

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

“Regulação de Cyps hepáticas, Cyp2a5, 1a1/2 e 2b9/10, pelo LPS e diferenças de expressão e atividade entre linhagens de camundongos”

por

Katia Soares da Poça

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Segunda orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira

Rio de Janeiro, agosto de 2013.

Esta tese, intitulada

“Regulação de Cyps hepáticas, 2a5, 1a1/2 e eb9/10, pelo LPS e diferenças de expressão e atividade entre linhagens de camundongos”

apresentada por

Katia Soares da Poça

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

Prof.^a Dr.^a Isabella Fernandes Delgado

Prof.^a Dr.^a Karen Friedrich

Prof. Dr. Valmir Laurentino Silva

Prof.^a Dr.^a Ana Cecilia Amado Xavier de Oliveira – Segunda orientadora

Tese defendida e aprovada em 19 de agosto de 2013.

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

F739 Poça, Katia Soares da
Regulação de Cyps hepáticas, Cyp2a5, 1a1/2 e
2b9/10, pelo LPS e diferenças de expressão e atividade
entre linhagens de camundongos. / Katia Soares da
Poça. -- 2013.
xxiii,140 f. : tab. ; graf.

Orientador: Paumgarten, Francisco José Roma
Oliveira, Ana Cecília Amado Xavier de
Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde
Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2013.

1. Sistema Enzimático do Citocromo P-450.
2. Escherichia coli. 3. Pirazol. 4. Citocinas. I. Título.

CDD – 22.ed. –

614.57

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por tudo que conquistei até agora, mas peço a Ele para me dar sabedoria para continuar a aprender e conquistar muito mais.

À minha família (**Sonia, Alessandra, Rafael, Erique e Giselle**) por todo apoio e incentivo em mais esta etapa de minha vida.

Ao meu amor **Antonio Vieira**, pelo companheirismo e compreensão, inclusive nos momentos de mau humor ou falta de tempo.

Às amigas **Deise Coelho, Bruna Leal, Hellen Leal, Karla Dames e Marcia Sarpa** por toda ajuda, companheirismo, bons momentos, risadas e desabafos durante todos estes anos de amizade.

As novas amigas que vieram durante a realização do Doutorado no Laboratório de Toxicologia Ambiental (FIOCRUZ). **Nathalia Moura, Carolina Morse, Maria Helena e Gabriela Souza**, conhecer vocês acrescentou bons frutos que levarei por toda a minha vida.

Ao aluno de I.C. **Lucas Chagas** pela ajuda na determinação das transaminases séricas.

A todos os amigos do Laboratório de Toxicologia Ambiental, mas em especial a **Rose Carvalho, Regina Gomes-Carneiro e Otávio** pelas conversas, companhia e congressos compartilhados.

Ao amigo **Thiago Parente** pela ajuda na realização do qPCR e a todos do Laboratório BioMa (UFRJ) por serem receptivos e me permitirem usar as dependências para a realização das análises.

Ao pesquisador **Paulo Totino** do Laboratório de Pesquisas em Malária (IOC / FIOCRUZ) pela orientação e ajuda durante a dosagem das citocinas.

As pesquisadoras **Adriana Hamond Regua Mangia** e **Rosimery Duarte** do Laboratório de Epidemiologia Molecular (DCB / FIOCRUZ) por ceder espaço no laboratório para a realização de uma das etapas de preparação da fração microssomal.

A todos do **Pavilhão Leônidas Deane** (IOC / FIOCRUZ) pelo uso da sala comum onde se encontra a ultracentrifuga.

À pesquisadora **Ana Cecília De-Oliveira**, pois sempre esteve presente e disposta a ajudar em todos os momentos. Ter você como co-orientadora foi muito importante.

Ao orientador **Francisco Paumgartten** pelos ensinamentos durante todos estes anos de vida científica.

O sonho

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

Clarice Lispector

RESUMO

Nas últimas quatro décadas estudos mostram que inflamações e infecções modulam a expressão e atividade de enzimas citocromo P450 (CYP). A modulação negativa das atividades de CYPs hepáticas é o efeito mais frequente, mas a regulação positiva também tem sido relatada. Entretanto, os mecanismos pelos quais estímulos inflamatórios e infecções modulam a expressão e a atividade destas enzimas de biotransformação permanecem obscuros. Este estudo foi conduzido para ajudar a esclarecer os mecanismos pelo quais Cyp2a5, 1a1/2 e 2b9/10 são reguladas no tecido hepático quando a resposta imune é ativada. Na primeira parte do trabalho, avaliamos a expressão e atividade constitutiva e induzida de Cyp2a5 em camundongos fêmeas adultas de oito linhagens/colônias. Possíveis relações da indução de Cyp2a5 com a expressão aumentada da *heme-oxigenase 1* (HO-1) e dano hepático também foram investigadas. Níveis de mRNA da *Cyp2a4/5* e *hmx-1* no tecido hepático foram determinados por qPCR, enquanto as atividades da COH (Cyp2a5), EROD (Cyp1a1/2) e BROD (Cyp2b9/10) foram avaliadas em microsomos hepáticos, e a toxicidade hepática provocada pelo tratamento com os indutores examinada medindo os níveis séricos de transaminase (ALT). Os resultados mostraram que os níveis constitutivos da atividade de Cyp2a5 variaram acentuadamente entre as linhagens, sendo a atividade mais elevada registrada em DBA-2, mas os níveis constitutivos de mRNA de *Cyp2a4/5* e a expressão de HO-1 não apresentaram grandes variações. O pirazol (PIR) induziu a expressão e atividade de Cyp2a5 em todas as linhagens, o fenobarbital (FEN) apenas no DBA-2, enquanto a expressão de HO-1 não foi alterada pelos tratamentos. Em contraste com o observado com Cyp2a5, as atividades constitutivas de Cyp1a1/2 e 2b9/10 exibiram apenas discretas variações entre as linhagens. O PIR praticamente não teve efeito sobre EROD e BROD, mas o FEN regulou positivamente as atividades de Cyp1a1/2 e 2b9/10. A hepatotoxina PIR induziu a expressão e atividade de Cyp2a5 em doses em que não provocou qualquer aumento de ALT. Na segunda parte do trabalho, avaliamos os efeitos do LPS sobre a atividade de Cyp2a5, 1a1/2 e 2b9/10 em fêmeas DBA-2, e investigamos se o bloqueio da resposta inflamatória, com a administração concomitante de pentoxifilina (PTX), atenuaria ou aboliria os efeitos do LPS. Os resultados mostraram que o LPS deprimiu as atividades de Cyp1a1/2 e 2b9/10 apenas em doses altas, mas o efeito sobre a atividade de Cyp2a5 seguiu uma curva dose-resposta não linear e não monotônica (forma de “U”, com depressão em doses baixas, retornando aos níveis basais com as doses mais altas). A atenuação do aumento da produção de citocinas e NO pelo co-tratamento LPS e PTX não alterou os efeitos da endotoxina sobre as atividades de Cyp1a1/2 e 2b9/10, sugerindo que a regulação negativa não depende do aumento dos níveis de NO e citocinas no sangue. O co-tratamento, todavia, modificou os efeitos relacionados à dose de LPS sobre a atividade de Cyp2a5: a depressão pelas doses baixas de LPS foi mantida, mas prolongou-se a extensão da faixa de doses em que o LPS causa depressão de COH, mostrando que o co-tratamento pareceu abolir a volta aos níveis quase basais de atividade de Cyp2a5 notado em doses altas. Por outro lado, o bloqueio da produção de NO pelo co-tratamento com LPS e aminoguanidina (Ag, inibidor seletivo de NOS2) mostrou que o retorno da atividade de Cyp2a5 aos níveis basais em doses altas de LPS foi abolido. A partir dos resultados aqui apresentados, é possível supor que os níveis aumentados de NO de alguma forma deflagram a transição da regulação negativa para a positiva da atividade de Cyp2a5.

Palavras-chave: Sistema Enzimático do Citocromo P-450, *Escherichia coli*, Pirazol e Citocinas.

ABSTRACT

A number of studies conducted during the last four decades have shown that inflammations and infections modulate the expression and activity of cytochrome P450 (CYP) enzymes. The down-modulation of CYP activities in the liver is by far the most frequently described effect, yet the up-regulation of a few CYP isoforms has been reported as well. Nonetheless, the mechanisms by which inflammatory stimuli and infections modulate xenobiotic biotransformation enzymes remain largely unclear. This study was undertaken to shed light on the mechanisms through which liver Cyp2a5, 1a1/2 and 2b9/10 are regulated when the immune response is activated. First of all, the constitutive and induced (by pyrazole, PYR, or Phenobarbital, PB) expression and activity of Cyp2a5 in adult female mice from eight strains/breeding stocks were evaluated. Possible relations of Cyp2a5 induction with enhanced expression of *heme-oxygenase 1* (HO-1) and liver injury were also investigated. Levels of *Cyp2a4/5* and *hmox-1* mRNA in the liver tissue were determined by qPCR while activities of COH (Cyp2a5), EROD (Cyp1a1/2) and BROD (Cyp2b9/10) were assessed in hepatic microsomes. Liver toxicity due to treatment with COH inducers was examined by measuring serum transaminase levels (ALT). Results showed that constitutive Cyp2a5 activity markedly varied among the mouse strains, being the highest activity recorded in the DBA-2. Surprisingly, constitutive levels of mRNA *Cyp2a4/5* and expression of HO-1 did not exhibit marked inter-strain variations. PYR induced Cyp2a5 expression and activity in all strains and PB enhanced COH in most strains. Induction of both Cyp2a5 expression and activity by PB, however, was found only among mice of the DBA-2 strain, while HO-1 expression was not enhanced either by PYR or PB in any strain. Constitutive EROD and BROD activities exhibited only minor inter-strain variations. PYR had virtually no effect on EROD and BROD while PB up-regulated both activities in all strains. Results also showed that PYR, albeit being a hepatotoxin at high doses, induced expression and activity of Cyp2a5 at doses that did not elicit any increase in ALT. In the second part of this study, the effects of a broad range of LPS doses on the activities of Cyp2a5, 1a1/2 and 2b9/10 in female DBA-2 mice was evaluated. Moreover, the effect of blockage of inflammatory response elicited by LPS (enhanced production of cytokines and NO serum levels) with co-administration of pentoxifylline (PTX) on the regulation of Cyp activities was investigated. Results demonstrated that LPS depressed Cyp1a1/2 and 2b9/10 activities only at (high) dose levels that also markedly increased serum levels of CK and NO. It was also found that effects of LPS on Cyp2a5 activity were described by a non-linear non-monotonic dose-response curve ("U"-shaped, with COH activity depressed at low doses). EROD and BROD activities in the liver remained virtually unchanged after depression of CK and NO serum levels by the co-treatment, showing that down-modulation of Cyp1a and 2b isoforms by LPS does not depend on their increase in the blood. However, PTX modified the dose-related effects of LPS on the Cyp2a5 activity: no change was noted on the LPS low dose range-caused depression of COH activity, but the co-treatment extended its depression to the high dose range as well, suggesting that PTX abolished the return to near basal levels of Cyp2a5 activity noted at high doses of LPS. Moreover, NO overproduction by LPS was blocked by the co-treatment with aminoguanidine (Ag, a NOS2 selective inhibitor). NO blockage by the co-treatment showed that Cyp2a5 activity return to near basal levels at high doses of LPS was abolished. From the results presented here, a hypothesis can be advanced that increased NO levels in some way trigger the transition of down- to up-regulation of Cyp2a5 activity.

Keywords: Enzymatic System of Cytochrome P-450, *E. coli*, Pyrazole and Cytokines.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – Introdução Geral	1
<i>1.1. Citocromo P450</i>	<i>2</i>
<i>1.1.1. CYP1A</i>	<i>3</i>
<i>1.1.2. CYP2A</i>	<i>3</i>
<i>1.1.3. CYP2B</i>	<i>4</i>
<i>1.2. Cyp2a5 murina</i>	<i>4</i>
<i>1.3. Processos que desencadeiam lesão hepática e regulação de Cyp2a5</i>	<i>5</i>
<i>1.4. Mediadores inflamatórios e modulação de CYP</i>	<i>7</i>
<i>1.5. Justificativa do estudo</i>	<i>10</i>
<i>1.6. Objetivos do estudo</i>	<i>11</i>
CAPÍTULO II – Atividades e expressão constitutivas e regulação do Citocromo P4502A5 por substâncias químicas em fígados de diferentes linhagens de camundongos	13
<i>2.1. Introdução</i>	<i>14</i>
<i>2.2. Objetivos</i>	<i>17</i>
<i>2.2.1. Objetivo geral</i>	<i>17</i>
<i>2.2.2. Objetivos específicos</i>	<i>17</i>
<i>2.3. Materiais e métodos</i>	<i>18</i>
<i>2.3.1. Animais</i>	<i>18</i>
<i>2.3.2. Desenho experimental</i>	<i>18</i>
<i>2.3.3 Morte dos animais, coleta do sangue e fígado</i>	<i>21</i>
<i>2.3.4. Determinação do mRNA por qPCR em tempo real</i>	<i>21</i>
<i>2.3.4.1 Extração e quantificação de RNA</i>	<i>21</i>
<i>2.3.4.2. Eletroforese em gel de agarose</i>	<i>22</i>

2.3.4.3. <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	22
2.3.4.4. <i>Quantificação dos níveis de mRNA por qPCR</i>	23
2.3.5. <i>Preparo da fração microsomal hepática</i>	24
2.3.6. <i>Quantificação de proteínas</i>	24
2.3.7. <i>Determinação das atividades enzimáticas</i>	25
2.3.7.1. <i>Cumarina 7-hidroxilase (COH)</i>	25
2.3.7.2. <i>Alcoxi-resorufina-O-desalquilases: EROD e BROD</i>	26
2.3.8. <i>Determinação de alanina aminotransferase (ALT)</i>	26
2.3.9. <i>Análise estatística</i>	27
2.4. <i>Resultados</i>	28
2.4.1. <i>Expressão hepática da Cyp2a5 nas diferentes linhagens</i>	28
2.4.2. <i>Alterações concomitantes na expressão da hmoX-1 e Cyp2a4/5</i>	29
2.4.3. <i>Atividade da cumarina 7-hidroxilase nas diferentes linhagens</i>	32
2.4.4. <i>Atividade da alcoxiresorufina-O-dealquilase nas diferentes linhagens</i>	34
2.4.5. <i>Indução da atividade da CYP4A5 e hepatotoxicidade</i>	37
2.5. <i>Discussão</i>	39
2.6. <i>Conclusões</i>	43

CAPÍTULO III – Efeito do bloqueio da resposta inflamatória com pentoxifilina sobre a regulação negativa de citocromos P450 (Cyp 2a5, 1a1/2 e 2b9/10) produzida pelo LPS.

