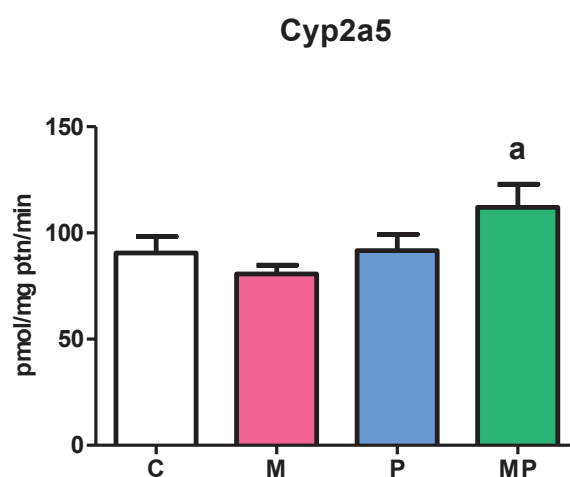


Fig. 34 - Atividades de COH (Cyp2a5) na fração microssomal hepática de camundongos DBA-2 (fêmeas) não infectados (C; N=10), infectados com 10^6 HP com *P. berghei* ANKA, tratados com PTX (P, 7 mg/kg durante nove dias, N=9) e infectados com *P. berghei* ANKA e tratados com PTX (MP; N=10). A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de comparações múltiplas de Bonferron, $P < 0,05$: a: difere dos infectados.

4.2.6.4 – Níveis Séricos de TNF

Com relação aos níveis séricos de TNF, os animais controles apresentaram a média de 197 pg/mL $\pm$ 32,96, os animais maláricos a de 168 pg/mL $\pm$ 13,31, o grupo tratado somente com a PTX a de 145,4 pg/mL $\pm$ 1,71 e os animais infectados e tratados com a PTX a de 153,9 pg/mL $\pm$ 8,64. A análise estatística não mostrou diferenças entre os grupos.

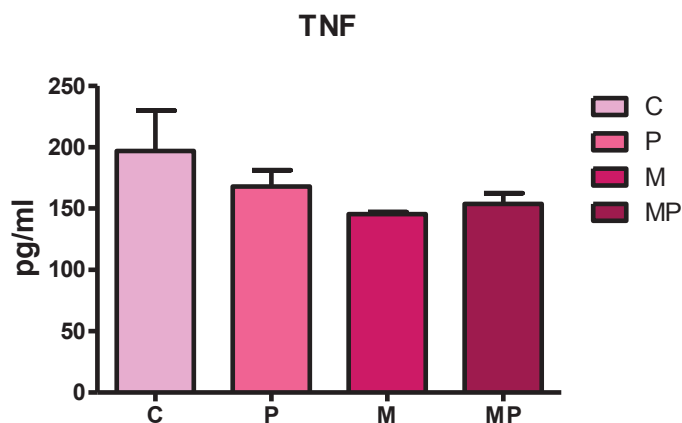


Fig. 35 - Níveis de TNF (pg/mL) no soro de animais controles (C; N=3), infectados com 10^6 hemácias parasitadas com *P. berghei* (ANKA) (M; N=7), tratados com PTX 7 mg/kg s.c. durante cinco dias (P; N=4) e infectados pelo *P. berghei* e tratados com PTX na mesma dose (MP, N=4). A análise estatística foi Kruskal-Wallis seguida do teste de Mann-Whitney.

4-3 –Efeitos da Sepse pelo LPS de *E. coli* e do Tratamento com a Pentoxifilina sobre as Atividades das Monoxigenases Hepáticas

4.3.1 – Estado geral dos animais

Os sinais clínicos da endotoxemia, que incluíram piloereção, hipoatividade, e hipotermia, foram observados nos animais que receberam apenas o LPS e nos que receberam o co-tratamento (PTX durante 9 dias + LPS).

4.3.2 – Mortalidade

Em todos os grupos estudados o percentual de sobrevivência foi de 100%, ou seja, não foram registradas perdas de animais durante todo o experimento em nenhum dos grupos de animais.

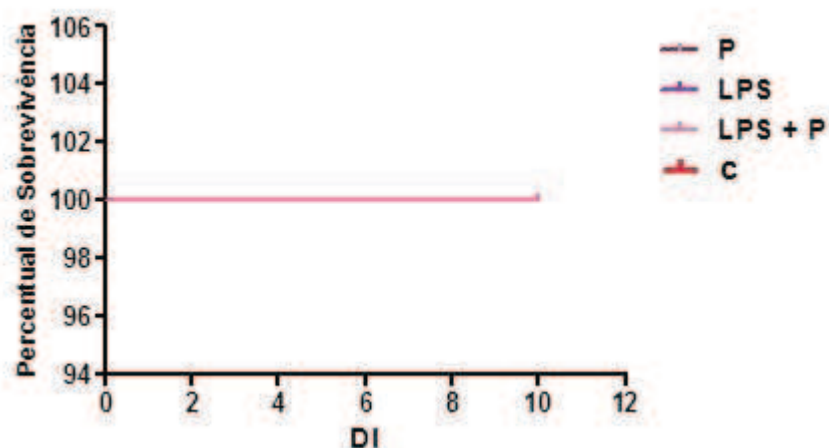


Fig. 36 – Sobrevivência das fêmeas DBA-2 tratadas com a PTX durante nove dias (7 mg/kg s.c.), tratadas com 10 mg/kg de LPS, e tratadas com a PTX durante nove dias (7 mg/kg s.c.) e desafiadas com LPS na mesma dose.

4.3.3 – Evolução Ponderal

Para avaliarmos os efeitos do tratamento com a PTX sobre a evolução ponderal dos animais durante o experimento, foi registrada a diferença (em g) entre os pesos dos animais no dia da morte, dia 9, e o dia 0 de tratamento. Para expressar os resultados, foram estudadas as médias das evoluções ponderais de cada grupo estudado.

A média nos animais controles foi de $0,2155 \text{ g} \pm 0,196$, nos tratados com o LPS foi de $-2,25 \text{ g} \pm 0,3795$, nos tratados com a PTX foi de $-0,06 \text{ g} \pm 0,2693$ e nos animais tratados com a PTX e desafiados com o LPS foi de $-0,76 \text{ g} \pm 0,3271$. A análise estatística foi a ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados mostraram que os animais apenas tratados com o LPS perderam peso quando comparados aos controles, e os que receberam somente a pentoxifilina e os tratados com a PTX e desafiados com o LPS perderam menos peso do que os tratados com o LPS. A maior perda de peso ocorreu entre os animais tratados com o LPS ($P < 0,05$) (Fig. 37).

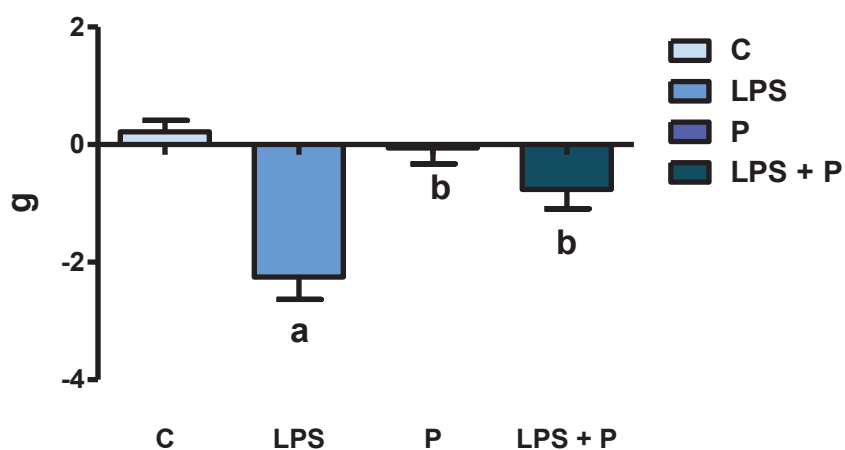


Fig. 37 – Médias das evoluções ponderais (g) dos animais controles (C, N=11), tratados com o LPS (LPS, N=11), tratados apenas com a PTX 7 mg/kg s.c. durante nove dias (P, N=11) e tratados com a PTX e desafiados com o LPS (LPS + P, N=11) entre os dias 9 e o dia 0 do experimento. A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni: $P < 0,05$: a: $\neq$ C; b: $\neq$ LPS.

4.3.4 – Peso Absoluto dos órgãos

No dia da eutanásia (dia 9 do experimento), o peso dos fígados dos animais controles foi de $1,03 \text{ g} \pm 0,014$, dos animais tratados com o LPS foi de $0,95 \text{ g} \pm 0,009$, nos animais tratados com a PTX foi de $1,00 \text{ g} \pm 0,02$ e nos animais tratados com a PTX e desafiados com o LPS foi de $0,93 \text{ g} \pm 0,017$.

A análise estatística (ANOVA e teste de Bonferroni; $P < 0,05$) revelou que houve uma discreta diminuição entre os pesos dos fígados dos animais tratados com o LPS com relação ao grupo controle (Fig. 38). A análise também revelou que os animais tratados com a PTX que receberam a endotoxina perderam mais peso do que os animais que foram tratados com a PTX apenas.

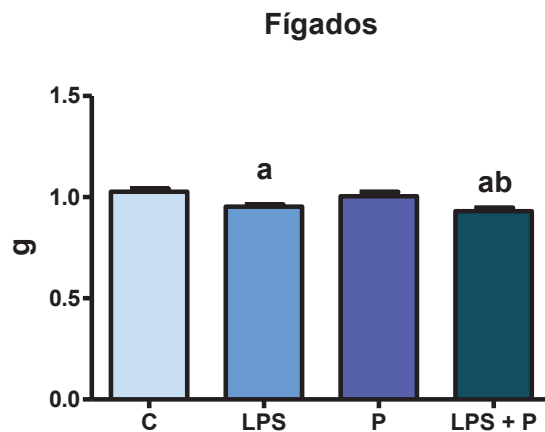


Fig. 38 - Pesos absolutos dos fígados das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratadas com 10 mg/kg i.p. de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas e desafiadas com o LPS (LPS + P, N=11). a: $\neq$ C e b $\neq$ P.

Com relação ao peso absoluto dos baços, os animais controles apresentaram a média de $0,09 \text{ g} \pm 0,0036$, o dos animais tratados com o LPS foi de $0,11 \text{ g} \pm 0,0064$, o dos animais tratados com a PTX foi de $0,090 \text{ g} \pm 0,004$ e a dos animais tratados com a PTX e desafiados com o LPS foi de $0,10 \text{ g} \pm 0,004$.

A ANOVA mostrou que houve diferença entre os pesos dos baços do grupo tratado com o LPS com relação ao grupo controle, isto é, houve um discreto aumento do baço ($P < 0,05$).

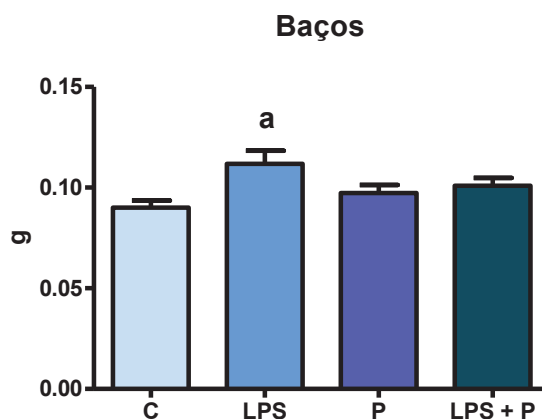


Fig. 39 - Pesos absolutos dos baços das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), desafiadas com o LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas com a PTX na mesma dose e desafiadas com 10 mg/kg i.p. de LPS (LPS + P, N=11). a: $\neq$ C.

4.3.5 – Atividades de Monooxigenases

As atividades de EROD, marcadora de Cyp1a1/2 e BROD, marcadora de Cyp2b9/10, estão representadas nas Figuras 40 e 41, respectivamente.

4.3.5.1 – Alcoxi-resorufina-*O*-desalquilases

4.3.5.1.1 - Atividades da etoxi-resorufina-*O*-desetilase

As atividades (picomoles de resorufina / mg de proteína / min) hepáticas da etoxi-resorufina-*O*-desetilase (EROD, Cyp1a) nos animais controles foram de $70,26 \pm 5,903$, nos animais tratados com o LPS foi de $46,73 \pm 8,116$, nos animais tratados com o fármaco (7 mg/kg s.c. durante nove dias) foi de $78,56 \pm 11,38$ e nos animais tratados com a PTX e desafiados com o LPS foi de $49,78 \pm 5,274$.

A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Houve uma clara diminuição da atividade de Cyp1a nos animais tratados com o LPS, porém, a análise estatística não julgou significativa. A ANOVA revelou que os animais tratados com a PTX apresentaram uma indução de Cyp1a com relação aos controles não tratados e que os animais que receberam o tratamento combinado PTX + LPS diferiram dos que receberam apenas o medicamento ($P < 0,05$). Os resultados estão representados na figura 40.

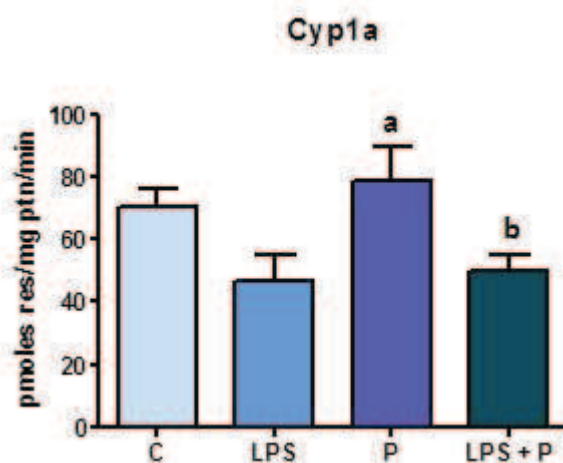


Fig. 40 – Atividades de EROD (Cyp1a) das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratadas com 10 mg/kg de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas e desafiadas com o LPS com as mesmas doses (LPS + P, N=11). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. $P < 0,05$: a: $\neq$ C; b $\neq$ P.

4.3.5.1.2 – Atividades da benziloxi-resorufina-*O*-desbenzilase

A atividade (picomoles de resorufina / mg de proteína / min) da benziloxi-resorufina-*O*-desbenzilase (BROD, Cyp2b) hepática no grupo controle foi de $74,25 \pm 6,753$, nos animais tratados com o LPS foi de $42,90 \pm 6,640$, nos animais tratados com o anti-inflamatório foi de $76,02 \pm 9,317$ e nos animais tratados com a PTX e desafiados com o LPS foi de $45,05 \pm 4,042$.

A análise estatística (ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni) mostrou uma redução significativa da atividade de Cyp2b nos animais tratados com 10 mg/kg de LPS com relação aos controles, mas o tratamento com a PTX combinado ao desafio com o LPS não reverteu aos valores constitutivos a redução da atividade de BROD observada nos animais tratados apenas com a endotoxina.

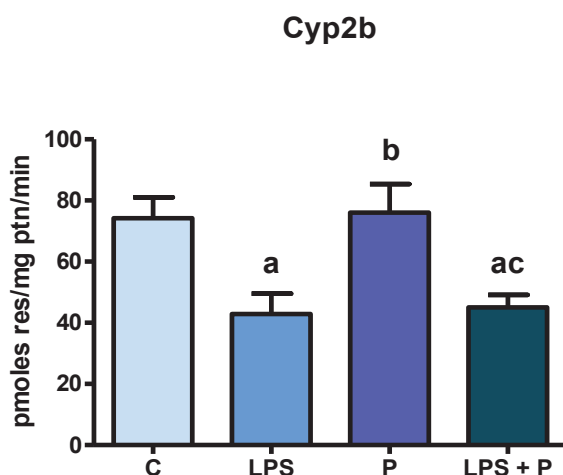


Fig. 41 – Atividades de BROD (Cyp2b) das fêmeas DBA-2 controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratadas com 10 mg/kg de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratadas com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratadas e desafiadas com o LPS com as mesmas doses (LPS + P, N=11). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $P < 0,05$: a: $\neq$ C, b: $\neq$ LPS e c: $\neq$ P.

4.3.5.1.3 – Atividades da cumarina 7-hidroxilase

A atividade hepática da cumarina 7-hidroxilase evidenciada pela reação de COH, que avalia a atividade de Cyp2a5, foi de $68,2 \pm 6,68$ nos animais controles, $65,96 \pm 9,3$ nos animais tratados com 10 mg/kg de LPS, $77,0 \pm 14,9$ nos animais tratados com a PTX e de $53,57 \pm 7,96$ nos animais tratados com a PTX e desafiados com o LPS.

A ANOVA não revelou diferenças entre os grupos (Fig. 42).

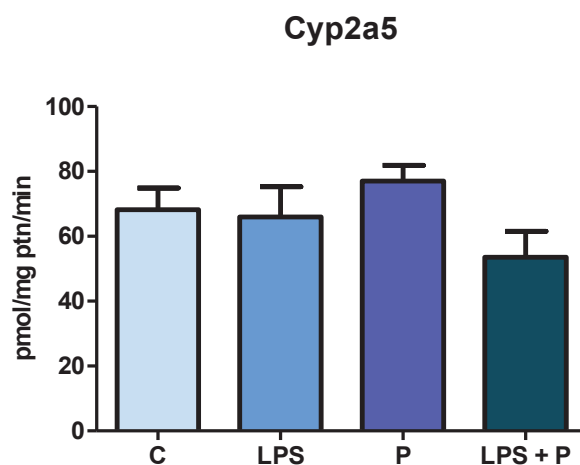


Fig. 42 – Atividades de COH (Cyp2a5) na fração microssomal hepática de camundongos DBA-2 (fêmeas) controles que receberam apenas PBS (C, N=11), tratados com 10 mg/kg de LPS de *E. coli* (LPS, N=11), tratados com pentoxifilina (P, 7 mg/kg s.c. durante 9 dias, N=11) e tratados com o anti-inflamatório na mesma dose e desafiados com o LPS (LPS + P, N=11). A análise estatística foi a ANOVA.

4.3.6 – Níveis séricos de óxido nítrico

A administração de uma dose única de 10 mg/kg de LPS i.p. provocou aumento considerável (aproximadamente 10x) dos níveis séricos de NO (μM) quando os resultados foram comparados aos resultados dos animais controles ($24,84 \pm 3,023$ nos controles e $291,4 \pm 107,7$ nos tratados com o LPS). O tratamento pela via s.c. durante nove dias com a PTX na dose de 7 mg/kg impediu a elevação dos níveis séricos de NO daquela magnitude observados com o tratamento com a endotoxina quando administrada isoladamente ($106,9 \pm 24,36$). A administração da PTX no regime de dose utilizado não provocou alterações dos níveis de NO quando comparados aos animais controles ($33,23 \pm 2,962$). A análise estatística ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni mostrou que a redução dos níveis de NO pelo tratamento combinado LPS e PTX não mostrou diferenças entre os grupos (Fig. 43).