3.1. <i>Introdução</i>	46
3.1.1. <i>Regulação da expressão e atividade de CYPs na infecção e inflamação</i>	46
3.1.2. <i>Regulação de CYP por citocinas inflamatórias</i>	47
3.1.3. <i>Regulação da expressão e atividade de CYPs pelo óxido nítrico</i>	52
3.1.4. <i>Regulação de Cyp2a5/2A6 na resposta inflamatória</i>	53
3.1.5. <i>Inibição farmacológica da resposta inflamatória</i>	56
3.1.5.1. <i>Inibição da síntese de citocinas</i>	56

3.1.5.2. <i>Inibição da produção do NO</i>	58
3.2. <i>Objetivos</i>	60
3.2.1. <i>Objetivo Geral</i>	60
3.2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	60
3.3. <i>Materiais e Métodos</i>	61
3.3.1. <i>Animais</i>	61
3.3.2. <i>Experimento para avaliar o efeito do co-tratamento com pentoxifilina sobre a modulação da atividade de CYPs pelo LPS</i>	61
3.3.2.1 <i>Soluções</i>	62
3.3.2.1.1 <i>Diluição do LPS</i>	62
3.3.2.1.2 <i>Solução de pentoxifilina (PTX)</i>	62
3.3.3. <i>Experimento para avaliar o efeito do bloqueio da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) sobre a modulação da atividade de Cyps pelo LPS</i>	64
3.3.3.1. <i>Soluções</i>	64
3.3.3.1.1. <i>Solução de aminoguanidina</i>	64
3.3.4. <i>Eutanásia dos animais, coleta de sangue e fígado</i>	65
3.3.5. <i>Determinação dos níveis de citocinas no soro sanguíneo</i>	66
3.3.6. <i>Quantificação dos níveis de óxido nítrico no soro</i>	66
3.3.6.1 <i>Curva padrão de nitrito</i>	66
3.3.6.2. <i>Curva padrão de nitrato</i>	67
3.3.6.3. <i>Quantificação de nitrito nas amostras de soro</i>	67
3.3.7. <i>Preparo da fração microsomal hepática</i>	67
3.3.8. <i>Quantificação de proteínas na fração microsomal</i>	68
3.3.9. <i>Determinação das atividades enzimáticas</i>	68
3.3.9.1. <i>Cumarina 7-hidroxilase (COH)</i>	68
3.3.9.2. <i>Alcoxi-resorufina-O-desalquilases: EROD e BROD</i>	68
3.3.10. <i>Análise estatística</i>	69
3.4. <i>Resultados</i>	70
3.4.1. <i>Efeito do tratamento com a pentoxifilina e bloqueio da produção de citocinas sobre a modulação da atividade de Cyp2a5 pelo LPS</i>	70
3.4.1.1. <i>Determinação dos níveis séricos de citocinas</i>	70

3.4.1.2. <i>Produção de NO e atividade de monooxigenases hepáticas</i>	77
3.4.2. <i>Efeito da inibição da produção de óxido nítrico (bloqueio da NO sintase induzível: NOS2) sobre a atividade de Cyp2a5</i>	85
3.5. <i>Discussão</i>	87
3.5.1. <i>Resultados deste estudo face ao encontrado na literatura</i>	90
3.6. <i>Conclusões</i>	95
3.6.1. <i>Conclusões pontuais</i>	95
3.6.2. <i>Conclusões gerais</i>	97
CAPÍTULO IV – Síntese final e perspectivas	98
4. <i>Síntese final e perspectivas</i>	99
CAPÍTULO V – Referências Bibliográficas	101
CAPÍTULO VI – Anexos	116
6.1. <i>Anexo 1</i>	117
6.2. <i>Anexo 2</i>	125

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** – Gel de RNA. Presença de duas bandas referentes às subunidades (18S e 28S). 28
- Figura 2.2.** – Quantificação relativa do mRNA Cyp2a4/5 e hmox-1 do fígado de camundongos nas diferentes linhagens. 29
- Figura 2.3.** – Efeitos do pirazol (PIR, 100 mg / kg / dia) e fenobarbital (FEN, 80 mg / kg / dia) sobre os níveis do mRNA do *Cyp2a4/5* hepático nas diferentes linhagens. 30
- Figura 2.4.** – Efeitos do pirazol (PIR, 100 mg / kg / dia.) e fenobarbital (FEN, 80 mg / kg / dia) sobre os níveis do mRNA do *hmox-1* hepático nas diferentes linhagens. 31
- Figura 2.5.** – Atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5) na fração microsomal de diferentes linhagens de camundongos. 33
- Figura 2.6.** – Atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD, Cyp1a1/2) na fração microsomal de diferentes linhagens de camundongos. 35
- Figura 2.7.** – Atividade da benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD, Cyp2b9/10) na fração microsomal de diferentes linhagens de camundongos. 36
- Figura 2.8.** – Níveis séricos da transaminase alanina transferase (ALT), nas diferentes linhagens, após tratamento com pirazol (PIR, 100 mg / kg / dia.) e fenobarbital (FEN, 80 mg / kg / dia). 38
- Figura 3.1.** – Níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF e IFN- γ (pg/mL) nas amostras de soro de animais tratados com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal). 71

Figura 3.2. – Níveis de IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF e IFN- γ (pg/mL) nas amostras de soro de animais tratados com PTX e LPS. 73

Figura 3.3. – Níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17A (pg/mL) em animais tratados com PTX e LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e suas combinações. 75

Figura 3.4. – Níveis séricos de IL-2, IL-4 e IL-10 (pg/mL) nos animais tratados apenas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e com LPS + PTX (2x100 mg/kg de peso corporal). 76

Figura 3.5. – Alterações da concentração sérica de nitrito (μ M) e das atividades (pmol/mg ptn/ min) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases no fígado de camundongos DBA-2 tratados com LPS (0,05 a 20 mL/kg de peso corporal). 78

Figura 3.6. – Alterações da concentração sérica de nitrito (μ M) e das atividades (pmol / mg ptn / min) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases nos fígado de camundongos DBA-2 tratados com PTX (2x100 mg/kg de peso corporal) e LPS (0,05 a 20 mL/kg de peso corporal). 80

Figura 3.7. – Alterações da concentração sérica de nitrito (μ M) e das atividades (%) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados de camundongos DBA-2. 81 e 82

Figura 3.8. – Alterações das atividades da COH (Cyp2a5), EROD (Cyp1a1/2) e BROD (Cyp2b9/10) nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com PTX nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg de peso corporal. 84

Figura 3.9. – Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi-(BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases nas frações microssomais de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (a) (50 e 100 mg/kg de peso corporal) e aminoguanidina + LPS (aL).

86

LISTA DE TABELAS E QUADOS

- Tabela 1.1.** – Efeito de diversas citocinas sobre a expressão (mRNA ou proteína) e a atividade *in vitro* de enzimas CYP450. 9
- Tabela 2.1.** – Número de animais (N) analisado por qPCR por grupo de tratamento e por linhagem. 19
- Tabela 2.2.** – Número de animais (N) analisado por grupo de tratamento e por linhagem. 20
- Quadro 2.1.** – Genes alvo e de referência da qPCR e respectivos códigos do fabricante. 23
- Tabela 3.1.** – Efeito do tratamento com pentoxifilina sobre os níveis séricos de citocinas, NO e atividade de de Cyp2a5, Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 pelo LPS. Número de animais (N) por grupo e determinação. 63
- Tabela 3.2.** – Efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) sobre a atividade das CYPs. Número de animais (N) por grupo e determinação 65

LISTA DE TABELAS E FIGURAS DO ANEXO

Tabela 6.1. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos BALBc/An (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

117

Tabela 6.2. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos B6D2F1 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

117

Tabela 6.3. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos CBA (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

118

Tabela 6.4. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

118

Tabela 6.5. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos C57BL/10 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

119

Tabela 6.6. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos DBA-1 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

119

Tabela 6.7. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

120

Tabela 6.8. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos Swiss Webster (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80mg/kg).

120

Tabela 6.9. – Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

121

Tabela 6.10. – Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

122

Tabela 6.11. – Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

123

Tabela 6.12. – Níveis de ALT (média±EPM) no soro de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg).

124

Tabela 6.13. – Pesos nos dias do tratamento (D0), no dia da morte (D1) e pesos dos fígados (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

125

Tabela 6.14. – Pesos nos dias do tratamento (D0), no dia da morte (D1) e pesos dos fígados (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com PTX na dose de 100 mg/kg e 200 mg/kg.

126

Tabela 6.15. – Atividades de COH, EROD e BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com PTX na dose de 100 mg/kg e 200 mg/kg.

126

Tabela 6.16. – Níveis séricos das citocina (média±EPM) pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-17A) em camundongos DBA-2 fêmeas tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corpora)l e combinação de PTX + LPS.

127

Tabela 6.17. – Níveis séricos das citocinas (média±EPM) anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) em camundongos DBA-2 fêmeas tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

128

Tabela 6.18. – Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

129

Figura 6.1. – Alterações da concentração sérica de nitrito (μ M) em camundongos DBA-2 tratados com LPS (0,05 a 20 mL/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

130

Tabela 6.19. – Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

131

Figura 6.2. – Alterações da atividade (pmol umbeliferona / mg ptn / min) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), nos fígados de camundongos DBA-2 tratados com LPS (0,05 a 20 mL/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

132

Tabela 6.20. – Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

133

Figura 6.3. – Alterações da atividade (pmol resorufina / mg ptn / min) da etoxi-resorufina-*O*-desalquilase (EROD, Cyp1a1/2), nos fígados de camundongos DBA-2

tratados com LPS (0,05 a 20 mL/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

134

Tabela 6.21. – Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

135

Figura 6.4. – Alterações da atividade (pmol resorufina / mg ptn / min) da benziloxi-resorufina-*O*-desalquilase (BROD, Cyp2b9/10), nos fígados de camundongos DBA-2 tratados com LPS (0,05 a 20 mL/kg de peso corporal) e combinação de PTX + LPS.

136

Tabela 6.22. – Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D1) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (50 ou 100 mg/kg de peso corporal) e suas combinações (Ag + LPS).

137

Tabela 6.23. – Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (50 ou 100 mg/kg de peso corporal) e suas combinações (Ag + LPS).

137

Tabela 6.24. – Atividade de COH, (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (50 e 100 mg/kg de peso corporal) e suas combinações (Ag + LPS).

138

Tabela 6.25. – Atividade de EROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (50 e 100 mg/kg de peso corporal) e suas combinações (Ag + LPS).

138

Tabela 6.26. – Atividade de BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (50 e 100 mg/kg de peso corporal) e suas combinações (Ag + LPS).

139

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Ag – aminoguanidina
- AHH – *aryl hydrocarbon hydroxylase* (hidrocarboneto aril hidroxilase)
- ALT – alanina aminotransferase
- AhR/ARNT – *aryl hydrocarbon receptor / aryl hydrocarbon nuclear translocator receptor* (aril hidrocarboneto / translocador do receptor nuclear de aril hidrocarboneto)
- B(α)P – benzo- α -pireno
- BALB/c – linhagem BALB/cAn
- BCG – Bacillus Calmette Guérin
- BR – bilirrubina
- BROD – benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase
- BV – biliverdina
- B6 – linhagem C57BL/6
- B10 – linhagem C57BL/10
- CAR – *constitutive androstane receptor* (receptor androstano constitutivo)
- CECAL - Centro de Criação de Animais de Laboratório
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CK – *Cytokine* (citocina)
- Clearance* – do inglês, depuração plasmática
- COH – cumarina 7-hidroxilase
- CON – controle
- CPT-11 - irinotecan
- Cyp/CYP – *Cytochrome P450* (Citocromo P450)
- D1 – linhagem DBA-1
- D2 – linhagem DBA-2
- ECOD – etoxicumarina-*O*-desetilase
- EPM – erro padrão da média
- ERO – espécies reativas de oxigênio
- EROD – etoxiresorufina-*O*-desetilase
- et al.* – *et alli* (e outros)
- e.g.* – *exempli gratia* (exemplo)
- FEN – fenobarbital sódico

FI – fator de indução
F1 – linhagem B6D2F1
grp78 – *glucose regulated protein 78* (proteína 78 regulada pela glicose)
GST – Glutathione S-transferase
HBV – *hepatitis B virus* (vírus da hepatite B)
Hepa 1 – célula de hepatoma murino
hmx-1 / HO-1 – heme-oxigenase 1
i.e. – *id est* (isto é)
IL – interleucina, as mais diversas (*e.g.*, IL-1, IL-6; IL-10, outras)
INF- γ – interferom gama
iNOS – óxido nítrico sintase induzível, também chamada de NOS2
i.p. – intra-peritoneal
KO – *knockout*
L-NAME – N^o-nitro-L-arginina metil éster
LPS – lipopolissacarídeo
mdr1 – multidrug resistance protein 1
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NDEA – N-nitrosodietilamina
NEED – N-1-naftilenodiamino
NF-kB – fator nuclear kappa-B
NNN – N^o-nitrosornicotina
NO – óxido nítrico
NOS2 – NO-sintase induzível, também chamada de iNOS
Nrf2 – *nuclear factor erythroid-derived factor 2* (fator nuclear derivado de eritróide 2)
HPA – hidrocarboneto policíclico aromático
PBS – *phosphate buffer solution* (tampão fosfato de potássio)
PCN – do inglês *pregnenolone-16alpha-carbonitrile*
per se – por si
PIR – pirazol
pmol - picomoles
PTX - pentoxifilina
PXR – *pregnane X receptor* (receptor *pregnane X*)
RE – retículo endoplasmático

RFA – resposta de fase aguda
rhTNF – fator de necrose tumoral recombinante humano
rIL-2 – interleucina 2 recombinante
ROIs – *reactive oxygen intermediates* (intermediários reativos de oxigênio)
RT-PCR – *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa)
RXR α – *retinoid X receptor* (α retinóide-X)
SDS – *sodium dodecyl sulphate* (dodecil sulfato de sódio)
SW – linhagem Swiss Webster
TCPOBOP – *(1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene((1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benzeno)*
TBS – *Tris buffer solution* (Solução Tampão Tris)
TGF – fator de crescimento tumoral
TNF – fator de necrose tumoral
UI – unidade internacional
UGT – Uridina difosfato glicuronosiltransferase
WT – *wild type* (tipo selvagem)

CAPÍTULO I
Introdução Geral

1.1. CITOCROMO P450

As enzimas metabolizadoras de xenobióticos estão presentes em todos os seres vivos e distribuídas em virtualmente todos os tecidos, como fígado, intestino, pulmão, coração, cérebro, supra-renal, placenta e outros. Elas exercem importante papel na manutenção do estado homeostático, participando da síntese e catabolismo de hormônios esteróides, ácidos biliares e ácidos graxos, e do metabolismo de xenobióticos, como fármacos, poluentes ambientais, aditivos alimentares e toxinas, principalmente aquelas substâncias com alto caráter lipofílico (Parkinson, 2001).

As principais enzimas metabolizadoras de xenobióticos são os citocromo P450, que foram assim denominadas por absorverem luz a um comprimento de onda de 450 nm quando ligadas ao monóxido de carbono, após redução pelo ditionito de sódio (Omura & Sato, 1964). Essencialmente, a função primária destas enzimas é promover a biotransformação dos xenobióticos em metabólitos com um maior caráter hidrofílico, para que assim possam ser mais facilmente eliminadas pelos rins, através da urina e pela bile, através das fezes. A transformação se deve ao fato de que os agentes lipofílicos podem ser estruturalmente alterados, com modificação das suas propriedades físico-químicas, facilitando a sua solubilidade em água.

As enzimas Citocromo P450 (CYP), também conhecidas como monooxigenases, são hemeoproteínas que pertencem a uma grande família de enzimas com similaridade estrutural e no modo de ação, sendo divididas em famílias e subfamílias, de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos. Quando a similaridade é superior a 40%, diz-se que as enzimas pertencem à mesma família, e são representadas com um número arábico depois do símbolo CYP, *e.g.*: CYP1, CYP2, CYP3. Quando a similaridade é superior a 55%, diz-se que elas pertencem à mesma subfamília, e são representadas com uma letra após o número arábico, *e.g.*: CYP1A, CYP2A, CYP3A. As formas individuais ou isoformas são representadas por outro número arábico após a letra; por exemplo, CYP2A6 é a isoforma 6 da subfamília 2A encontrada no fígado de seres humanos. A sigla CYP quando representa as enzimas murinas, é escrita com letras minúsculas (exceto o C de citocromo), *e.g.*, Cyp2a5. 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 1, 2 e 3 são as principais responsáveis pelo

metabolismo de xenobióticos, embora participem da conversão metabólica de compostos endógenos em menor escala (Martignoni *et al.*, 2006).

Os CYP450 têm grande importância para a terapêutica medicamentosa, pois são responsáveis pela biotransformação de muitos medicamentos. Desta forma, diversos fatores, intrínsecos e/ou extrínsecos, com capacidade de modular estas enzimas são responsáveis por variações na eficácia terapêutica e em possíveis efeitos tóxicos ao organismo.

1.1.1. CYP1A

Esta é uma subfamília de grande importância para a saúde pública, pois as suas isoformas são responsáveis pelo metabolismo de pré-carcinógenos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), *e.g.*, benzo[a]pireno. As isoformas CYP1A1 e CYP1A2 desta subfamília 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).

A isoforma CYP1A1 apresenta baixa expressão hepática. Acredita-se que a sua expressão só seja detectada após indução, já que metaboliza o benzo[a]pireno e outros HPA, xenobióticos absorvidos, em geral, através do trato gastrointestinal e respiratório. A CYP1A2 é expressa basicamente 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, planta da família das crucíferas (*e.g.*, brócolis e couve de Bruxelas) e carne grelhada, e pelos medicamentos omeprazole e nafcilina. CYP1A2 representa 13% das CYP hepáticas humanas (Shimada *et al.*, 1994 *apud* Yang *et al.*, 2006).

1.1.2. CYP2A

Cerca de 18 a 30% de todos os CYP humanos pertencem a esta subfamília. A CYP2A é responsável por metabolizar hormônios sexuais, e sua expressão varia com o gênero (Colleman, 2007). As isoformas presentes na espécie humana são CYP2A6, 2A7 e 2A13. A CYP2A6 é expressa no fígado e responsável por cerca de 4% das enzimas

hepáticas (Shimada *et al.*, 1994 *apud* Yang *et al.*, 2006). Nos camundongos, as isoformas hepáticas são representadas por Cyp2a4, Cyp2a5, Cyp2a12 e Cyp2a22 (Martignoni *et al.*, 2006). Nos ratos, CYP2A1 e CYP2A2 são isoformas hepáticas, e CYP2A3 é expressa no esôfago e mucosa nasal (Ribeiro Pinto *et al.*, 2001; Robottom-Ferreira *et al.*, 2003). CYP2A6 humano, CYP2A13 do rato e o Cyp2a5 murino são ortólogos. CYP2A6 e Cyp2a5 apresentam alta similaridade, diferindo em apenas 11 aminoácidos (Guengerich, 1997).

O CYP2A6 humano apresenta grande importância para a saúde pública por ser responsável pelo metabolismo da nicotina e cotinina e dos pré-carcinógenos aflatoxina e nitrosaminas, podendo ser induzido por xenobióticos, como fenobarbital, rifampicina, dexametasona e nicotina (Su & Ding, 2004). CYP2A6 pode ser inibido pelo letrozol e pilocarpina, e de forma irreversível pelo 8-metoxipsoralem (Parkinson, 2001).

1.1.3. CYP2B

Em humanos, as isoformas CYP2B6 e CYP2B7 são encontradas tanto no fígado quanto em tecidos extra-hepáticos. As isoformas encontradas em camundongos são Cyp2b9 e Cyp2b10 (Martignoni *et al.*, 2006).

As enzimas humanas são responsáveis pelo metabolismo de fármacos anti-neoplásicos, como ciclofosfamida, anestésicos como propofol e substâncias pró-carcinógenas, como aflatoxina B1 e dibenzoantraceno. Não obstante, o fenobarbital é um potente indutor desta subfamília (Colleman, 2007). CYP2B6 representa 2% das CYP hepáticas humanas (Shimada *et al.*, 1994 *apud* Yang *et al.*, 2006).

1.2. Cyp2a5 murina

Cyp2a5, como CYP2A6, é responsável pela ativação das nitrosaminas pré-carcinógenas N'-nitrosornicotina (NNN) e N-nitrosodietilamina (NDEA) presentes na fumaça do tabaco, e inibido pelo metoxsalem (8-metoxipsoralem) (Yamazaki *et al.*, 1992; Raunio *et al.*, 2008; Visoni *et al.*, 2008).

As atividades de CYP e de algumas enzimas de conjugação, da fase 2 do metabolismo, também são reguladas por agentes biológicos (Morgan, 1997). Alterações de CYP foram descritas em helmintoses, protozooses e nas infecções bacteriana e viral. Tanto nos modelos de infecção quanto no modelo de inflamação, o efeito observado com maior frequência foi a redução da atividade e dos níveis de mRNAs e proteínas CYP (Aitken *et al.*, 2006). No entanto, a indução das isoformas Cyp2a5 foi descrita nas infecções pelo *Opisthorchis viverrini*, *Fasciola hepatica*, *Helicobacter hepaticus*, vírus da hepatite B (HBV), *Plasmodium berghei* e *Plasmodium chabaudi* (Kirby *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 1999; Chemin *et al.*, 1999; De-Oliveira *et al.*, 2006, 2010).

1.3. Processos que desencadeiam lesão hepática e regulação de Cyp2a5

Alguns estudos levantaram a hipótese de que a lesão celular e o estresse oxidativo associado aos processos infecciosos poderiam estar relacionados à indução hepática de Cyp2a5. De acordo com o estudo de Gilmore e colaboradores (2003), a lesão celular, decorrente do dano hepático, seria a hipótese para explicar a indução da Cyp2a5 pela hepatotóxica pirazol. Os autores demonstraram aumento nos níveis séricos da transaminase ALT e da proteína grp78 (*glucose-regulated protein 78*) microsomal – indicadores de dano hepático e estresse oxidativo do retículo endoplasmático (RE), respectivamente – após tratamento com o pirazol e com o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. Além do mais, o tratamento com pirazol promoveu a indução da atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH – reação marcadora para a atividade de Cyp2a5 em camundongos) e dos níveis de ALT de forma dose-dependente. Como o dano hepático observado foi significativamente maior para o tratamento com pirazol (e confirmado pelos níveis séricos de ALT), os autores sugeriram a existência de um limiar de dano hepático para que ocorresse a indução da Cyp2a5. Entretanto, o dano hepático não seria a única explicação para modular Cyp2a5, pois uma dose alta de LPS promoveu a inibição, e não a indução de Cyp2a5 de forma tempo-dependente.

Na tentativa de demonstrar o papel do estresse oxidativo na indução da Cyp2a5, Gilmore e Kirby (2004) lançaram a hipótese que a indução de Cyp2a5 é uma resposta celular ao dano hepático, que resulta em estresse do RE. O tratamento de hepatócitos primários com ativadores do estresse do RE mostrou que apesar de todas as substâncias

testadas provocarem aumento da grp78, apenas o agente redutor DTT_{ox} induziu a expressão do Cyp2a5. O grupo concluiu que o estresse do RE não é condição obrigatória para a indução da Cyp2a5, mas que alterações do equilíbrio redox celular seriam o fator crítico para a indução do Cyp2a5. Os estudos de De-Oliveira (2006, 2010) mostraram que a indução de Cyp2a5 na malária murina letal estava associada ao dano hepático (aumento dos níveis de ALT) e à presença de estresse oxidativo (aumento da expressão da NO-sintase induzível –iNOS ou NOS2 – e dos níveis de malondialdeído – marcador de peroxidação lipídica), sem estresse do RE (ausência de aumento da grp78) ou alteração das enzimas de desintoxicação (GST e UGT).

Corroborando ainda com esta linha de raciocínio, o estudo de Abu-Bakar e colaboradores (2005) em modelo de estresse oxidativo provocado pela intoxicação pelo cádmio, demonstrou que a indução da atividade, níveis de mRNA e proteína Cyp2a5 ocorria de forma coordenada com os da heme-oxigenase 1 (HO-1). Esta enzima participa da degradação do grupamento heme, produzindo o pigmento biliverdina (BV), que é reduzida a bilirrubina (BR), um composto que apresenta tanto ação protetora para as células quanto propriedades tóxicas, já que a alta concentração de BR perturba o funcionamento das mitocôndrias e inibe várias enzimas metabolizadoras. De acordo com os autores, a BR em excesso seria um substrato para a enzima Cyp2a5, mostrando que a regulação do conjunto das enzimas Cyp2a5 e HO-1 tem importância para o correto balanceamento entre produção e eliminação da BR. O estudo de De-Oliveira e colaboradores (2010) demonstrou que a indução de Cyp2a5 na fase tardia da infecção com o plasmódio murino letal era concomitante com o aumento da expressão da *hmx-1*. Com a esquizogonia e a ruptura dos eritrócitos na malária grave, a hemoglobina livre lançada na circulação é oxidada, liberando o grupo prostético heme, uma substância pró-oxidante e citotóxica. Níveis elevados de heme ocasionam o aumento da expressão do gene *hmx-1* e o consequente aumento da proteína HO-1, que degrada o heme em ferro, biliverdina (e consequente BR) e monóxido de carbono, protegendo a célula dos efeitos deletérios do heme (Ferreira *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2009). Neste estudo, foi constatada a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, tal como na intoxicação pelo cádmio, uma hipótese para explicar a indução de Cyp2a5 pela ativação do fator nuclear derivado de eritróide2 (*nuclear factor erythroid-derived factor 2*, Nrf2) poderia ser levantada. Vale lembrar que o Nrf2 é um fator de transcrição sensível ao estado redox celular, exercendo papel crucial na regulação da homeostase, uma vez que regula a expressão de genes que codificam enzimas anti-oxidantes, como a HO-1, e de

desintoxicação da fase 2 do metabolismo, como γ -glutamil cisteína sintase e glutathione S-transferase (Gong & Cederbaum, 2006; Beyer & Werner, 2008). Em condições normais, o Nrf2 ocorre no citoplasma associado à proteína Keap1. Diante do estímulo oxidativo, Nrf2 dissocia-se e migra para o núcleo, onde forma heterodímeros com proteínas Maf ou outras, incluindo membros da família Jun de proteínas. Os heterodímeros ligam-se a cis-elementos, como os de resposta aos anti-oxidantes e ao estresse, para regular a transcrição dos genes alvo (Rushmore *et al.*, 1991; Choi & Alam, 1996).

1.4. Mediadores inflamatórios e modulação de CYP

Nas últimas décadas, tem-se falado muito que as doenças capazes de alterar os níveis basais de citocinas, como é o caso das doenças inflamatórias e infecciosas, podem ser responsáveis por alterações farmacocinéticas de medicamentos. A justificativa seria o fato de que as citocinas alteradas poderiam ter um papel sobre a expressão e a atividade das enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Como a diferença da resposta medicamentosa entre os indivíduos é considerada multifatorial, pois depende tanto de fatores genéticos como de fatores ambientais e doenças associadas capazes de afetar tanto a farmacocinética, quanto a farmacodinâmica, o melhor entendimento dos fatores capazes de modificar o metabolismo de agentes terapêuticos é importante tanto para os medicamentos que já se encontram disponíveis no mercado, quanto para os que estão sendo desenvolvidos (Christensen & Hermann, 2012), a fim de se evitar, ou ao menos minimizar, os efeitos tóxicos ou a ausência do efeito terapêutico.