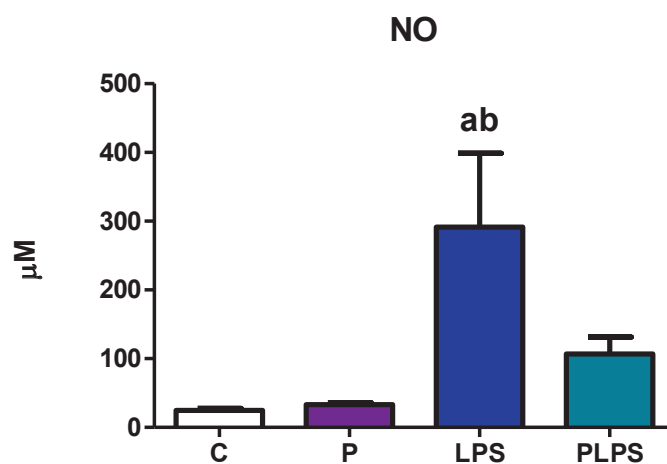


Fig. 43 - Níveis séricos de NO nas fêmeas DBA-2 que receberam apenas PBS (controles, C, N=7), PTX s.c. na dose de 7 mg/kg durante nove dias (P, N=8), 10 mg/kg de LPS de *E. coli* i.p. (LPS, N=7) e o tratamento combinado com a endotoxina e o antiinflamatório (PLPS, N=8). A análise estatística foi ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ($P < 0,05$): **a**: médias diferem dos controles e **b**: médias diferem de P.

5 – DISCUSSÃO

Como já comentado anteriormente neste trabalho, alterações do metabolismo de xenobióticos, evidenciadas quer por estudos farmacocinéticos em seres humanos, quer por estudos em animais utilizando modelos de doenças infecciosas e inflamatórias, foram descritas na literatura científica nas últimas quatro décadas. Nesses estudos, a maioria das alterações evidenciadas no tecido hepático foi a redução dos níveis totais, atividades e expressão de CYP. Contrastando com esses resultados, foi observado que a Cyp2a5 murina estava elevada em alguns modelos de parasitose.

KIRBY e colaboradores foram os primeiros autores a descrever a indução da expressão e da atividade de Cyp2a5 associada ao parasitismo em hamsters infectados com o trematódio *Opisthorchis viverrini* (KIRBY *et al.*, 1994).

Posteriormente, em 1999, MONTERO e colaboradores demonstraram que as atividades de Cyp2a5 estavam elevadas no tecido hepático de camundongos infectados com a *Fasciola hepatica*.

A indução da expressão e da atividade de Cyp2a5 hepática em camundongos A/JCr naturalmente infectados com o *Helicobacter hepaticus* constitui exemplo de associação de infecção (hepatite) e indução dessa isoforma Cyp murina (CHOMARAT *et al.*, 1997).

Em camundongos C3H/HeOuj, foi observado que a expressão de Cyp2a5 hepática e renal foi induzida pelo *Citrobacter rodentium*, bactéria de roedores equivalente à *E. coli* enteropatogênica para seres humanos (RICHARDSON *et al.*, 2006).

Em seres humanos, a relação entre o aumento da atividade de CYP2A6 e a presença de parasitose hepática foi pela primeira vez descrita por SATARUG e colaboradores (1996). Nesse estudo, o tratamento dos pacientes portadores de *Opisthorchis viverrini* com o praziquantel reduziu a eliminação do metabólito da cumarina, 7-hidroxycumarina, utilizado como marcador da atividade da CYP2A6, e a fibrose biliar, o que levou os autores a sugerirem que a expressão de CYP2A6 estaria induzida nos pacientes com infestação crônica que também apresentavam fibrose dos dutos biliares intra-hepáticos.

YONGVANIT *et al.* (2012), recentemente, confirmaram a indução da expressão, da atividade e dos níveis de proteína de CYP2A6 nas regiões peri-tumorais de tecido

hepático carcinomatoso, onde há intensa atividade inflamatória. Outros autores haviam evidenciado a associação de CYP2A6 com o colangiocarcinoma, carcinoma primário do duto biliar associado à infestação crônica pelo *Opisthorchis viverrini* (RAUNIO *et al.*, 1998; CRAWFORD *et al.*, 1998; GODOY *et al.*, 2002 apud YONGVANIT *et al.*, 2012).

Por outro lado, modelos de endotoxemia em camundongos mostraram que a expressão do RNAm de Cyp2a5 estava reduzido (BARCLAY *et al.*, 1999).

LPS na dose de 1 mg/kg administrado a camundongos da linhagem 129S1 reduziu a expressão do RNAm de Cyp2a5 16 h após injeção i.p. da endotoxina (RICHARDSON & MORGAN, 2005).

O tratamento de 24 h de DBA-2 com uma dose baixa de LPS (0,5 mg/kg) reduziu os níveis do RNAm, proteína e a atividade catalítica de Cyp2a5 (GILMORE *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, o LTA vem desenvolvendo estudos das alterações das atividades e da expressão das enzimas da fase I e II do metabolismo em modelos de doenças infecciosas, como esquistossomose, leishmaniose e malária murina letal e não letal, e em modelo de sepse provocada por endotoxina bacteriana. Os estudos tem utilizado linhagens isogênicas de camundongos, como DBA-2 e C57BL/6, linhagem *outbred*, como Swiss Webster, e rato Wistar.

Os estudos do grupo do LTA descreveram pela primeira vez a indução da atividade de Cyp2a5 em modelos murinhos de malária (letal pelo *P. berghei* e não letal pelo *P. chabaudi*) em camundongo DBA-2, linhagem que detém a maior expressão do Cyp2a5, e C57BL/6 (DE-OLIVEIRA *et al.*, 2006, 2010). A indução de Cyp2a5 no modelo de malária letal no DBA-2 foi evidenciada no estágio avançado da doença, a partir de DI16, enquanto na malária não letal, a indução de Cyp2a5 ocorreu em DI6, em torno do pico da parasitemia que aconteceu em DI5 (DE-OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O modelo de sepse induzida pela endotoxina de *E. coli* em DBA-2 utilizado no LTA mostrou resultados surpreendentes. As doses baixas (0,025 a 2 mg/kg) provocaram redução e as doses altas (5 a 20 mg/kg) não alteraram a atividade de Cyp2a5 revelada pelo ensaio da atividade da COH 24 h após o tratamento com o LPS. Por outro lado, as doses baixas de LPS não alteravam Cyp1a ou 2b e as doses altas reduziam ambas as atividades (De-Oliveira, dados não publicados; Poça, 2013).

Nos modelos animais de sepse descritos na literatura, a evidência da RFA tem levado os pesquisadores a indagar se haveria uma relação entre as alterações de CYP e os mediadores inflamatórios, como citocinas e NO, liberados em resposta ao estímulo imune. A evidência da inibição de citocinas pró-inflamatórias e da indução de citocinas anti-inflamatórias pela pentoxifilina, e da inibição da produção de NO demonstradas nos artigos de MARCINKIEWICZ *et al.* (2000), BESHAY *et al.* (2001) e MELLO *et al.* (2008) associada à proposta de utilização deste anti-inflamatório no tratamento da malária humana (WENISCH *et al.*, 1998) nos levou a investigar se o tratamento prolongado com PTX em doses baixas seria capaz de reverter as alterações das atividades de CYP evidenciadas na malária murina letal pelo *P. berghei* (ANKA).

Em trabalho publicado em 2008, Mello e colaboradores induziram a mucosite intestinal em camundongos machos da linhagem Swiss com irinotecan. A PTX foi administrada via s.c. nas doses de 1,7, 5 e 15 mg/kg durante sete dias, tendo início um dia antes da injeção i.p. de irinotecan. As doses de 1,7 e 5 mg/kg foram eficazes na reversão da infiltração de células inflamatórias e a menor dose reverteu a mucosite induzida pelo irinotecan. No que diz respeito às citocinas, os autores mostraram que a dose de 1,7 mg/kg reverteu a elevação do TNF e IL-1 β provocada pelo irinotecan. As menores doses apresentaram, portanto, um melhor efeito protetor das estruturas intestinais, enquanto a maior dose, de 15 mg/kg, não reduziu a mucosite nem a diarreia.

ABDEL-SALAM e colaboradores (2003 apud MELLO *et al.*, 2008) também haviam demonstrado em ratos que doses mais baixas de PTX reduziam o edema de patas induzido pela carragenina, enquanto altas doses do anti-inflamatório não sustentavam o efeito por mais que duas horas.

Em cultura de macrófagos murinos, RAW 264.7, PTX em altas concentrações suprimiu a expressão do RNAm da NOS2 (5 mM) e inibiu a produção de NO (IC₅₀ de 2,4 a 2,9 mM) (BESHAY *et al.*, 2001).

Em estudo realizado no LTA, a administração aguda de uma dose alta de pentoxifilina, duas injeções de 100 mg/kg, sendo a primeira 30 min antes e a segunda, 30 min depois da administração de LPS (10 mg/kg), a camundongos DBA-2 do sexo feminino reduziu consideravelmente a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF, INF, IL-6 e IL-17A, e elevou a produção das anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Os níveis

de nitrito foram reduzidos em aproximadamente 50% os valores observados nos animais tratados apenas com o LPS de *E. coli* (Poça, 2013).

O tratamento de pacientes com malária grave por *P. falciparum* com doses altas (1,67 mg/kg/h durante as primeiras 72 h) e baixas (0,83 mg/kg/h durante as primeiras 72 h) de PTX foi descrito por BESHAY *et al.* (1998). Após 6 h da administração de doses altas de PTX, os níveis de TNF e IL-6 estavam reduzidos consideravelmente, mas após 6 h do tratamento com doses baixas, os níveis da citocinas estavam elevados. Apesar da redução do TNF com uma dose alta de PTX, não foram observados efeitos benéficos sobre a duração da parasitemia ou da febre, nem melhora do quadro clínico geral com o tratamento com a PTX.

Diante do que foi exposto acima, no nosso modelo de malária letal, o tratamento prolongado com doses baixas de PTX nos pareceu ser o regime de doses mais adequado para inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, e também do NO, e, conseqüentemente, investigar se as alterações de CYP observadas no modelo murino de malária letal poderiam estar associadas à produção desses mediadores inflamatórios.

As doses de 1,7 e 7 mg/kg de peso de PTX selecionada para este estudo, por si só, não provocaram alterações dignas de nota do estado geral dos animais, nem dos parâmetros avaliados de sobrevivência, evolução ponderal e peso dos órgãos. No que diz respeito às atividades das monooxigenases, no entanto, observamos que a menor dose de 1,7 mg/kg, e não a maior, de 7 mg/kg, induziu a atividade de BROD nas fêmeas adultas DBA-2 em aproximadamente 1,6 x.

Com a dose mais baixa, de 1,7 mg/kg de PTX, administrada durante cinco dias durante a evolução do quadro de malária letal, foi possível demonstrar que não houve interação entre o tratamento e a infecção e que ocorreu reversão dos aumentos dos pesos relativos do fígado e do baço provocados pela infecção malárica. No que diz respeito à produção de citocinas, embora as análises estatísticas não tenham revelado resultados significativos de reversão da produção elevada pela malária, uma tendência à redução dos níveis séricos de TNF, IL-2, IL-6 e IFN pode ser observada. Quanto às monooxigenases, como a avaliação das atividades não demonstrou alterações pela infecção no DI13, o efeito da pentoxifilina sobre as alterações de CYP pela malária não pode ser verificado.

Com o tratamento com a dose de 7 mg/kg de PTX durante o curso da malária pelo *P. berghei*, os resultados mostraram que ao final da evolução da doença (DI16 e DI17), as parasitemias nos animais que receberam o tratamento com o anti-inflamatório estavam elevadas. Em relação ao peso dos órgãos, o anti-inflamatório na dose de 7 mg/kg durante nove dias foi capaz de reverter, embora discretamente, apenas o peso do baço, elevado pela infecção. No que diz respeito às atividades das CYPs, os resultados não demonstraram reversão das atividades de Cyp1a reduzidas pela malária, mas uma tendência à recuperação de Cyp2b (embora não significativa estatisticamente) pode ser sugerida. Nenhum efeito indutor sobre Cyp2a5 foi evidenciado nos dias pós-infecção DI13 ou DI17, mas uma indução da atividade dessa isoforma, demonstrada pela reação de COH, foi observada com o tratamento prolongado com a maior dose de PTX.

Os resultados da quantificação dos níveis séricos de TNF não revelaram a elevação dessa citocina pela infecção. Não houve diferenças entre os grupos estudados. Em estudo realizado por Kremer e seus colaboradores (2000), camundongos C57BL/6 infectados por *Mycobacterium bovis*, apresentaram as médias dos níveis séricos de TNF por volta de 100 pg/mL.

Para demonstrar o efeito anti-inflamatório da PTX na dose de 7 mg/kg sobre a produção de NO, foi utilizado, paralelamente, o modelo de endotoxemia com o LPS de *E. coli*. Este modelo paralelo se faz necessário, uma vez que experimentos anteriores realizados no LTA já haviam demonstrado a indução da expressão do RNAm da NO sintase induzível no fígado de camundongos DBA-2 com malária berghei, cujos níveis séricos de NO não diferiam dos animais controles. Isto ocorre porque durante o curso da malária, o óxido nítrico liberado durante a esquizogonia é “sequestrado” pela hemoglobina que circula livre no sangue (SOBOLEWSKY *et al.*, 2005).

Os resultados da quantificação do NO sérico mostraram o efeito anti-inflamatório do tratamento prolongado com a dose de 7 mg/kg da PTX, justificando o regime de tratamento utilizado neste estudo.

Para efeitos de comparação, as atividades de EROD, BROD e COH também foram avaliadas no modelo de sepse. No estudo de Poça (2013), o tratamento agudo com 200 mg/kg de PTX que reverteu a acentuada elevação do IFN, IL-6 e IL-17A, bem como do NO, provocado pela dose de 10 mg/kg de LPS, manteve reduzidas as

atividades das Cyp1a e 2b. Cyp2a5, que não foi alterada pela dose de 10 mg/kg de LPS, foi reduzida pelo tratamento combinado LPS+PTX 200 mg/kg no estudo citado.

Em conclusão, podemos sugerir que a menor dose de PTX, 1,7 mg/kg reduziu o processo inflamatório. A recuperação parcial da atividade de Cyp2b e a indução de Cyp2a5 pela maior dose de PTX poderiam reforçar a hipótese de que mediadores inflamatórios podem estar associados com a regulação de CYP durante uma resposta imune.

6 – CONCLUSÕES

Diante dos resultados aqui apresentados, podemos concluir que:

- O tratamento de cinco dias dos animais com malária berghei tratados com a menor dose de PTX, 1,7 mg/kg, comparado ao tratamento com a maior dose, de 7 mg/kg, promoveu efeitos benéficos sobre o estado clínico e o processo inflamatório da infecção.
- A menor dose de PTX não interferiu com a taxa de parasitemia, mas com a maior dose houve interação entre o tratamento e a parasitemia
- As alterações de Cyp2b e de Cyp2a5 na malária murina podem estar associadas à liberação de mediadores inflamatórios.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS AK: LICHTMAN AH. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ADHIKARI N, BURNS KE, MEADE MO. Pharmacologic treatments for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury: systematic review and meta-analysis. *Treat Respir Med*. 2004;3(5):307-28.

AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. <http://www.agencia.fiocruz.br/malaria>. Acesso em 24/09/2014.

AGER AL. Rodent malaria models. W. Peters, W.H.G. Richards (Eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin (1984), pp. 225–264.

AIKAWA M: SEED TM. Morphology of plasmodia. In: KREIER JP (ed) *Malaria*, vol 1. Academic Press, New York, 1980, p 285-344.

AITKEN AE: MORGAN ET. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(9):1687-93.

AITKEN AE, RICHARDSON TA, MORGAN ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:123-149.

AKINYINKA OO, SOWUNMI A, HONEYWELL R, RENWICK AG. The effects of acute falciparum malaria on the disposition of caffeine and the comparison of saliva and plasma-derived pharmacokinetic parameters in adult Nigerians. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000a May;56(2):159-65.

ALVARES AP, UENG TH, SCHEIBEL LW, HOLLINGDALE MR. Impairment of hepatic cytochrome P-450 dependent monooxygenases by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Mol Biochem Parasitol* 1984;3:277-282.

AMANI V, BOUBOU MI, PIED S, MARUSSIG M, WALLIKER D, MAZIER D *et al.* Cloned lines of *Plasmodium berghei* ANKA differ in their abilities to induce experimental cerebral malaria. *Infect Immun* 1998; 66: 4093-4099.

ANOLIK R, KOLSKI GB, SCHAIBLE DH, RATNER J. Transient alteration of the ophylline half-life: possible association with herpes simplex infection. *Ann Allergy* 1982, 49, 109–111.

ARVELA P, KRAUL H, STENBACK F, AND PELKONEN O. The cerium-induced liver injury and oxidative drug metabolism in DBA/2 and C57BL/6 mice. *Toxicology*69: 1–9, 1991.

ASHINO T, OGURO T, SHIODA S, HORAI R, ASANO M, SEKIKAWA K, *et al.* Involvement of interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha in CYP3A11 and 2C29 down-regulation by Bacillus Calmette-Guerin and lipopolysaccharide in mouse liver. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32(7):707-14.

AVERY MA, ALVIM-GASTON M, RODRIGUES CR *et al.* Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. 7. Direct modification of (+)-artemisinin in vivo antimalarial screening of new, potential preclinical antimalarial candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* , v. 45, p. 4321-4335, abr. 2002.

BARATA RCB. Malária no Brasil: Panorama Epidemiológico na Última Década. *Caderno de Saúde Pública* . Rio de Janeiro, 11 (1): 128-136, Jan/Mar, 1995.

BARBARA JA, VAN OSTADE X, LOPEZ A. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol. Cell Biol* 1996;74;434-43.

BARCLAY TB, PETERS JM, SEWER MB, FERRARI L, GONZALEZ FJ, MORGAN ET. Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha dependent. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Sep;290(3):1250-57.

BAROUKI R; MOREL Y. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol* 61:511–516, 2001.

BEALE GH, CARTER R E WALLIKER D. Genetics. In: *Rodent Malaria* (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.) pp 213-246. Academic Press, London, 1978.

BENET LZ, KROETZ DL, SHEINER LB. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e eliminação das drogas. In: HARDMAN JG, LIMBIRD LE, MOLINOFF PB, RUDDON RD, GILMAN AG (eds.). *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª edição. México: McGraw-Hil Interamericana, 1996.

BESHAY E, CROZE F, PRUD'HOMME GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. *Clin Immunol*. 2001;98(2):272-79.

BETHELL DB, TEJA-ISAVADHARM P, CAO XT, PHAM TT, TA TT, TRAN TN, NGUYEN TT, PHAM TP, KYLE D, DAY NP, WHITE NJ. Pharmacokinetics of oral artesunate in children with moderately severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Mar-Apr;91(2):195-8.

BIENVENU J, MONNERET G, FABIEN N, REVILLARD JP. The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(4):267-285.

BORGES TKS. Influência da Pentoxifilina na infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos em modelos susceptíveis ou não à malária cerebral. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Departamento de Operações. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Diagnóstico e tratamento no controle da malária: manual para pessoal de saúde de nível médio. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Uma análise da Situação de Saúde. Cap. 6 – Situação da prevenção e controle das doenças

transmissíveis no Brasil. Normas e Manuais Técnicos. Brasília / DF. Ministério da Saúde, 2004. 364p. tab. graf. (Série G. Estatística e Informação em Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005a. 112 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da malária no Brasil 2005. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 52 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Relatório de Situação: Amapá, 2010. Normas e Manuais Técnicos. Brasília / DF. Ministério da Saúde, 5 ed. 2011. 35p: il. color. [versão web] – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

BRIAN DE SOUZA J & RILEY EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes and Infection.* 2002;4:291-300.