As citocinas são consideradas proteínas de baixo peso molecular ou mediadores glicoproteicos capazes de promover a comunicação celular durante a resposta imune e nas respostas de fase aguda (Bienvenu *et al.*, 2000). As três principais citocinas que ativam a resposta de defesa do organismo contra agentes infecciosos e dano tecidual são a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina-6 (IL-6), todas elas sintetizadas e secretadas por macrófagos em resposta ao LPS de *Escherichia. coli* (Chen *et al.*, 1992). Alguns dos efeitos sistêmicos decorrentes de dano tecidual durante a fase aguda são febre e aumento da síntese hepática com consequente aumento na concentração plasmática das proteínas de fase aguda (IL-1, IL-6 e TNF – Marinkovic *et al.*, 1989; Geiger *et al.*, 1988, Klapproth *et al.*, 1989 *apud* Chen *et al.*, 1992), associados à

inibição da atividade das enzimas CYP. Estes eventos podem ser precedidos de processos traumáticos, infecciosos ou inflamatórios, com estímulo do sistema imune (Renton & Mannering, 1976, Renton, 1983, Descotes, 1985, Farrell, 1987, Williams, 1985 *apud* Chen *et al.*, 1992).

De maneira geral, os processos inflamatórios e infecciosos deprimem as enzimas metabolizadoras de xenobióticos, e como o fígado é o principal órgão metabolizador dessas substâncias, esta depressão hepática pode afetar o *clearance*, aumentando a biodisponibilidade do produto e favorecendo o aparecimento de efeitos adversos (Morgan, 2009). Nesse sentido, muitos estudos tem associado às citocinas um papel sobre a biotransformação, porém, mais precisamente sobre a regulação das enzimas CYP (Chen *et al.*, 1992; Monshouwer *et al.*, 1996; Morgan, 2009; Dickmann *et al.*, 2011; Christensen & Hermann, 2012; Moriya *et al.*, 2012). Entretanto, justamente pela característica pleiotrópica da ação das citocinas sobre uma grande variedade de células alvo, é difícil precisar a ação de uma determinada molécula (Bienvenu *et al.*, 2000).

Além da dificuldade de correlacionar determinada ação reguladora de CYP à uma molécula de citocina específica, há outros aspectos destas moléculas sinalizadoras que dificultam a sua detecção, como exemplificado por Bienvenu *et al.*(2000):

- Meia-vida → O fato de serem moléculas de meia-vida muito curta (geralmente menos de 10 minutos), a presença de elementos sanguíneos, como proteínas ligantes, receptores solúveis, auto anticorpos e os próprios receptores presentes nas células alvo, dificulta o processo.
- Limite de detecção → Inicialmente, o limite de detecção era considerado um fator limitante importante. Entretanto, após o desenvolvimento de *kits* que utilizam microesferas de diferentes tamanhos que se ligam às citocinas, permitindo que essas sejam detectadas em citômetros de fluxo, houve considerável evolução na detecção dessas moléculas. Já é possível detectar concentrações na faixa de 100 fg/mL nas amostras de sangue.

Apesar de todas estas dificuldades, estudos científicos têm demonstrado uma correlação entre mediadores inflamatórios e regulação de enzimas metabolizadoras de xenobióticos. Nesse sentido, Christense & Hermann (2012) construíram uma tabela, com base em artigos científicos, que relata as alterações das citocinas e a associação com a modulação de algumas CYP humanas (**Tabela 1.1**).

Tabela 1.1: Efeito de diversas citocinas sobre a expressão (mRNA ou proteína) e a atividade *in vitro* de enzimas CYP450 de humanos.

Citocinas	Enzimas do citocromo P450						
	CYP1A2	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2E1	CYP3A4
IFN- γ	↓	↓	↓	↓↔	↔		↓↔
TGF- β 1	↓	↑↓	↓	↓	↓		↓
TNF- α	↓	↑↓	↓	↓↔	↓↔	↓	↓
IL-1 β	↓	↓	↓	↓↔	↔	↓	↓
IL-2		↓					↓
IL-4	↓	↑				↑	↑↔
IL-6	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
IL-10		↔					↑

Duas setas indicam resultados divergentes. ↓: inibição; ↑: indução; ↔: sem alterações.
 Fonte: Christensen & Hermann, 2012.

Não apenas as citocinas, mas também o óxido nítrico (NO) funciona como um mediador inflamatório que participa do controle de processos infecciosos e inflamatórios, visto que esta é uma molécula produzida por macrófagos, após sua ativação. Stuehr e Marletta demonstraram em 1985 que o LPS é capaz de ativar macrófagos, processo este observado através da produção de nitritos e nitratos. Já no início da década de 90 foi aceito que o NO funciona como um mensageiro ou sinalizador (inter e intracelular), mas também como uma toxina em diversos processos patológicos. A ação do NO, ora como sinalizador, ora como toxina, depende da sua concentração tecidual, sendo tênue a linha que delimita a ausência de toxicidade às células do hospedeiro e a presença da toxicidade necessária para a sua ação microbicida.

Os macrófagos e muitas outras células têm a capacidade de produzir NO, processo que ocorre pela ação de hemoproteínas da família *citocromo P450-like*, denominadas NO sintase (NOS), enzima que converte a L-arginina em NO (Abbas & Lichtman, 2007). Existem formas constitutivas e induzíveis da NOS, estando as duas formas constitutivas

presentes no cérebro (NOS1) e nas células endoteliais (NOS3). Acredita-se que a isoforma induzível (NOS2 ou iNOS) seja produzida em qualquer tecido, desde que estímulos adequados estejam presentes (*e.g.*, os macrófagos produzem NO somente após estímulo por LPS e/ou citocinas - Dileepan *et al.*, 1995). Entretanto, após a indução de iNOS (ou NOS2), a enzima é capaz de produzir NO por um longo período de tempo. Acredita-se que justamente este fato esteja associado ao aparecimento dos processos patológicos que muitas vezes surgem associados à resposta imune protetora.

Uma das citocinas capazes de ativar macrófagos é o interferon gama (IFN- γ), uma citocina secretada por linfócitos T (Th1 e TCD8⁺) e células *natural killer* (NK) durante a resposta imune contra agentes microbianos (Abbas *et al.*, 2012). Após sua ativação, os macrófagos aumentam sua atividade microbicida, o consumo de oxigênio, liberam intermediários reativos de oxigênio (ROIs – ânion superóxido e radicais livres, formados a partir do oxigênio molecular), diversas citocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- α , quimiocinas), além de produzirem NO (Dileepan *et al.*, 1995; Abbas & Lichtman, 2007). Todas essas ações em conjunto e aliadas a outras células e moléculas imunes irão proteger o organismo contra os agentes infecciosos, mas poderão também interferir com o metabolismo de xenobióticos, visto que as citocinas têm sido relacionadas à inibição de enzimas CYP.

1.5. Justificativa do estudo

É sabido que processos inflamatórios e infecciosos têm a capacidade de modular o citocromo P450, enzimas de grande importância para a terapêutica medicamentosa, além do metabolismo de diversos xenobióticos importantes como aditivos alimentares e poluentes ambientais. Como de maneira geral esta modulação ocorre através da inibição das enzimas hepáticas, mas como vimos, também pode ocorrer a indução das mesmas, é de extrema importância entender os mecanismos que regulam estes processos. Esta compreensão permitirá que decisões mais conscientes sejam tomadas pelos profissionais de saúde, sobretudo no campo da Saúde Pública, quanto à prescrição medicamentosa a pacientes portadores de doenças infecciosas ou processos inflamatórios.

Como a Cyp2a5, assim como seu ortólogo humano CYP2A6 são responsáveis pela ativação de pré-carcinógenos como NNN e NDEA, presentes na fumaça do tabaco

(Cyp2a5), aflotoxina e outras nitrosaminas (CYP2A6), além de serem induzidas por xenobióticos (fenobarbital, rifampicina, dexametasona e nicotina) e agentes biológicos (*Opisthorchis viverrini*, *Fasciola hepática*, *Helicobacter hepaticus*, HBV, *Plasmodium berghei* e *P. Chabaudi*) possuir um melhor entendimento sobre a modulação dessas enzimas metabolizadoras de xenobióticos poderá permitir o ajuste de doses para pacientes em processos inflamatórios, doenças infecciosas ou exposição ocupacional / acidental, evitando assim o aparecimento de possíveis efeitos tóxicos ou até mesmo a ausência do efeito terapêutico.

1.6. Objetivos do estudo

O objetivo maior deste estudo é contribuir para a compreensão dos mecanismos subjacentes à modulação do Cyp2a5. Para efeitos comparativos, também avaliamos as alterações das Cyp1a1/2 e 2b9/10 murinas. Para tanto, usamos dois modelos de alteração de Cyp2a5, que foram divididos nos dois capítulos seguintes, II e III. No capítulo II, usamos o modelo clássico de indução de Cyp2a5 pelas substâncias químicas pirazol e fenobarbital, e no capítulo III, utilizamos um modelo clássico e simples de estímulo da resposta imune com o LPS de *Escherichia coli*. O trabalho compreende, portanto, dois estudos cujos objetivos específicos foram:

Capítulo II:

- Verificar se a indução da atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH), reação específica da Cyp2a5 hepática murina, pelos indutores clássicos pirazol e fenobarbital é acompanhada da indução da expressão do mRNA do Cyp2a5 em oito linhagens de camundongos com atividades hepáticas de COH distintas;
- Investigar se a indução da Cyp2a5 pelos indutores mencionados está necessariamente associada à hepatotoxicidade;
- Investigar se a indução da Cyp2a5 está essencialmente associada à indução da heme-oxigenase 1 (HO-1).

Capítulo III:

- Verificar se os mediadores inflamatórios (citocinas e NO) participam da modulação das atividades da COH, EROD e BROD, marcadores de Cyp2a5, 1a1/2 e 2b9/10, respectivamente, mediante a resposta imune provocada pelo LPS de *E. coli*.

CAPÍTULO II

**Atividade e expressão constitutiva e regulação do Citocromo
P450 2a5 por substâncias químicas em fígados de diferentes
linhagens de camundongos**

2.1. INTRODUÇÃO

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. Como já comentado na introdução geral deste trabalho, a *Cyp2a5* de camundongos, ortóloga da *CYP2A3* de ratos e da *CYP2A6* de humanos, é importante para o metabolismo da nicotina, cotinina, nitrosamina cetona derivada da nicotina (*nicotine-derived nitrosamineketone* – NNK), aflatoxina B1, cumarina, N-nitrosodietilamina (NDEA) e outros xenobióticos. 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).

Estudos têm mostrado que a atividade constitutiva da cumarina 7-hidroxilase (COH, marcador para a atividade da Cyp2a5) e o metabolismo da cumarina variam entre as diferentes linhagens de camundongo, sendo a linhagem DBA-2, a que apresenta maior atividade enzimática (Wood & Conney, 1974; Wood & Taylor, 1979; van Iersel *et al.*, 1994). 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*, que se encontra no cromossomo 7. 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).

Uma série de estudos tem demonstrado que Cyp2a5 hepático pode ser induzido por uma série de compostos orgânicos e inorgânicos não relacionados entre si, como o pirazol (PIR), fenobarbital (FEN), pirazina, tetracloreto de carbono (CCl₄), cocaína, griseofulvina, tioacetamida, aminotriazol, rifampicina, hexaclorobutadieno e 1,4-bis[2-(3,5-dicloropiridiloxi)]benzeno (TCPOBOP), além de metais como o cádmio, índio e cobalto (Su & Ding, 2004; Abu-Bakar *et al.*, 2005). Há evidências de que o aumento dos níveis de mRNA e das atividades hepáticas de Cyp2a5 está relacionado com eventos transcricionais e pós-transcricionais. Alguns receptores já tiveram reconhecido o seu papel na transcrição de Cyp2a5, mas ainda há o que esclarecer. A participação dos receptores *pregnane X* (*pregnane X receptor*, PXR), a retinóide-X (*retinoid X receptor*, RXR α), androstano constitutivo (*constitutive androstane receptor*, CAR) e do receptor α

ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR α) na regulação do *Cyp2a5* já foi demonstrado em alguns estudos (Barclay *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2002; Rosenfeld *et al.*, 2003; Simonsson *et al.*, 2006). Adicionalmente, a participação de um mecanismo dependente do AhR/ARNT (do inglês *aryl hydrocarbon receptor / aryl hydrocarbon nuclear translocator receptor* - aril hidrocarboneto / translocador do receptor nuclear de aril hidrocarboneto), de (PGC)-1 α e dos fatores 1 e 2a (USF-1 e USF-2a) na regulação do *Cyp2a5* também foi evidenciada (Arpiainen *et al.*, 2005, 2007, 2008). Outros autores (Urvila *et al.*, 2004) indicaram que o HNF-4 e o NF-1 (fator nuclear 1) têm um papel na regulação constitutiva da expressão hepática do *Cyp2a5*, enquanto o fator de transcrição eritróide-relacionado 2 (Nrf2) – um regulador do sistema de defesa nos processos de estresse oxidativo – foi envolvido na indução do *Cyp2a5* após exposição ao cloreto de cádmio (CdCl₂) (Abu-Bakar *et al.*, 2005). Os inúmeros receptores e fatores de transcrição envolvidos na regulação de *Cyp2a5* mostram como é complexa a modulação desta CYP.

Hipóteses de que o estresse oxidativo ou alterações da homeostase do heme estariam envolvidos na regulação positiva do *Cyp2a5* foram levantadas. A indução da expressão do mRNA, da atividade e dos níveis da proteína *Cyp2a5* após exposição ao CdCl₂ foi associada à regulação positiva da expressão da heme-oxigenase 1 (HO-1) em camundongo por um grupo de pesquisadores, enquanto em estudo *in vitro* posterior, o mesmo grupo demonstrou que a exposição ao metal provocava um atraso na degradação do Nrf2, que culminava com a indução de *Cyp2a5* e da HO-1 (Abu-Bakar *et al.*, 2004, 2005, 2007; Stewart *et al.*, 2003). Um estudo mais recente sugeriu que o Nrf2 também seria necessário para a expressão constitutiva do *Cyp2a5* (Lämsä *et al.*, 2010). Vale ressaltar que o Nrf2 é um fator de transcrição que ativa genes que regulam a homeostase redox celular em resposta ao estresse oxidativo, como heme-oxigenase (hmo α -1), γ -glutamil cisteína ligase, e também genes que codificam enzimas da biotransformação (fase II), como uridina- difosfoglicuronosil transferase (UGT), glutationa S-transferase (GST) e NAD(P)H:quinona oxidoreductase 1 (NQO1). Embora o Nrf2 tenha um papel protetor contra o estresse oxidativo, há relatos que associam a ativação desta proteína com muitos tipos de câncer (Lau *et al.*, 2008).