BURKE MD, THOMPSON S, ELCOMBE CR, HALPERT, J, HAAPARANTA T, MAYER RT. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochemical Pharmacology*,34(18): 3337-3345, 1985.

BRODIE B, GILLETTE JR, LA DU BN. Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Annu Rev Biochem.* 1958;27:427-54.

CAMARGO EP. Malária, maleita, paludismo. *Revista Ciência e Cultura.* 2003, v. 55, n. 1, pp. 26-29. ISSN 0009-6725.

CARCILLO JA, DOUGHTY L, KOFOS D, FRYE RF, KAPLAN SS, SASSER H, BURCKART GJ. Cytochrome P450 mediated-drug metabolism is reduced in children with sepsis-induced multiple organ failure, *Intensive Care Med* 29 (2003) 980-984.

CARTER R & MENDIS KM. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Oct. 2002, p. 564–594.

CARVALHO RS, FRIEDRICH K, DE-OLIVEIRA AC, SUAREZ-KURTZ G, PAUMGARTTEN FJ. Malaria downmodulates mRNA expression and catalytic activities of CYP1A2, 2E1 and 3A11 in mouse liver. *Eur J Pharmacol* 2009;616:265-269.

CHANG KC, BELL TD, LAUER BA, CHAI H. Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet* 1, 1978, 1132–1133.

CHOMARAT P, SIPOWICZ MA, DIWAN BA, FORNWALD LW, AWASTHI YC, ANVER MR *et al.* Distinct time courses of increase in cytochromes P450 1A2, 2A5 and glutathione S-transferases during the progressive hepatitis associated with *Helicobacter hepaticus*. *Carcinogenesis* vol.18 no.11 pp.2179–2190, 1997.

CHRISTENSEN H: HERMANN M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front Pharmacol.* 2012;3:8.

CLARK IA, CHAUDHRI G. Tumor necrosis factor in malaria-induced abortion. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39: 246-249, 1988.

CLARK IA, COWDEN WB, CHAUDHRI GR. The pleiotropic effects of tumour necrosis factor in malaria. In: *Tumor necrosis factor: structure, mechanism of action, role in disease and therapy.* Bonavida B, Granger G(eds.). S.Karger, Basel, Switzerland, p. 156-161, 1990.

CLARK IA, HUNT NH, BUTCHER GA, COWDEN WB. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon or tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxyanisole. *J. Immunol.* 139, 3493, 1987.

COLLEMAN MD. "Drug Biotransformational Systems – Origins and Aims" and "How Oxidative Systems Metabolize Substrates". In: Willey & Sons Ltd, editors. *Human Drug Metabolism: An introduction*. 2007. p. 13-56.

COMBES V, COLTEL N, FAILLE D, WASSMER SC, GRAU GE. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int J Parasitol.* 2006 May 1;36(5):541-6.

CONTE FP, FIDALGO-NETO AA, MANHÃES-ROCHA DA, PAUMGARTTEN FJ, DE-OLIVEIRA AC. Activity of liver microsomal enzymes during the chronic phase of murine schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res.* 2007 May; 40(5):657-62.

COX FEG. Major animal models in malaria research: rodent. In: Wernsdorfer WH & McGregor I. *Malaria Principles and Practice of Malariology*. Churchill Livingstone, 1988, v.2. p. 1503-1543.

CRAWFORD JH, YANG S, ZHOU M, SIMMS HH, WANG P. Down-regulation of hepatic CYP1A2 plays an important role in inflammatory responses in sepsis, *Crit Care Med* 32 (2004) 502-508.

DAS BK, MISHRA S, PADHI PK, MANISH R, TRIPATHY R, SAHOO PK, RAVINDRAN B. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Tropical Medicine and International Health.* volume 8 no 8 pp 680–684 august 2003.

DAY NP, HIEN TT, SCHOLLAARDT T, LOC PP, CHUONG LV, CHAU TT *et al.* The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis,* 1999. 180(4):1288-1297.

DE-OLIVEIRA AC, DA-MATTA AC, PAUMGARTTEN FJ. *Plasmodium berghei* (ANKA): infection induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the mouse liver. *Exp Parasitol* 2006;113:256-261.

DE-OLIVEIRA AC, CARVALHO RS, PAIXÃO FHM, TAVARES HS, GUEIROS LS, SIQUEIRA CM *et al.* Up- and down-modulation of liver cytochrome P450 activities and associated events in two murine malaria models. *Malar J* 2010 Mar 22;9(1):81.

DE PAEPE P, BELPAIRE FM, BUYLAERT WA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations when treating patients with sepsis and septic shock. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(14):1135-51.

DE SOUZA JB & RILEY EM. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect*, 2002. 4(3): 291-300.

DI PERRI G, DI PERRI IG, MONTEIRO GB, BONORA S, HENNIG C, CASSATELLA M, MICCIOLO R, VENTO S, DUSI S, BASSETTI D, CONCIA E. Pentoxifylline as a supportive agent in the treatment of cerebral malaria in children. *J Infect Dis* 1995, 171:1317-1322.

DOCKRELL HM, PLAYFAIR JHL. Killing of blood-stage murine malaria parasites by hydrogen peroxide. *Infect Immun* 1983; 39: 456-459.

DOW GS, REYNOLDS JA, THOMPSON RC. *Plasmodium berghei*: in vivo efficacy of albendazole in different rodent models. *Experimental Parasitology*, 88 (1998), pp. 154–156.

DUTRA RA. Malária – Informações para profissionais da saúde. SUCEN/SP – Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo , 2001. Disponível em: http://www.sucen.sp.gov/doencas/malaria/texto_malaria.pro.htm . Acesso em: 7 de setembro de 2014.

EDWARDS G, MCGRATH CS, WARD SA, SUPANARANOND W, PUKRITTAYAKAMEE S, DAVIS TM *et al.* Interactions among primaquine, malaria infection and other antimalarials in Thai subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 1993;35:193-98.

FERREIRA DA CRUZ MF, ADAMI YW, ESPINOLA-MENDES EC, FIGUEIREDO MR, DANIEL-RIBEIRO CT. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. *Experimental Parasitology*, 94, pp. 243–247, 2000.

FOOTE SJ, IRAQI F, KEMP SJ. Controlling malaria and African trypanosomiasis: The role of the mouse. *Brief Funct Genom Proteom.* 2005;4(3):214-24.

FORSYTH JS, MORELAND TA, RYLANCE GW. The effect of fever on antipyrene metabolism in children. *Br J Clin Pharmacol* 1982, 13, 811–815.

FRANÇA TCC, DOS SANTOS MG, FIGUEROA-VILLAR JD. Malária: Aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nova* 2008; 31: 1271-1278.

GALANTAI G, GARZO T, ANTONI F, MANDL J, E BANHEGYI G. Inhibition of gluconeogenesis ureogenesis and drug oxidation by redox cyler quinone in isolated mouse hepatocytes. *Int J Biochem.* 1992 Jun;24(6):999-1002.

GARDINER DL, McCARTHY JS, TRENHOLME KR. Malaria in the post-genomics era: light at the end of the tunnel or just another train? *Post grade Med. J.* , v. 81, p. 505-509, 2004.

GARNHAM, PCC. Malária parasites and other Haemosporidia, Oxford Blackwell Scientific, Londres, 1966.

GILMORE WJ, KIRBY GM. Endoplasmic reticulum stress due to altered cellular redox status positively regulates murine hepatic CYP2A5 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Feb;308(2):600-8. Epub 2003 Nov 10.

GOOD MF, XU H, WYKES M, ENGWERDA C. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: 69-99. 17.

GOTARDO MA, HYSSA JT, CARVALHO RS, DE-CARVALHO RR, GUEIROS LS, SIQUEIRA CM *et al.* Modulation of expression and activity of cytochrome P450s and alteration of praziquantel kinetics during murine schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.106 no.2 Rio de Janeiro Mar. 2011.

GRAU GE, FAJARDO LF, PIGUET PF, ALLET B, LAMBERT PH, VASSALLI P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science* 237: 1210-1212, 1987.

GREENWOOD B: MUTABINGWA T. Malaria in 2002. *Nature*. 2002 Feb;415(7):673-76.

GUILLÉN MI, DONATO MT, JOVER R, CASTELL JV, FABRA R, TRULLENQUE R, *et al.* Oncostatin M down-regulates basal and induced cytochromes P450 in human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;285(1):127-34.

HAN J, THOMPSON P, BEUTLER B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin-induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J. Exp. Med*. 172, 391 -394, 1990.

HAU J & VAN HOOSIER GL Jr. *Handbook of Laboratory Animal Science*. 2nd Edn. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2005.

HEAR J, RAYMENT N, LANDON DN, KATZ DR, DE SOUZA JB. Immunopathology of cerebral malaria: Morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* 2000; 68: 5364-5376.

HEMMER CJ, HORT G, CHIWAKATA CB, SEITZ R, EGBRING R, GAUS W, HOGEL J, HASSEMER M, NAWROTH PP, KERN P, DIETRICH M. Supportive pentoxifylline in falciparum malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Apr;56(4):397-403.

HERNANDEZ-VALLADARES M, NAESSENS J, NAGDA S, MUSOKE AJ, RIHET P, OLE-MOIYOI OK, IRAQI FA. Comparison of pathology in susceptible A/J and resistant C57BL/6 mice after infection with different sub-strains of *Plasmodium chabaudi*. *Exper Parasitol*. 2004;108:134-41.