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). Os mecanismos pelos quais os agentes infecciosos e os mediadores inflamatórios promovem a indução da *Cyp2a5* ainda não estão claramente

compreendidos. A hipótese de que a lesão hepática estaria associada à indução de Cyp2a5 foi levantada por Gilmore *et al.* (2003). Os autores provocaram toxicidade hepática em camundongos com a hepatotoxina pirazol e compararam a atividade, os níveis de mRNA e da proteína Cyp2a5 desses animais com camundongos da mesma linhagem que haviam sido tratados com uma dose baixa (suficiente para provocar uma resposta inflamatória sem provocar hepatotoxicidade) do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Gilmore *et al.*, 2003). Os autores demonstraram que o pirazol regulava Cyp2a5 positivamente, causava hepatotoxicidade (níveis elevados da transaminase ALT), aumento dos níveis séricos da proteína de fase aguda, proteína amilóide sérica 1, e estresse do retículo endoplasmático (RE) - níveis elevados da proteína grp78 nos hepatócitos pericentrais. Os animais tratados com o LPS tinham Cyp2a5 regulado negativamente, mas níveis elevados de ALT e da grp78. Como a lesão hepática foi maior nos animais que receberam o pirazol, os autores sustentaram que um limiar de toxicidade seria necessário para regular Cyp2a5 positivamente. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o estresse do RE não era condição necessária para a indução de Cyp2a5 (Gilmore & Kirby, 2004). No modelo de malária murina em que camundongos DBA-2 e C57BL/6 foram infectados com o *Plasmodium berghei* (ANKA), a indução da atividade de Cyp2a5 estava associada ao aumento dos níveis de ALT (De-Oliveira *et al.*, 2006).

Alguns estudos demonstraram uma alta expressão de Cyp2a5 em lesões neoplásicas e pré-neoplásicas de fígado de camundongos, o que levou alguns autores a sugerirem que esta CYP poderia ter um papel no desenvolvimento do carcinoma hepático (Wastl *et al.*, 1998).

No sentido de contribuir para esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação de Cyp2a5, planejamos um estudo comparativo com oito diferentes linhagens de camundongos com atividades de COH diversas. Neste estudo, os animais foram tratados com dois indutores conhecidos de Cyp2a5, fenobarbital e pirazol, e a relação da indução da atividade de COH com a hepatotoxicidade e com a regulação da HO-1 foi investigada. Como os estudos comparativos de Cyp2a5 realizados até o momento não haviam contemplado a comparação da expressão do mRNA de Cyp2a5 entre as diferentes linhagens, neste trabalho também comparamos as atividades de COH com os níveis de mRNA de Cyp2a5 nas oito linhagens estudadas. Adicionalmente, também investigamos a regulação de Cyp1a1/2 e 2b9/10 pelos indutores.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo Geral

Neste estudo, os nossos objetivos foram investigar se a regulação de Cyp2a5 está essencialmente associada à da heme-oxigenase 1 e à hepatotoxicidade, e estabelecer os níveis do mRNA de Cyp2a5, correlacionando-os às diferentes atividades de COH em oito linhagens de camundongos selecionadas.

2.2.2. Objetivos Específicos

O nosso estudo comparativo em camundongos foi desenvolvido com as linhagens isogênicas DBA-1, DBA-2, C57BL/6, C57BL/10, CBA e BALB/c, a linhagem *outbred* Swiss Webster, e a híbrida B6D2F1 (primeira geração do cruzamento entre macho DBA-2 e fêmea C57BL/6) antes e após tratamento com os indutores clássicos fenobarbital e pirazol.

Os objetivos específicos do nosso trabalho foram os seguintes:

- Comparar a expressão constitutiva e induzida do mRNA de Cyp2a5;
- Comparar as atividades constitutivas e induzidas de Cyp2a5, Cyp1a e Cyp2b;
- Comparar a expressão constitutiva e induzida do mRNA da hmox-1;
- Investigar a correlação da expressão constitutiva e induzida do mRNA de Cyp2a5 com as atividades constitutivas e induzidas de Cyp2a5;
- Investigar a correlação entre a indução de Cyp2a5 e a toxicidade hepática;
- Investigar a correlação entre a expressão de Cyp2a5 e a da heme-oxigenase.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas de seis linhagens isogênicas (BALB/cAn, CBA, C57BL/6, C57BL/10, DBA-1 e DBA-2), uma linhagem *outbred* (*Swiss Webster*) e uma linhagem híbrida (B6D2F1), com idades entre oito e dez semanas de vida, originadas do Centro de Criação de Animais de Laboratório, (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

Durante o período de aclimação (uma a três semanas) e durante todo o experimento, água e ração comercial para camundongos (Nuvital® - Nuvital CR1, Curitiba, PR, Brasil) foram fornecidas *ad libitum*. Ambiente estável e controlado foi mantido na sala dos animais durante todo o tempo: temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (aproximadamente 70%) e ciclo claro-escuro constante de doze horas (período claro de 8:00 h às 20:00 h). As trocas das camas de maravalha, água e ração foram realizadas três vezes por semana.

Para cada linhagem, os animais foram distribuídos ao acaso e alojados em grupos de seis em gaiolas de plástico com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco. O estudo foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ (protocolo CEUA P-84/10-7).

2.3.2. Desenho experimental

Para avaliar a modulação da atividade da Cyp2a5, foram constituídos três grupos de tratamento para cada linhagem:

- Controle negativo (veículo para os indutores): tampão fosfato de potássio – PBS
- Pirazol (PIR) (indutor específico) (Sigma P2646 1 Lote:88H3620) – 100 mg/kg/dia
- Fenobarbital sódico (FEN) (indutor pleiotrópico) (Fenocris – Marca: Cristália – Lote: número 06085810) – 80 mg/kg/dia

Cada grupo foi composto por camundongos fêmeas com idades entre oito e dez semanas de vida e distribuídos ao acaso. Em cada grupo, o tratamento foi realizado por via intraperitoneal (i.p.) por três dias consecutivos, a intervalos de 24 horas e usando o volume de 10 mL/kg/dia.

Nas diversas análises realizadas, o número de animais em cada grupo de tratamento para cada linhagem estudada foi de até seis camundongos. A **Tabela 2.1** (níveis de RNA de *Cyp2a4/5* e *hmox-1*) e a **Tabela 2.2** (atividade das enzimas hepática e a possível hepatotoxicidade) descrevem o número exato de animais por grupo experimental.

Tabela 2.1. Número de animais (N) analisado por qPCR por grupo de tratamento e por linhagem.

Linhagem¹ (Sigla)¹	Tratamento		
	CON (N)	PIR (N)	FEN (N)
BALB/cAn (Balb)	6	6	5
B6D2F1 (F1)	4	5	5
CBA	6	6	6
C57BL/6 (B6)	6	6	6
C57BL/10 (B10)	6	6	6
DBA-1 (D1)	4	5	5
DBA-2 (D2)	6	5	6
SissWebster (SW)	5	5	5

CON: controle (PBS 10 mL/kg/dia, 3 dias); PIR (pirazol 100 mg/kg/dia, 3 dias) e FEN (fenobarbital 80 mg/kg/dia, 3 dias). ¹Linhagem em estudo e sigla usada para referenciar o animal.

Tabela 2.2. Número de animais (N) analisado por grupo de tratamento e por linhagem.

Linhagem¹ (Sigla)¹	Atividades de monoxigenases			Atividades das Transaminases		
	Tratamento					
	CON (N)	PIR (N)	FEN (N)	CON (N)	PIR (N)	FEN (N)
BALB/cAn (Balb)	6	6	5	6	6	5
B6D2F1 (F1)	6	6	6	6	6	6
CBA	6	6	6	6	6	6
C57BL/6 (B6)	6	6	6	5	6	6
C57BL/10 (B10)	6	5	6	6	6	6
DBA-1 (D1)	6	6	6	6	6	6
DBA-2 (D2)	6	6	6	4	6	6
SwissWebster (SW)	6	6	6	6	6	6

CON: controle (PBS 10 mL/kg/dia, 3 dias); PIR (pirazol 100 mg/kg/dia, 3 dias) e FEN (fenobarbital 80 mg/kg/dia, 3 dias).¹ Linhagem em estudo e sigla usada para referenciar o animal.

2.3.3. Morte dos animais, coleta de sangue e fígado

Vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram mortos por deslocamento cervical e o fígado rapidamente removido e levado a uma placa de Petri, mantida em gelo. O órgão foi pesado, uma pequena fração posta em tubo *eppendorf* contendo RNA *later* (*Ambion*®) e armazenado a -20°C, para posterior avaliação da expressão gênica (qPCR). O restante do fígado foi acondicionado em papel alumínio e armazenado em nitrogênio líquido até o momento do preparo da fração microsomal. Para evitar interferências do ciclo circadiano, a morte dos animais ocorreu sempre no período entre o final da manhã e as 14 h.

Imediatamente antes da morte por deslocamento cervical, o sangue foi coletado do plexo orbital do animal para determinar a atividade das transaminases (ALT). O soro foi separado por centrifugação a 9.000 X g por 10 minutos, duas vezes, em centrífuga *eppendorf Minispin*®, coletado em tubo para criogenia e armazenado em nitrogênio líquido até o momento das análises.

2.3.4. Determinação do mRNA por qPCR em tempo real

Para as análises referentes à determinação do mRNA por qPCR, os experimentos foram realizados no Laboratório BioMa da UFRJ com a ajuda e supervisão do pesquisador Thiago Parente.

2.3.4.1. Extração e quantificação de RNA

Uma pequena fração do fígado armazenado em tubo para criogenia contendo RNA *later* (*Ambion*®) e armazenado a -20°C foi colocada em tubo tipo *eppendorf* contendo 1 mL de Trizol® (*Invitrogen*®) e homogeneizada com homogeneizador de tecido elétrico (*Polytron*®). Após a completa homogeneização, o fígado permaneceu em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Ao final dos 10 minutos, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Um período de repouso de 15 minutos adicionais permitiu a separação das fases aquosa e orgânica. As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000 X g por 15 minutos a 4°C (*Mikro 22R, Hettich*®).

Da fase aquosa, foram retirados 600 μL e transferidos para tubos tipo *epENDORF*. Um volume de 500 μL de isopropanol foi adicionado para precipitar o RNA, sendo o material deixado em repouso por 10 minutos. Ao final deste período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 X g por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, 1 mL de etanol 75% foi adicionado (para lavar o RNA) e, em seguida, a amostra foi centrifugada novamente a 7.500 X g por 5 minutos a 4°C. Uma etapa adicional de lavagem com etanol 75% e de centrifugação foi realizada. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi descartado e 30 μL de água Milli Q estéril foram adicionados a cada uma das amostras. A concentração de RNA das amostras foi determinada usando espectrofotômetro ND-1000 (*Nanodrop*®) e expressa em ng/ μL .

2.3.4.2. Eletroforese em gel de agarose

A integridade dos RNA extraídos do fígado dos animais foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose.

Inicialmente, gel de agarose TAE 1,2% foi vertido em cuba (montada e previamente limpa com SDS 0,1%), que permaneceu em repouso por 15 a 30 minutos para solidificação do gel. O gel de RNA (1 μL de brometo de etídeo 2,5%, 1,5 μL de *loading dye*, 9 μL de formamida e 3,5 μL da amostra contendo o RNA) foi preparado de acordo com o número de amostras e colocado em termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*®) a 65°C por 5 minutos. Em seguida, 15 μL do gel de RNA, correspondente a cada uma das amostras das diferentes linhagens, foram adicionados aos poços do gel de corrida (gel de agarose TAE 1,2%). Foi, então, aplicada uma corrente de 74 V por 30 minutos e, em seguida, o gel foi colocado em um transiluminador para observar a presença de duas bandas, indicativo da integridade do RNA (subunidades 18S e 28S).

2.3.4.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Verificada a integridade do RNA extraído das frações hepáticas das diversas linhagens, o cDNA foi sintetizado usando o kit *TaqMan*® (*Applied Biosystems*®).

Para sintetizar o cDNA de cada amostra, foi preparada uma solução contendo 1 μg de RNA, 4 μL de *Master Mix* (*TaqMan Universal Master Mix, Applied Biosystems*®) e volume de água Milli Q estéril necessária para completar 20 μL . As amostras foram colocadas no termociclador (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*®), de acordo com a

seguinte programação: 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Ao fim da síntese do cDNA, o termociclador manteve a temperatura a 4°C, até que as amostras fossem retiradas e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

2.3.4.4. Quantificação dos níveis de mRNA por RT-PCR

Os níveis de mRNA do *Cyp2a4/5* e *hmox-1* foram quantificados pela técnica de *real time* PCR, usando o método *TaqMan*® (*AppliedBiosystems*®). A sonda *Cyp2a4/5* foi usada no lugar da *Cyp2a5*, pois a primeira é uma forma comercial que apresenta similaridade com a *Cyp2a5*, que não é vendida comercialmente a menos que encomendemos sua construção. As duas sondas (*Cyp2a4/5* e *hmox-1*) estão conjugadas com fluoróforo que durante sua etapa de extensão é clivado da sonda pela ação exonucleásica da DNA polimerase e, então emite sinal de fluorescência detectado pelo termociclador do *real time* (7500 *Fast* – *AppliedBiosystems*®).

Para o estudo dos genes-alvo (*Cyp2a4/5* e *hmox-1*), foram usadas sondas conjugadas com fluoróforo FAM®, enquanto para o controle endógeno β -actina, o fluoróforo conjugado foi VIC®. Estas sondas constam do catálogo da *AppliedBiosystems*® e apresentam suas sequências protegidas por patentes comerciais. As sondas estão apresentadas abaixo (**Quadro 2.1**).

Quadro 2.1. Genes alvo e de referência da qPCR e respectivos códigos do fabricante		
Gene		Código*
alvo:	<i>Cyp2a4/5</i>	Mm00487248_g1
	<i>hmox-1</i>	Mm00516007_m1
referência:	β -actina	4352341E

*catálogo da *AppliedBiosystems*®

Os ensaios foram realizados em placas ópticas de 96 poços (*AppliedBiosystems*®). No caso do gene alvo *Cyp2a4/5*, as reações de PCR foram realizadas na forma *multiplex*, *i.e.*, a reação para o gene alvo e para o controle endógeno foram realizadas no mesmo poço. Por outro lado, para o gene alvo *hmox-1*, as reações de PCR foram realizadas em poços diferentes (*singleplex*). Em ambos os casos, o volume final de reação foi de 10 µL, sendo 1 µL de cDNA, 1 µL do *primer* (*multiplex*: 0,5 µL do

primer para o gene alvo e 0,5 μ L do *primer* para o controle endógeno ou *singleplex*: 1 μ L do *primer* para o gene em estudo, *Cyp2a4* ou *hmox-1*), 5 μ L de *Master Mix*® (*Applied Biosystems*®) e 3 μ L de água Milli Q estéril.

Em ambos os casos (*multiplex* e *singleplex*), as alterações na expressão dos genes foram calculadas em relação a níveis de expressão em cada um dos grupos controle e normalizadas contra a expressão da β -actina, pelo método $\Delta\Delta$ Ct (Livak e Schmittgen, 2001).

2.3.5. Preparo da fração microssomal hepática

O preparo da fração microssomal foi realizado como descrito por De-Oliveira *et al.* (2010). O órgão foi pesado, lavado com solução de sacarose 250 mM e seco com papel filtro. Em seguida, o fígado foi homogeneizado em solução tampão Tris 100 mM com KCl 150 mM pH 7,4 (a um volume referente a 4x o peso do órgão), a uma velocidade de 1.200 rpm em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem.

Ao final da homogeneização, o órgão foi transferido a tubos de centrífuga e centrifugado a 9.000 X g por 30 minutos a 4°C. Ao final, o centrifugado foi filtrado em gaze e o sobrenadante ultracentrifugado a 100.000 X g por 1 hora a 4°C (ultracentrífuga *Hitach CP70MX*).

Após a primeira ultracentrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento homogeneizado mais uma vez com a mesma solução tampão a uma velocidade de 250 rpm. Ao final, o homogeneizado foi ultracentrifugado novamente a 100.000 X g por 1 hora a 4°C.

O sobrenadante foi descartado, o sedimento suspenso em solução tampão de K_2HPO_4 100 mM com 20% de glicerol e EDTA 1 mM pH 7.4, homogeneizado a 250 rpm e aliquotado em tubos para criogenia, que foram armazenados em nitrogênio líquido até o momento de uso.

2.3.6. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas na fração microssomal foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976), adaptado para espectrofotômetro (595 nm) para

microplacas (*Spectramax Plus - Molecular Devices*®), usando o *software SoftmaxPro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®.

As medidas foram realizadas em triplicata e a concentração de proteínas foi expressa em mg de proteína/mL de fração microsomal.

2.3.7. Determinação das atividades enzimáticas

2.3.7.1. Cumarina 7-hidroxilase (COH)

As atividades da COH, um marcador para a Cyp2a5, foram determinadas na fração microsomal das diversas linhagens em estudo com pequenas alterações nas recomendações de van Iersel *et al.* (1994).

O ensaio foi realizado em tubos de ensaio de vidro com capacidade para 5 mL. O volume final da reação foi de 500 µL, cuja mistura continha tampão tris 50 mM pH 7,4, cumarina 10 µM (substrato para a reação) e proteína 0,8 mg/mL. 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 (β-NADP 0,5 mM, glicose 6-fosfato 10 mM, glicose 6-fosfato desidrogenase 0,5 U/mL e MgCl₂ 10 mM). Decorridos 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de HCl 2N.

Ao final da reação, as amostras voltaram ao banho de gelo e, em capela química, foi adicionado 1 mL de clorofórmio à mistura. Decorridos 20 minutos, 500 µL da camada inferior (contendo a umbeliferona formada durante a reação) foram extraídos e transferidos para tubos tipo *ependorf* contendo 750 µL de solução tampão glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4. Após 10 minutos, a umbeliferona (camada superior) foi novamente extraída, sendo transferida para a cubeta de quartzo (diluição 1:4 em solução tampão glicina-NaOH 1,6 M pH 10,4). A fluorescência da umbeliferona produzida na reação foi mensurada em espectrofluorímetro *Shimadzu*® RF5301PC, com os parâmetros de excitação e emissão fixados em 355 e 460 nm, respectivamente, e abertura de fenda de 3 nm.

Uma curva padrão com solução de umbeliferona 1 µM 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.

2.3.7.2. Alcoxi-resorufina-*O*-desalquilases: EROD e BROD

As atividades da etoxioresorufina-*O*-desetilase (EROD – marcador para Cyp1a1/2) e benziloxioresorufina-*O*-desbenzilase (BROD – marcador para Cyp2b9/10) foram determinadas na fração microsomal das diversas linhagens, de acordo com o método descrito por Burke *et al.* (1985), exceto pelo uso do sistema regenerador de NADPH (G6P 5 mM; β -NADP 0,25 mM; MgCl₂ 2,5 mM e G6PD 0,5 U/mL). A adaptação para microplaca seguiu as recomendações propostas por Kennedy & Jones (1994), com algumas modificações (De-Oliveira *et al.*, 2006).

Os ensaios foram realizados em microplaca de 96 poços. O volume final da reação foi de 360 μ L, cuja mistura continha tampão K₂HPO₄ 50 mM pH 7,8, etoxioresorufina (EROD) ou benziloxioresorufina (BROD) 5 μ M (substrato para as reações, respectivamente) e proteína 2,5 mg/mL. 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. Decorridos 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de acetona nitrila.

Ao final da reação, a microplaca foi retirada do banho-maria e deixada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por quinze minutos antes da leitura da fluorescência.

As reações para cada amostra foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão com solução de resorufina 1 μ M em solução tampão K₂HPO₄ 100 mM pH 7,8 foi construída para calcular a atividade enzimática, que era expressa como picomoles de resorufina / minuto / miligrama de proteína. A fluorescência produzida pela resorufina foi mensurada em espectrofluorímetro para microplaca modelo *Spectramax GeminiXS* (*Molecular Devices*®), usando software *Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®, com os parâmetros de excitação e emissão fixados em 530 e 590 nm respectivamente, e precisão normal.

2.3.8. Determinação de alanina aminotransferase (ALT)

As atividades de ALT foram medidas no soro dos camundongos das diversas linhagens em estudo, usando kit comercial *Bioclin*® e seguindo as recomendações do fabricante, mas adaptado para microplaca de 96 poços. A leitura da densidade ótica foi

realizada a 505 nm em espectrofotômetro para microplaca modelo *Spectra Plus* (*Molecular Devices*®), software *SoftmaxPro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®. As atividades de ALT foram expressas como proporção da unidade internacional por litro (UI/L), em relação ao grupo controle.

2.3.9. Análise estatística

A comparação estatística para as variáveis que apresentaram distribuição normal (paramétrica) foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.4. RESULTADOS

A integridade do mRNA hepático, usado na construção do cDNA e necessário para a realização do qPCR, foi verificada através da realização da eletroforese em gel de agarose (**Figura 2.1**). Ao observar o gel, foi possível constatar a presença de duas bandas (subunidades 18S e 28S), garantindo assim a qualidade do mRNA extraído.

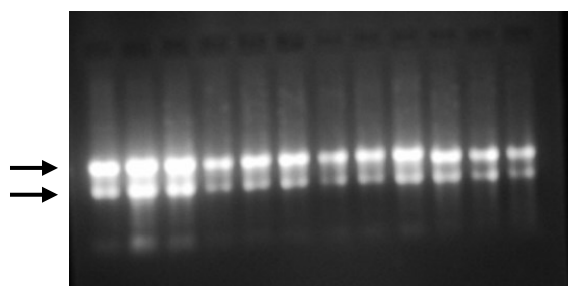


Figura 2.1. Gel de RNA. Presença de duas bandas referentes às subunidades (18S e 28S).

Para avaliar a expressão do mRNA do *Cyp2a4/5* e *hmox-1* nas diferentes linhagens, foi calculado o fator de indução (FI) (média±EPM), representado como a razão entre a expressão do *Cyp2a4/5* ou *hmox-1* de cada animal tratado em relação à média das expressões do grupo controle da mesma linhagem, sendo atribuído valor 1 à expressão constitutiva.

2.4.1. Expressão hepática da *Cyp2a5* nas diferentes linhagens

Como podemos observar com a **Figura 2.2a**, não houve indução nos níveis de mRNA do *Cyp2a4/5*, apenas uma pequena diferença entre as linhagens (Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$ quando os níveis eram comparados ao CBA e F1), um resultado que chama a atenção se levarmos em consideração a grande diferença dos níveis constitutivos das atividades de *Cyp2a5*, mediado pela atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH) nas diferentes linhagens (**Figura 2.5a**). Enquanto os níveis de mRNA do *Cyp2a4/5* não apresentam diferenças entre as linhagens D2 e SW, a atividade constitutiva da COH na linhagem D2 é aproximadamente 10 vezes maior do que a atividade constitutiva na linhagem SW (**Figuras 2.2a e 2.5a**).

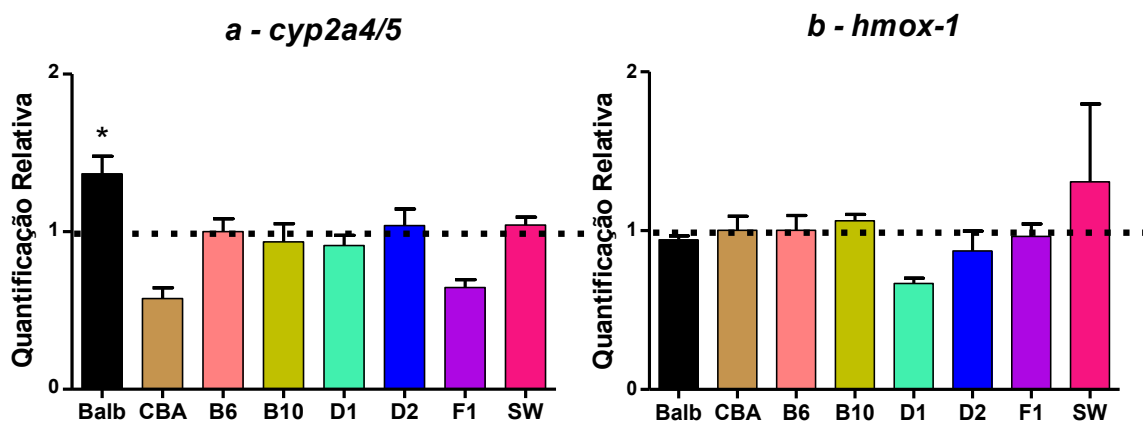


Figura 2.2. Quantificação relativa do mRNA *Cyp2a4/5* (a) e *hmox-1* (b) do fígado de camundongos nas diferentes linhagens. A quantificação relativa do mRNA foi realizada através do RT-PCR usando a linhagem B6 como referência. * linhagem difere de CBA e F1 ($p < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

O tratamento com PIR provocou um aumento nos níveis do mRNA do *Cyp2a4/5* em todas as linhagens, o que foi acompanhado pela indução da atividade da *Cyp2a5* (mediada pela COH – **Figuras 2.3 e 2.5b**).

O efeito do FEN nos níveis do mRNA do *Cyp2a4/5* foi menos evidente do que o apresentado pelo PIR. Embora o FEN tenha apresentado um aumento na expressão do *Cyp2a4/5* na linhagem D2, este aumento não foi estatisticamente significativo em relação às outras linhagens (**Figura 2.3**).

2.4.2. Alterações concomitantes na expressão da *hmox-1* e *Cyp2a4/5*

Os resultados deste estudo mostram que o PIR induziu a atividade da *Cyp2a5* e a expressão do mRNA do *Cyp2a4/5*, mesmo na ausência de qualquer sinal de hepatotoxicidade (**Figuras 2.3, 2.5b e 2.8**). O mesmo não foi observado com o mRNA da *hmox-1* que, ao contrário, foi inibida no fígado das linhagens BALB, CBA, B6, B10, F1 e SW (**Figura 2.4**).