HOMEWOOD CA, NEAME KD. Biochemistry of malarial parasites. In: KREIER JP (ed) *Malaria*, vol 1. Academic Press, New Yor, 1980, p 346-405.

HONKAKOSKI P, AURIOLA S E LANG MA. Distinct induction profiles of three phenobarbital-responsive mouse liver cytochrome P450 isozymes. *Biochemical Pharmacology*, 43:2121-2132, 1992.

IOANNIDES C: PARKE DV. The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab Rev*. 1990;22(1):1-85.

IYER KR: SINZ MW. Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. *Chem Biol Interact*. 1999 Apr 1;118(2):151-69.

ISLAM M, FRYE RF, RICHARDS TJ, SHEITAN I, DONNELLY SS, GLUE P, *et al*. Differential effect of IFNalpha-2b on the cytochrome P450 enzyme system: a potential basis of IFN toxicity and its modulation by other drugs. *Clin Cancer Res*. 2002; 8 (8): 2480-87.

JANEWAY CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*. 2001;3:1167-71.

JI Q, ZHANG L, YANG J, XU J. Pentoxifylline Inhibits Endotoxin-Induced NF-kappa B Activation and Associated Production. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 34, no. 4, 2004.

KAMBAYASHI T, JACOB CO, ZHOU D, MAZUREK N, FONG M, STRASSMANN G. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J Immunol*. 1995 Nov 15;155(10):4909-16.

KATSURAGAWA TH, GIL LHS, TADA SM, SILVA LHP. Malária e aspectos hematológicos em moradores da área de influência dos futuros reservatórios das hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau, Rondônia, Brasil. Caderno de Saúde Pública 2009, vol.25, n.7, pp. 1486-1492. ISSN 0102-311X.

KAWAJIRI K: HAYASHI SI. CYP1 Family. *In: Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*, Ioannides, C., 1st ed, CRC Press, Boca Raton, New York, pp. 78-79, 1996.

KIRBY GM, CHEMIN I, MONTESANO R, CHRISARI FV, LANG MA, WILD CP. Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus. *Mol Carcinog*. 1994 Oct;11(2):74-80.

KIRBY GM, PELOKONEN P, VATANASAPT V, CAMUS AM, WILD CP, LANG MA. Association of liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infestation with increased expression of cytochrome P450 and carcinogen metabolism in male hamster liver. *Mol Carcinog*. 1994 Oct;11(2):81-9

KIRBY GM, NICHOLS KD, ANTENOS M. CYP2A5 induction and hepatocellular stress: and adaptive response to perturbations of heme homeostasis. *Curr Drug Metab*. 2011;12(2):186- 97.

KLAASSEN CD: WATKINS III JB. Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. 2e. Porto Alegre: AMGH, 2012. 460p.

KRAEMER MJ, FURUKAWA CT, KOUP JR, SHAPIRO GG, PIERSON WE, BIERMAN CW. Altered theophylline clearance during and influenza B outbreak. *Pediatrics* 69, 476–480.

KREMSNER PG, GRUNDMANN H, NEIFER S, SLIWA K, SAHLMÜLLER G, HEGENSCHIED B, BIENZLE U. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. *J Infect Dis* 1991, 164:605-608.

LANDAU I: BOULARD Y. Life cycles and morphology. In *Rodent Malaria* (ed. Killick-Kendrick, R. & Peters, W.), pp. 53–84. Academic Press, London, 1978.

LANG MA, JUVONEN R, JARVINEN P, HONKAKOSKI P, e RAUNIO H. 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, 1989.

LAUTERBACH R, PAWLIK D, TOMASZCZYK B, CHOLEWA B. Pentoxifylline treatment of sepsis of premature infants: preliminary clinical observations. *Eur J Pediatr* 1994, 153:672-674.

LEE BL, WONG D, BENOWITZ NL, SULLAM PM. Altered patterns of drug metabolism in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53:529–535.

LEHMAN LG, VU-QUOC B, CARLSON J, KREMSNER PG. *Plasmodium falciparum*: inhibition of erythrocyte rosette formation and detachment of rosettes by pentoxifylline. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Jan-Feb;91(1):74-5.

LELL B, KÖHLER C, WAMOLA B, OLOLA CH, KIVAYA E, KOKWARO G, WYPIJ D, MITHWANIS, TAYLOR TE, KREMSNER PG, NEWTON CR. Pentoxifylline as an adjunct therapy in children with cerebral malaria. *Malar J*. 2010 Dec 21;9:368. doi: 10.1186/1475-2875-9-368.

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

LENOBLE GM. New aspects of the pharmacology of pentoxifylline. *J Mal Vasc* 1989; 14: 35-41.

LEORATTI FMS. Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*. Dissertação: Universidade de São Paulo 2004; 1-170

LEHMAN LG, VU-QUOC B, CARLSON J, KREMSNER PG. *Plasmodium falciparum*: inhibition of erythrocyte rosette formation and detachment of rosettes by pentoxifylline. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997 Jan-Feb;91(1):74-5.

LEWIS DFV. Cytochrome P450 structure, function and mechanism *In*: Cytochromes P450 (TAYLOR & FRANCIS), 1th edition, London, Bristol, T. J. Press, 1996_a, p. 1-4.

LEWIS DFV. P450 Substrate, Specificity and Metabolism. *In*: Cytochromes P450. (TAYLOR & FRANCIS), 1th edition, London, Bristol, T. J. Press, 1996_b, p. 115-167.

LIN HI, CHU SJ, WANG D, FENG NH. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect.* 2004 Feb;37(1):8-15.

LIU X. *et al.* Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*, v.273, 1998, p.18709-19713. LIU, X. *et al.* Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*, v.273, 1998, p.18709-19713.

LOU J, LUCAS R, GRAU GE. Pathogenesis of cerebral malaria : Recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 810-820.

MANHÃES-ROCHA DA, CONTE FP, FIDALGO-NETO AA, DE-OLIVEIRA AC, RIBEIRO-PINTO LF, PAUMGARTTEN FJ. Alterations of hepatic microsomal enzymes in the early phase of murine schistosomiasis. *Acta Trop.* 2005 Jul;95(1):58-66.

MARTIGNONI M, GROOTHUIS GM, DE KANTER R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(6):875-94.

MARTINS YC, ZANINI GM, FRANGOS JA, CARVALHO LJM. Efficacy of Different Nitric Oxide-Based Strategies in Preventing Experimental Cerebral Malaria by *Plasmodium berghei* ANKA. *PLoS ONE* 7(2): e32048. doi: 10.1371/journal.pone

MASON HS, NORTH JC, VANNESTE M. Microsomal mixed-function oxidations: The metabolism of xenobiotics. *Fed. Proc.* 1965;24(5):1172-80.

MAYO PR, SKEITH K, RUSSELL AS, JAMALI F. Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50:605–613.

MCCARTHY JS, FURNER RL, VAN DYKE K, STITZEL, RE. Effects of malarial infection on host microsomal drug-metabolizing enzymes. *Biochemical Pharmacology*, 19 (4): 1341 – 1349, 1970.

MELO MLP, BRITO GAC, SOARES RC, CARVALHO SB, SILVA, JV, SOARES PMG, VALE ML, SOUZA MHL, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide.. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 12, p. 17624531, 2008.

MEYER U. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokin Biopharm* 1996;24:449-459.

MILLER KL, SILVERMAN PH, KULLGREN B, MAHLMANN LJ. Tumor necrosis factor alpha and the anemia associated with murine malaria. *Infection and Immunity* 57: 1542-1546, 1989.

MILLER LH, BARUCH DI, MARSH K, DOUMBO OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 2002. 415: 673-679.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Malária. Nota técnica nº26 CGPNM/DEVEP/SVS/MS. Situação da malária na Amazônia com ênfase nos municípios do estado do Pará. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Sistema Único de Saúde. Portal da Saúde. Ações reduzem em 31% o número de casos de Malária [Internet]. 2012 [citado mar 2012]. Disponível: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarNoticia&codConteudo=2230&codModuloArea=162&chamada=casos-de-malaria-caem-31-em-um-ano>.

MONSHOUWER M, WITKAMP RF, NIJMEIJER SM, VAN LEENGOED LA, VERNOOY HC, VERHEIJDEN JH, VAN MIERT AS. A lipopolysaccharide-induced acute phase response in the pig is associated with a decrease in hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. J Vet Pharmacol Ther. 1996 Oct;19(5):382-88.

MONTERO R, GENTILE GJ, FREDERICK L, MCMANNIS J, MURPHY T, SILVA G, BLANKESPOOR H, GENTILE JM. Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. Mutagenesis. 1999 Mar;14(2):217-20.

MORGAN ET. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? Drug Metab Dispos 2001;29:207-212.

MORGAN ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. Drug Metab Rev 1997;29(4):1129-1188.

MORGAN ET. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. Clin Pharmacol Ther 2008;85:434-438.

MORGAN ET, GORALSKI KB, PIQUETTE-MILLER M, RENTON KW, ROBERTSON GR, CHALUVADI MR, CHARLES KA, CLARKE SJ, KACEVSKA M, LID-DLE C, RICHARDSON TA, SHARMA R, SINAL CJ. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in infection, inflammation, and cancer. Drug Metab Dispos 2009, 36, 205-216.

MUNIZ-JUNQUEIRA MI, DOS SANTOS-NETO LL, TOSTA CE. Influence of tumor necrosis factor alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in vitro. Cell Immunol 2001; 208: 73-79.

MUTIS MCS, MARINEZ-ESPINOZA FE, ALBUQUERQUE BC, COURA JR. Malária. In: Coura, JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2005. p. 833-58.