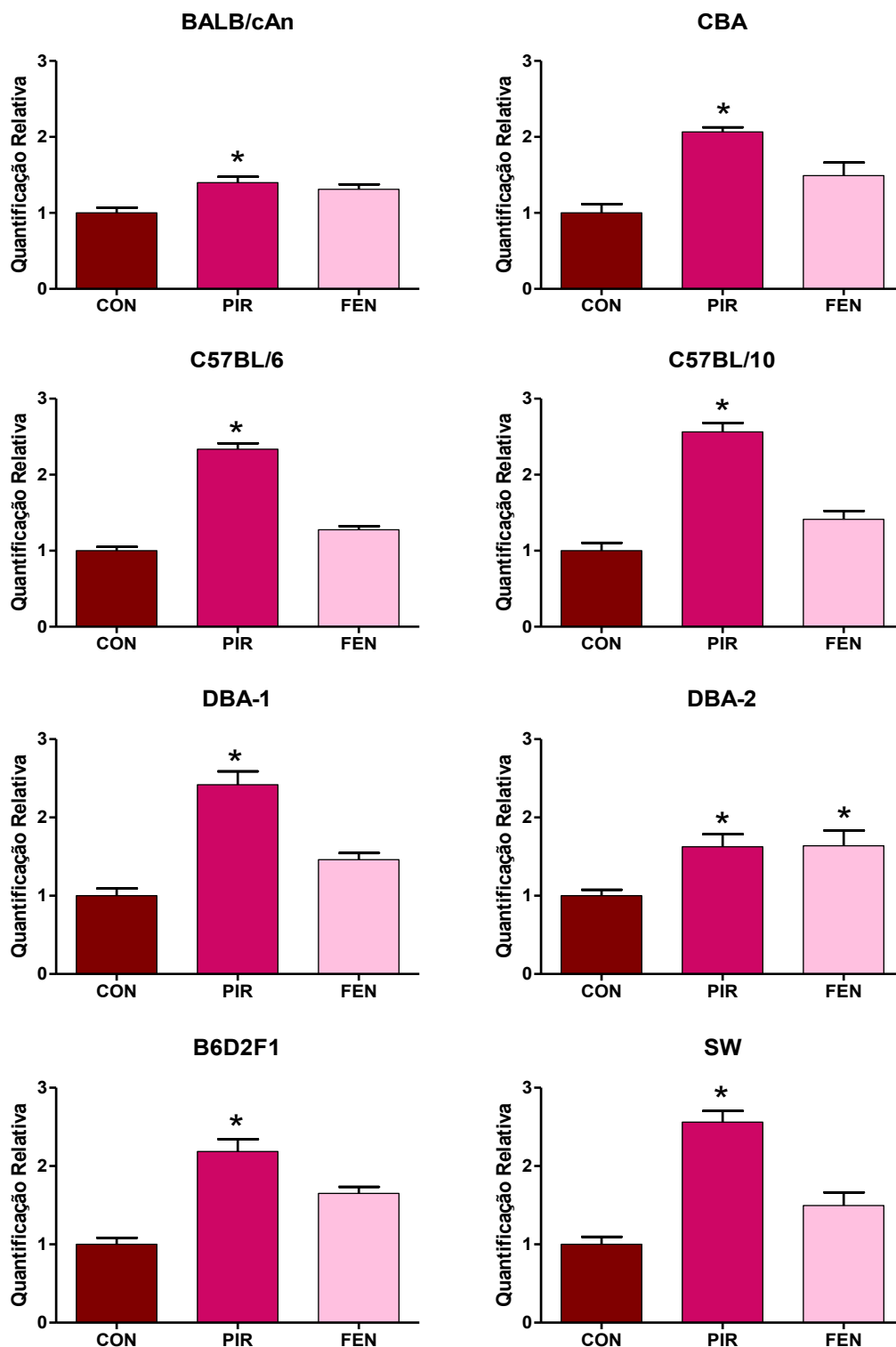


Figura 2.3. Efeitos do pirazol (PIR, 100 mg/kg / dia, 3 dias, i.p.) e fenobarbital (FEN, 80 mg/kg / dia, 3 dias, i.p.) sobre os níveis do mRNA do *Cyp2a4/5* hepático nas diferentes linhagens. A quantificação relativa do mRNA foi realizada através do RT-PCR, usando o grupo controle (CON, tratado com PBS 10 mL/kg / dia, 3 dias, i.p.) como referência. * Tratado difere do controle da mesma linhagem ($p < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

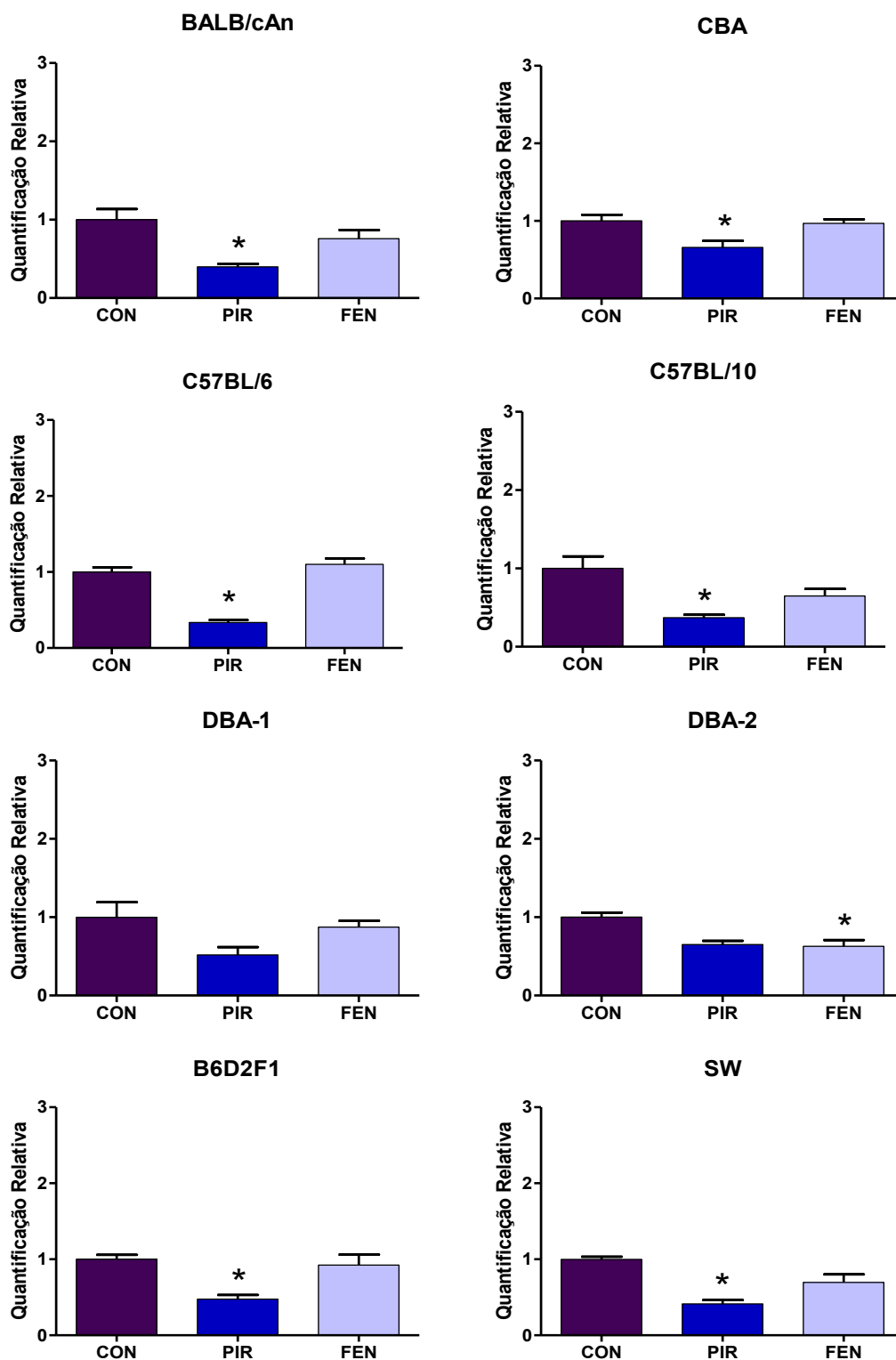


Figura 2.4. Efeitos do pirazol (PIR, 100 mg/kg / dia, 3 dias, i.p.) e fenobarbital (FEN, 80 mg/kg / dia, 3 dias, i.p.) sobre os níveis do mRNA do *hmox-1* hepático nas diferentes linhagens. A quantificação relativa do mRNA foi realizada através do RT-PCR, usando o grupo controle (CON, tratado com PBS 10 mL/kg / dia, 3 dias, i.p.) como referência. * Tratado difere do controle da mesma linhagem ($p < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

2.4.3. Atividade da cumarina 7-hidroxilase nas diferentes linhagens

Os resultados mostraram que a atividade constitutiva da COH na fração microssomal hepática das diferentes linhagens apresentou grande variação (ANOVA seguida do teste de comparações múltiplas Bonferroni, $p < 0,05$). A linhagem D2, a mais antiga entre as linhagens isogênicas, apresentou a maior atividade da COH (228 pmol / mg de proteína / minuto), enquanto o D1 (143 pmol / mg de proteína / min) apresentou a segunda maior atividade. As linhagens CBA, BALB e B6 apresentaram atividades que variaram de 33 a 45 pmol / mg de proteína / min, enquanto as menores atividades foram encontradas nas linhagens B10 e SW (24 pmol / mg de proteína / min). Devido ao modo aditivo de herança dos genes que originam as enzimas metabolizadoras Cyp2a5, a atividade da COH (marcador de Cyp2a5) no fígado dos camundongos híbridos F1 (113 pmol / mg de proteína / min) foi intermediária comparada à de seus pais que, constitutivamente, apresentam alta (D2) e baixa (B6) atividade (**Figura 2.5a**).

Para comparar o efeito do PIR e do FEN sobre a atividade de COH nas diferentes linhagens, foi calculado o fator de indução (FI) (média±EPM) em cada linhagem, representado pela razão entre a atividade de COH do animal tratado e a média das atividades de COH do grupo controle na mesma linhagem.

O tratamento com PIR (100 mg/kg / dia, por 3 dias, i.p.) aumentou a atividade da COH em todas as linhagens. O FI foi de 2 a 2,5 vezes superior ao valor encontrado para os controles nas linhagens BALB, D2, D1 e B6 e, de 3,3 a 3,9 vezes para as linhagens SW, CBA, B10 e F1 (**Figura 2.5b**).

O tratamento com FEN (80 mg / kg / dia, por 3 dias, i.p.), um indutor de enzimas de biotransformação de xenobióticos, do tipo pleiotrópico, aumentou a atividade da COH em todas as linhagens, exceto B6, D1 e SW. Entretanto, a indução promovida pelo FEN foi menos potente que a indução promovida pelo PIR. O FI após o tratamento de todas as linhagens com FEN variou de 2,1 a 2,8 para as linhagens BALB, D2, B10, F1 e CBA (**Figura 2.5c**).

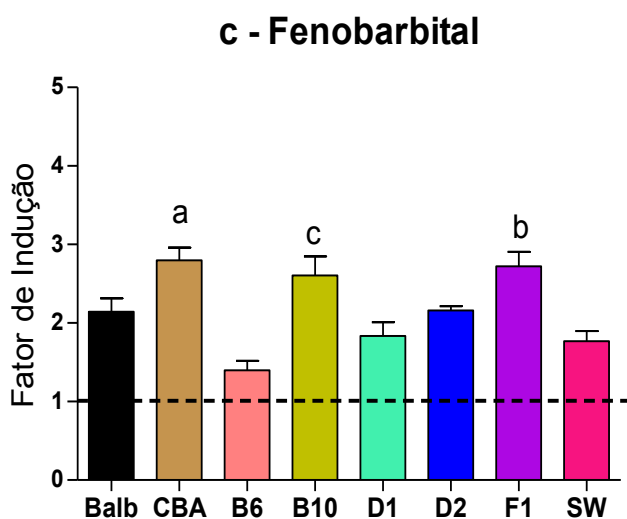
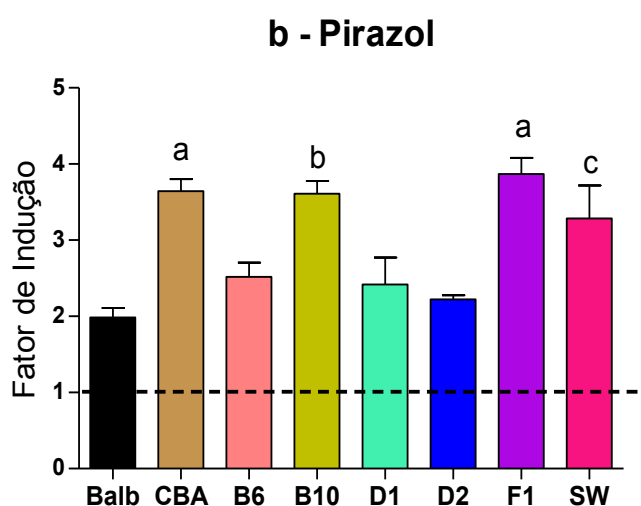
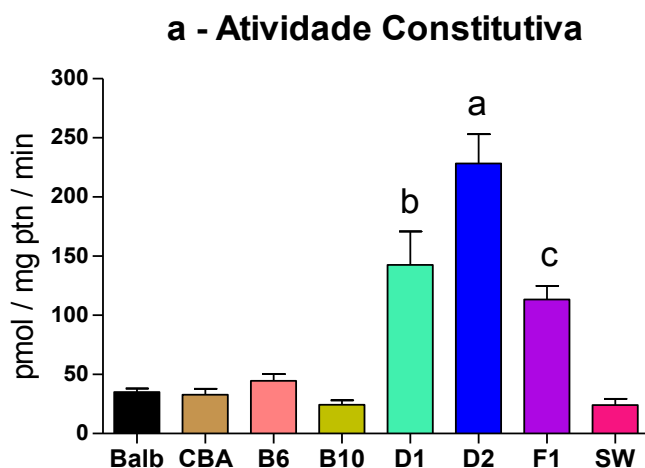


Figura 2.5. Atividade da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5) na fração microsomal de diferentes linhagens de camundongos (ANOVA seguido de Bonferroni, para atividade constitutiva e Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Withney para os fatores de indução, $p < 0,05$).

Painel a: atividade constitutiva (pmol / mg ptn / min) (a) difere de todas as linhagens; (b) difere de todas as linhagens, exceto F1; (c) difere de todas as linhagens, exceto D1. Painel b: Fator de indução (FI, razão do induzido em relação à média da atividade constitutiva) após o tratamento com pirazol (100 mg/ kg/ dia, i.p.) (a) difere de BALB, B6, D1 e D2; (b) difere de BALB, B6 e D2; (c) difere de BALB. Painel c: FI após tratamento com fenobarbital (80 mg/ kg/ dia, por 3 dias, i.p.) (a) difere de BALB, B6, D1, D2 e SW; (b) difere de B6, D1, D2 e SW; (c) difere de B6, D1 e SW.

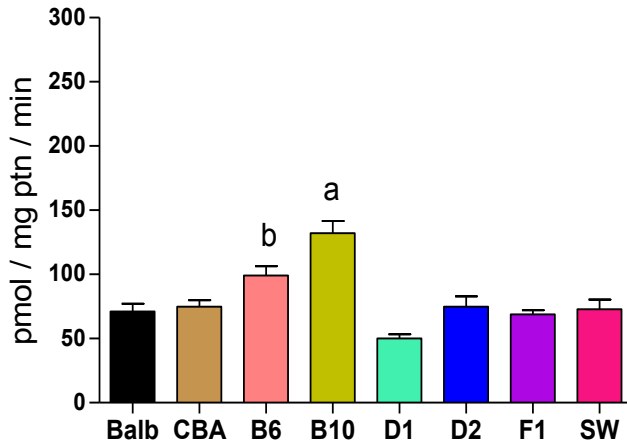
2.4.4. Atividade da alcoxiresorufina-*O*-dealquilase nas diferentes linhagens

A variação relativa da atividade constitutiva, entre as linhagens, para Cyp1a1/2 (EROD) e Cyp2b9/10 (BROD) foi menos potente que a observada para a atividade da Cyp2a5 (COH). A diferença das atividades de Cyp1a1/2 (EROD) e Cyp2b9/10 (BROD) entre as linhagens foi muito inferior ao que se observou com as atividades de COH (CYP2A5), sendo de 2,6 vezes (EROD, B10: 132 pmol / mg ptn / min e D1: 50 pmol / mg ptn / min e BROD, BALB: 57 pmol / mg ptn / min e CBA: 22 pmol / mg ptn / min) (**Figuras 2.6a e 2.7a**), comparado a 9,5 vezes (COH, D2: 228 pmol / mg ptn / min e SW: 24 pmol / mg ptn / min) (**Figura 2.5a**).