MUXEL SM, DO ROSÁRIO APF, ZAGO CA, CASTILLO-MÉNDEZ SI, SARDINHA LR, RODRIGUEZ-MÁLAGA SM *et al.* The Spleen CD4⁺ T Cell Response to Blood-Stage Plasmodium chabaudi Malaria Develops in Two Phases Characterized by Different Properties. PLoS ONE July 2011;6(7):e22434.

NAHREVANIAN H, DASCOMBE MJ. Nitric oxide and reactive nitrogen intermediates during lethal and nonlethal strains of murine malaria. Parasite Immunology, v.23, 2001, p.491-501.

NELSON DR. THE CYTOCHROME P450 HOMEPAGE. HUMAN GENOMICS 4 2009;59-65.

NELSON DR, ZELDIN DC, HOFFMAN SMG, MALTAIS LJ, WAIN HM, NEBERT DW. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. Pharmacogenetics 2004;14:1-18.

NERUKAR PV, PARK SS, THOMAS PE, NIMS RW e LUBET RA. Methoxyresorufin and benziloxymethoxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. Biochemical Pharmacology, 1996, 46 (5): 933-943.

NEUNER P, KLOSNER G, SCHAUER E, POURMOJIB M, MACHEINER W, GRÜNWALD C, KNOBLER R, SCHWARZ A, LUGER TA, SCHWARZ T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. Immunology. 1994 Oct;83(2):262-27.

NEWTON CR, TAYLOR TE, WHITTEN RO. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. Am J Trop Med Hyg, 1998. 58(5):673-683.

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

ODEH M. The role of tumour necrosis factor- α in the pathogenesis of complicated *Falciparum* malaria. *Cytokine*, v.14, n.1, 7 Apr. 2001, p.11-18.

OLIVEIRA CMB *et al.* Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, Campinas, v.61, n.2, Mar./Apr. 2011.

OMURA T. Forty years of of Cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 266, Issue 3, 29 December 1999, Pages 690–698.

OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. 1964;239:2370-78.

OSHIMA-FRANCO Y; FRANCO LM. Biotransformação: importância e toxicidade. *SAÚDE REV.*, Piracicaba, 5(9): 69-76, 2003.

PALMER CJ, MAKLER M, KLASKALA WI, LINDO JF, BAUM MK, AGER AL. Increased prevalence of *Plasmodium falciparum* malaria in Honduras, Central America. *Revista Panamericana de Saúde Pública* 1998; 4(1): 40-42.

PARAENSE WL. A Fragment of malaria history. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* , Rio de Janeiro, v. 99, p. 439-422, jun. 2002.

PARKINSON A. 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, 2001, McGraw_Hill, Inc.

PASPARAKIS M, ALEXOPOULOU L, EPISKOPOU V, KOLLIAS G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184:1397-411.

PEARCE EJ, CASPAR P, GRZYCH JM, LEWIS FA, SHER A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine*, 173: 159-165, 1991.

PELKONEN P, BARTSCH H, HASWELL-ELKINS MR, YONGVANIT P(1), PHANOMSRI E, NAMWAT N, KAMPAN J *et al.* Hepatic cytochrome P450 2A6 and 2E1 status in peri-tumor tissues of patients with *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Parasitol Int.* 2012 Mar;61(1):162-66. doi: 10.1016/j.parint.2011.06.026. Epub 2011 Jul 2.

PÉREZ VG, CARMONA-FONSECA J, GONZÁLEZ FC, BUITRAGO AM, HERRERA LCB, PEÑUELA RMU. Respuesta terapéutica a mefloquina, estado nutricional y variantes alélicas del gen CYP3A4 en pacientes con malaria falciparum no complicada; Antioquia (Colombia). *Iatreia* vol.22 no.2 Medellín Apr./June 2009.

PFEFFER K, MATSUYAMA T, KÜNDIG TM, WAKEHAM A, KISHIHARA K, SHAHINIAN A, WIEGMANN K, OHASHI PS, KRÖNKE M, MAK TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993;73:457-67.

PISCITELLI SC, REISS WG, FIGG WD, PETROS WP. Pharmacokinetic studies with recombinant cytokines. Scientific issues and practical considerations, *Clin Pharmacokinet* 32 (1997) 368-381.

PLAYFAIR JHL, DE SOUZA JB, COTRELL BJ. Protection of mice against malaria by a killed vaccine: differences in effectiveness against *P. yoelii* and *P. berghei*. *Immunology* 1977;33:507-515.

POÇA KS. Regulação da Cyp2a5 hepática pelo LPS e diferenças de expressão e atividade entre linhagens de camundongos. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP)/FIOCRUZ, em 19 de Ago. de 2013.

POÇA KS, DE-OLIVEIRA AC, SANTOS MJ, PAUMGARTTEN FJ. Malaria infection modulates effects of genotoxic chemicals in the mouse bone-marrow micronucleus test. *Mutat Res.* 2008 Jan 8;649(1-2):28-33. Epub 2007 Jul 27.

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

PRADA J, PRAGER C, NEIFER S, BIENZLE U, KREMSNER PG. Production of interleukin-6 by human and murine mononuclear leukocytes stimulated with Plasmodium antigens is enhanced by pentoxifylline, and tumor necrosis factor secretion is reduced. *Infect Immun* 1993, 61:2737-2740.

PRANDOTA J. Important role of proinflammatory cytokines/other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infections/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/cytokines may markedly contribute to this pathology. *Am J Ther*. 2005 May-Jun;12(3):254-61.

PUKRITTAYAKAMEE S, LOOAREESUWAN S, KEERATITHAKUL D, DAVIS TM, TEJA-ISA VADHARM P, NAGACHINTA B *et al*. A study of the factors affecting the metabolic clearance of quinine in malaria. *Eur J Clin Pharmacol*. 1997;52(6):487-93.

RAMASAMY R. Zoonotic Malaria – Global Overview and Research and Policy Needs. *Front Public Health*. 2014; 2: 123.

RANG HP: DALE MM. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

RAUNIO H, POKELA N, PUHAKAINEN K, RAHNASTO M, MAURIALA T, AURIOLA S, *et al*. Nicotine metabolism and urinary elimination in mouse: in vitro and in vivo. *Xenobiotica*. 2008;38(1):34-47.

RELLING MV: EVANS WE. Genetic polymorphisms of drug metabolism. In: EVANS WE, SCHENTAG JJ & JUSKO WJ (eds.). *Applied Pharmacokinetics: principles of therapeutic drug monitoring*. Vancouver: Applied Therapeutics, 1992.

RENTON KW: MANNERING GJ. Depression of hepatic cytochrome P450 dependent monooxygenase systems with administered interferon inducing agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1976_a;73, 343–348.

RENTON KW: MANNERING GJ. Depression of the hepatic cytochrome P450 monooxygenase system by administered tilorone (2,7-bis(2-(diethylamino)ethoxy)fluoren-9-one dihydrochloride). *Drug Metab Dispos* 1976_b;4(3):223-231.

RENTON KW, MANNERING GJ. Depression of hepatic cytochrome P450 dependent monooxygenase systems with administered

RENTON KW. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicol* 2000;142:173-178.

RENTON KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Therap* 2001;92:147-163.

RENTON FW. Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab* 2004 Jun;5(3):235-243.

REY L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias no homem, nas Américas e na África. Ed. Guanabara Koogan 2a edição Rio de Janeiro, 1991, 731 p.

RICHARDSON TA, MORGAN ET. Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Aug;314(2):703-9. Epub 2005 Apr 28.

RICHARDSON TA, SHERMAN M, ANTONOVIC L, KARDAR SS, STROBEL HW, KALMAN D, MORGAN ET. Hepatic and renal cytochrome p450 gene regulation during citrobacter rodentium infection in wild-type and toll-like receptor 4 mutant mice. *Drug Metab Dispos*. 2006 Mar;34(3):354-60. Epub 2005 Dec 8.

RIENECK K, DIAMANT M, HAAHR PM, SCHÖNHARTING M, BENDTZEN K. In vitro immunomodulatory effects of pentoxifylline. *ImmunolLett*. 1993 Aug;37(2-3):131-38.

ROTHER J, LESSLAUER W, LÖTSCHER H, LANG Y, KOEBEL P, KÖNTGEN F, ALTHAGE A, ZINKERNAGEL R, STEINMETZ M, BLUETHMANN H. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 1993 Aug 26;364(6440):798-802.

SAITOH T, KOKUE E, SHIMODA M. The suppressive effects of lipopolysaccharide-induced acute phase response on hepatic cytochrome P450-dependent drug metabolism in rabbits. *J Vet Pharmacol Ther*. 1999 Apr;22(2):87-95.

SAN SEBASTIAN M, JATIVA R, GOICOLEA I. Epidemiology of malaria in the Amazon basin of Ecuador. *Revista Panamericana de Saú- Revista Panamericana de Saú- de Pública* 2008; 7: 24-28.

SASAKI K, ISHIKAWA-SAITOH M, TAKAYANAGI G. Effect of lipopolysaccharide (from *Escherichia coli*) on the hepatic drug-metabolizing activities in successfully LPS-treated mice. *Jpn J Pharmacol*. 1984;34(2):241-48.

SATARUG S, LANG MA, YONGVANIT P, SITHITHAWORN P, MAIRIANG E, MAIRIANG P *et al*. Induction of cytochrome P450 2A6 expression in humans by the carcinogenic parasite infection, opisthorchiasis viverrini. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Oct;5(10):795-800.

SCHOFIELD L, FERREIRA A, NUSSENZWEIG V, NUSSENZWEIG RS. Antimalarial activity of alpha tumor necrosis factor and gamma interferon. *Fed. Proc*. 46, 760, 1987.

SCHUTZ EAS. “Malária e atividade de mineração: o caso da área de influência do garimpo da terra indígena Roosevelt em Rondônia e as estratégias para a vigilância”. [Rio de Janeiro]. Dissertação – Escola Nacional de Saúde Pública e Fundação Instituto Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ). 2011, 48p.

SEWER MB, KOOP DR, MORGAN ET. Endotoxemia in rats is associated with induction of the P450 subfamily and suppression of several other forms of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos*. 1996 Apr;24(4):401-7.

SEWER MB, KOOP DR, MORGAN ET. Differential inductive and suppressive effects of endotoxin and particulate irritants on hepatic and renal cytochrome P-450 expression. J Pharmacol Exp Ther. 1997 Mar;280(3):1445-54.

SHARMA VP. Current scenario of malaria in India. Parassitologia 1999; 41: 349-353.

SHEDLOFSKY SI, ISRAEL BC, MCCLAIN CJ, HILL DB, BLOUIN RA. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. J Clin Invest 1994;94:2209–2214.

SHEDLOFSKY SI, ISRAEL BC, TOSHEVA R, BLOUIN RA. Endotoxin depresses hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism in women. Br J Clin Pharmacol 1997;43:627–632.

SHEDLOFSKY SI, TOSHEVA RT, SNAWDER JA. Depression of constitutive murine cytochromes P450 by staphylococcal enterotoxin B. Biochem Pharmacol. 2000;59:1295-303.

SILVA, L. J. O controle das endemias no Brasil e sua história. Revista Ciência e Cultura. 2003, v. 55, n. 1, pp. 44-47. ISSN 0009-6725.

SILVEIRA AC & REZENDE DF. Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária – Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2001. 120p.

SIEWERT E, BORT R, KLUGE R, HEINRICH PC, CASTELL J, JOVER R. Hepatic cytochrome P450 down- regulation during aseptic inflammation in the mouse is interleukin 6 dependent. Hepatology. 2000 Jul, 32(1):49-55.

SLIWA K, GRUNDMANN HJ, NEIFER S, CHAVES MF, SAHLMÜLLER G, BLITSTEIN-WILLINGER E, BIENZLE U, KREMSNER PG. Prevention of murine cerebral malaria by a stable prostacyclin analog. Infect Immun. 1991 Oct;59(10):3846-48

SOBOLEWSKY P, GRAMAGLIA I, FRANGOS JA *et al.* *Plasmodium berghei* resists killing by reactive oxygen species. Infection and Immunity, 2005, v.73, n.10, p.6704-6710.

STANLEY LA, ADAMS DJ, LINDSAY R, MEEHAN RR, LIAO W, WOLF CR. Potentiation and suppression of mouse liver cytochrome P-450 isozymes during the acute-phase response induced by bacterial endotoxin. *Eur J Biochem.* 1988;174(1):31-6.

STAUDINGER T, PRESTERL E, GRANINGER W *et al.* Influence of pentoxifylline on cytokine levels and inflammatory parameters in septic shock. *Intensive Care Medicine*, v.9, Sep 22, 1996, p.888-893.

STOLTENBURG-DIDINGER G, NEIFER S, BIENZLE U, ELING WM, KREMSNER PG. Selective damage of hippocampal neurons in murine cerebral malaria prevented by pentoxifylline. *J Neurol Sci* 1993, 114:20-24.

STUEHR DJ & MARLETTA MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J Immunol.* 1987 Jul 15;139(2):518-525.

SUPANAROND W, DAVIS TM, PUKRITTAYAKAMEE S, SILAMUT K, KARBWANG J, MOLUNTO P *et al.* Disposition of oral quinine in acute falciparum malaria. *Eur J Clin Pharmacol.* 1991;40(1):49-52.

SZTRYMF B, RABILLER A, NUNES H, SAVALE L, LEBREC D, LE PAPE A, DE MONTPREVILLE V, MAZMANIAN M, HUMBERT M, HERVE P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J.* 2004 May;23(5):752-8.

TAVERNE J, TAVEMIER J, FIERIS W, PLAYFAIR JHL. Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites *in vivo* but not *in vitro*. *Clinical and Experimental Immunology.* 67: 1-4, 1987.

TAYLOR-ROBINSON, A.W.; SMITH, E.C. A dichotomous role for nitric oxide in protection against blood stage malaria infection. *Immunology Letters*, 1999, v.67, p.1-9.

TANIGUCHI C & GUENGERICH FP. Metabolismo de Fármacos. In GOLAN DE, TASHIJIAN AH, ARMSTRONG EJ, ARMSTRONG AW. Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia, 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TEJA-ISAVADHARM P, WATT G, EAMSILO C, JONGSAKUL K, LI Q, KEERATITHAKUL G, SIRISOPANA N, LUESUTTHIVIBOON L, BREWER TG, KYLE DE. Comparative pharmacokinetics and effect kinetics of orally administered artesunate in healthy volunteers and patients with uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Dec;65(6):717-21.

TETRI S, RUHANEN M, VIITALA P, PELKONEN O, PASANEN M, AND RAUNIO H. Lack of association between CYP2A5 induction and apoptosis in mouse primary hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 63: 429–435, 2002.

TOMAS AM, VAN DER WEL, AM, THOMAS AW, JANSE CJ, WATERS AP. Transfection systems for animal models of malaria. *Parasitology Today*, 14, pp. 245–249, 1998.

THE WORLD HEALTH ORGANIZATION REPORT. WHO Publications, Geneva, 1997.

TRACEY KJ, CERAMI A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994: 491-503.

TRENHOLME GM, WILLAITS RL, RIECKMAN KH, FRISHER H, CARSON PE. Quinine disposition during malaria and during induced fever. *Clin Pharmacol Ther*. 1976 Apr;19:459-67.

UHL K, GRACE JM, KOCISKO DA, JENNINGS BT, MICHELL AL, BREWER TG. Effects of *Plasmodium berghei* infection on cytochromes P-450 2E1 and 3A2. *Eur J Drug Metab Pharm*. 1999;24(2):169-76.

VAN IERSEL M, WALTERS DG, PRICE RJ, LOVELL DP, LAKE BG. Sex and strain differences in mouse hepatic microsomal coumarin-7-hydroxylase activity. *Food Chem Toxicol* 1994;32:387-390.

VADIEI K, TUCKER SD, LOPEZ-BERESTEIN G, WASAN KM. Nephroprotective mechanism(s) of pentoxifylline: reduction of erythrocyte-mediated vascular congestion and inhibition of nitric oxide release. *Pharmacol Toxicol.* 1996 Mar;78(3):174-80.

YANG XX, HU ZP, CHAN SY, ZHOU SF. Monitoring drug-protein interaction. *Clin Chim Acta.* 2006;365(1-2):9-29.

WARD A, CLISSOLD SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987 Jul;34(1):50-97.

WARRELL DA, LOOAREESUWAN S, WARRELL MJ, KASEMSARN P, INTARAPRASERT R, BUNNAG D, HARINASUTA T. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. A double-blind trial in 100 comatose patients. *N Engl J Med.* 1982 Feb 11;306(6):313-19.

WARREN GW, POLOYAC SM, GARY DS, MATTSON MP, BLOUIN RA. Hepatic cytochrome P-450 expression in tumour necrosis factor-alpha receptor (p55/p75) knockout mice after endotoxin administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288(3):945-50.

WASSMER SC, CIANCIOLO GJ, COMBES V, GRAU GE. Inhibition of endothelial activation: a new way to treat cerebral malaria? *PLoS Med.* 2005 Sep;2(9):e245.

WATKINS PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterology Clinics of North America* 1992;21:511-526.

WEBER WW. The molecular basis of hereditary acetylation polymorphisms. *Drug Metab Dispos.* 1986 Jul-Aug;14(4):377-81.

WENISCH C, LOOAREESUWAN S, WILAIRATANA P, PARSCHALK B, VANNAPANN S, WANARATANA V, WERNSDORFER W, GRANINGER W. Effect of pentoxifylline on cytokine patterns in the therapy of complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 1998, 58:343-347.

WHO. Malária. <http://www.who.int/malaria/areas/treatm. t/overview/en/>. 24 de Mar de 2014. Acesso em 23 de setembro de 2014.

WHO. World Malaria Report 2013. Geneva, World Health Organization, 2013.

WILLIAMS SJ, BAIRD-LAMBERT JA, FARRELL GC. Inhibition of theophylline metabolism by interferon. *Lancet*. 1987;2(8565):939-41.

WOOD AW, CONNEY AH. Genetic variation in coumarin hydroxylase activity in the mouse (*Mus musculus*). *Science*. 1974;185(4151):612-14.

WOOD AW, TAYLOR BA. Genetic regulation of coumarin hydroxylase activity in mice. Evidence for single locus control on chromosome. *J Biol Chem*. 1979;254(13):5647-51.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Global Malaria Programme. World Malaria Report 2011. Geneva: Word Health Organization; 2011.

YANG XX, HU ZP, CHAN SY, ZHOU SF. Monitoring drug-protein interaction. *Clin Chim Acta*. 2006;365(1-2):9-29.

YOSHIOKA H, LINDBERG R, WONG G, ICHIKAWA T, ITAKURA T, BURKHART B, NEGISHI M. Characterization and regulation of sex-specific mouse steroid hydroxylases genes. *Canadian*. 1990.

XIE QW, CHO HJ, CALAYCAY J, MUMFORD RA, SWIDEREK KM, LEE TD *et al*. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992 Apr 10;256(5054):225-8.

ZHANG L, DOYON WM, CLARK JJ, PHILLIPS PEM, DANI JA. Controls of Tonic and Phasic Dopamine Transmission in the Dorsal and Ventral Striatum. *Molecular Pharmacology*, 2009 Aug;76(2): 396-404.

8 – ANEXOS

8.1 – Anexo 1