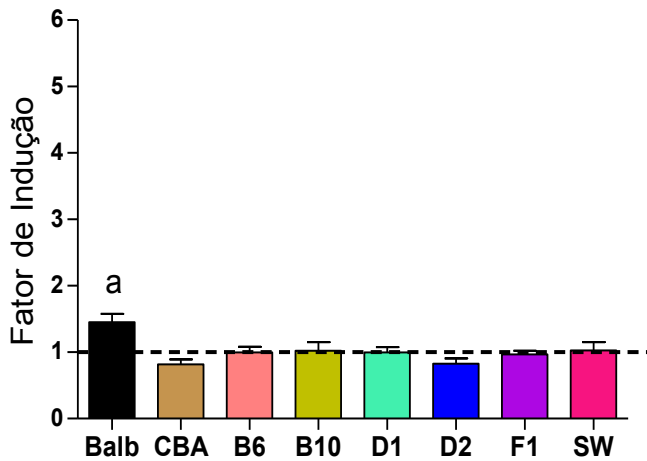
O tratamento com PIR não provocou o aumento da atividade mediada por Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 em nenhuma das linhagens estudadas (*i.e.*, o FI foi próximo a 1 conforme mostra as **Figuras 2.6b e 2.7b**), um achado condizente com a noção de que este composto diazol-heterocíclico é um indutor de Cyp2a, 2j e 2e1 (Franzén *et al.*, 2006).

De forma contrária, o FEN promoveu um marcante aumento na atividade mediada por Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 em todas as linhagens, confirmando que este é um indutor pleiotrópico das atividades das monooxigenases hepáticas. O tratamento com FEN levou a um aumento de aproximadamente 4 vezes na atividade da Cyp1a1/2 (EROD) em todas as linhagens, exceto no BALB, onde o FI foi de 7,5 (**Figura 2.6c**). Da mesma forma, a indução promovida pelo FEN na atividade da Cyp2b9/10 (BROD) nas linhagens BALB, B6, B10 e SW variou de 3 a 4 ($3 < \text{FI} < 4$), mas nas outras linhagens, esta indução foi mais potente, sendo 11,3; 10,1; 8,7 e 6,7 para as linhagens CBA, D1, F1 e D2 respectivamente (**Figura 2.7c**) (Kruskal Wallis seguido de teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

a - Atividade Constitutiva



b - Pirazol



c - Fenobarbital

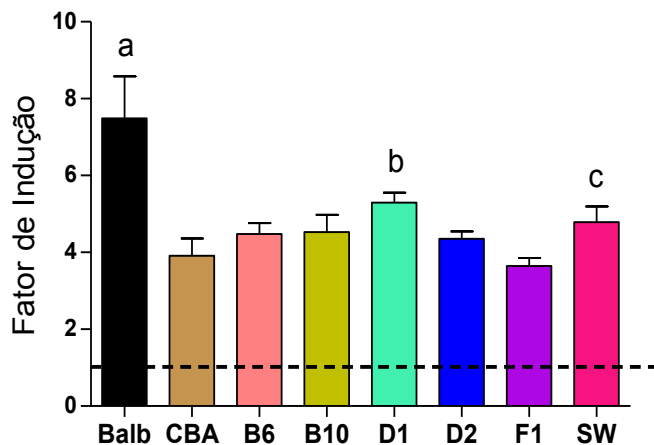
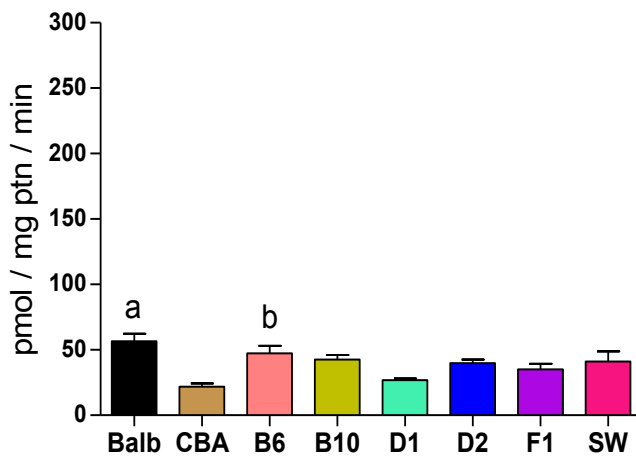
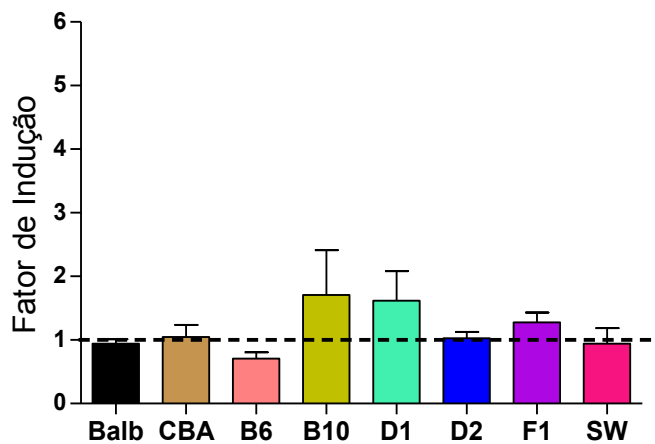


Figura 2.6. Atividade da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD, Cyp1a1/2) na fração microsomal de diferentes linhagens de camundongos (ANOVA seguido de Bonferroni, para atividade constitutiva e Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para os fatores de indução, $p < 0,05$). Painel a: atividade constitutiva (pmol / mg ptn / min) (a) difere de todas as linhagens; (b) difere de D1. Painel b: Fator de indução (FI, razão do induzido em relação à média da atividade constitutiva) após o tratamento com pirazol (100 mg/kg / dia, por 3 dias, i.p.) (a) difere de todas as linhagens, exceto B10 e SW. Painel c: FI após tratamento com fenobarbital (80 mg/kg / dia, por 3 dias, i.p.) (a) difere de todas as linhagens; (b) difere de BALB, CBA, D2 e F1; (c) difere de BALB e F1.

a - Atividade Constitutiva



b - Pirazol



c - Fenobarbital

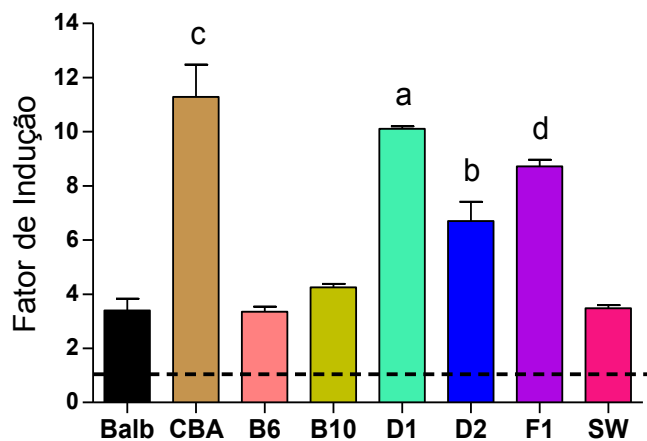


Figura 2.7. Atividade da benziloxiresorufina-*O*-desbenzilase (BROD, Cyp2b9/10) na fração microsomal de diferentes linhagens de camundongos (ANOVA seguido de Bonferroni, para atividade constitutiva e Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para os fatores de indução, $p < 0,05$). Painel a: atividade constitutiva (pmol / mg ptn / min) (a) difere de CBA e D1; (b) difere de CBA. Painel b: Fator de indução (FI, razão do induzido em relação à média da atividade constitutiva) após o tratamento com pirazol (100 mg/kg/dia, por 3 dias, i.p.). Painel c: FI após tratamento com fenobarbital (80 mg/kg/dia, por 3 dias, i.p.) (a) difere de todas as linhagens, exceto CBA; (b) difere de todas as linhagens, exceto F1; (c) difere de todas as linhagens, exceto D1 e F1; (d) difere de todas as linhagens, exceto CBA e D2.

2.4.5. Indução da atividade da CYP2A5 e hepatotoxicidade

Para avaliar possíveis sinais de hepatotoxicidade, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) foram expressos como proporção de UI/L do grupo tratado em relação ao grupo controle em cada uma das linhagens.

Neste estudo, a análise estatística (Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney U, $p < 0,05$) mostrou um pequeno aumento nos níveis séricos de ALT (menor que 2 vezes) nas linhagens CBA (1,6) e B10 (1,8), após o tratamento com PIR (100 mg/kg / dia, por 3 dias, i.p.). Entretanto, o tratamento com FEN (80 mg/kg /dia, por 3 dias, i.p.) não provocou qualquer alteração dos níveis séricos em nenhuma das linhagens avaliadas (**Figura 2.8**).

O esquema de tratamento usado neste estudo foi suficiente para induzir a expressão e a atividade da Cyp2a5, entretanto, não foi suficiente para promover evidencia clínica de hepatotoxicidade.

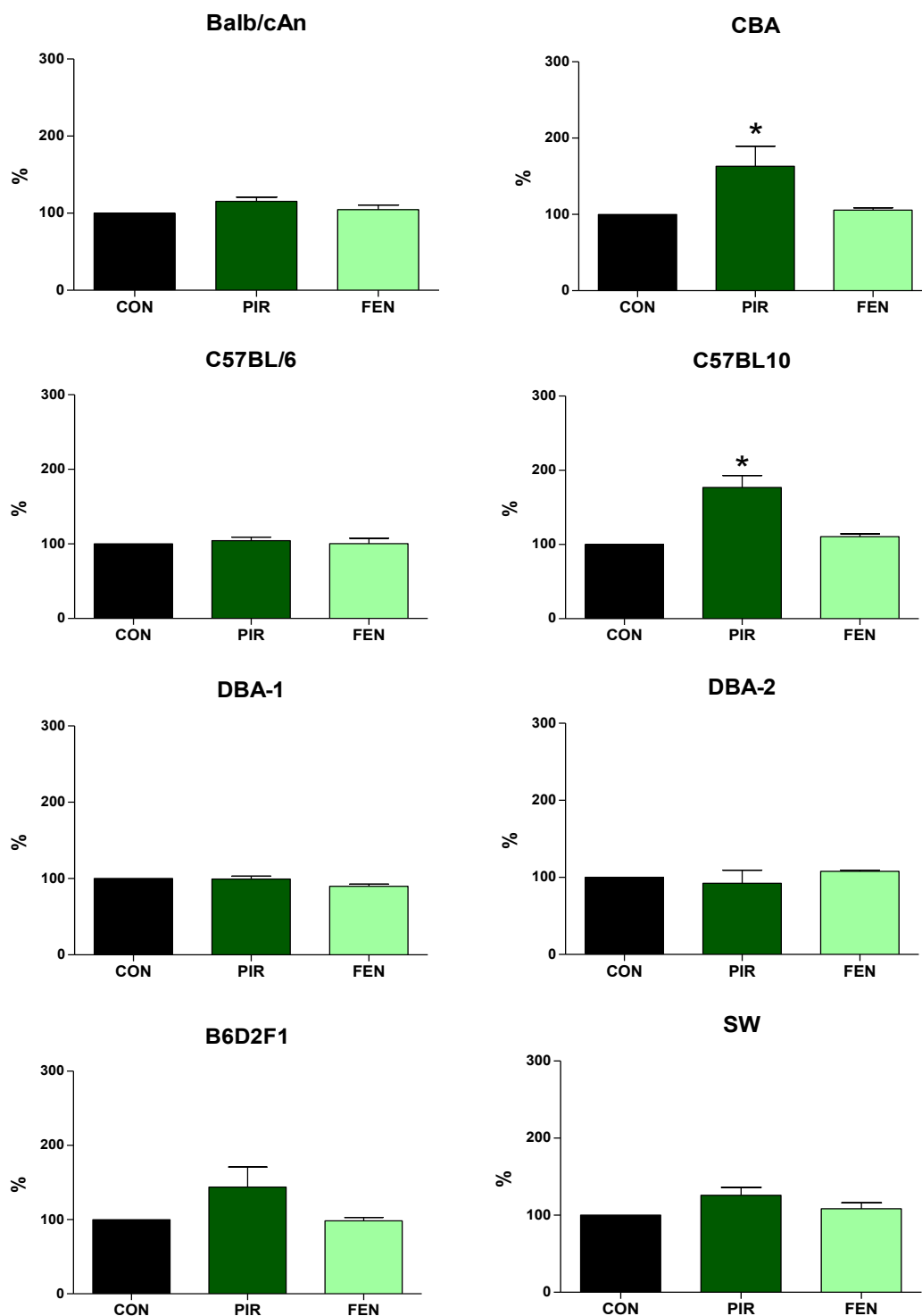


Figura 2.8. Níveis séricos da transaminase alanina aminotransferase (ALT), nas diferentes linhagens, após tratamento com pirazol (PIR, 100 mg/ kg/ dia, por 3 dias, i.p.) e fenobarbital (FEN, 80 mg/ kg/ dia, por 3 dias, i.p.). Os níveis são expressos como proporção de UI / L, em relação ao grupo controle. * Tratado difere do controle da mesma linhagem ($P < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

2.5. DISCUSSÃO

O gene *Cyp2a4* é altamente relacionado ao *Cyp2a5* (> 98% de similaridade na sequência de aminoácidos de sua região codificadora) e ambos são expressos no fígado de camundongos. Apesar de sua grande similaridade, os genes *Cyp2a4* e *Cyp2a5* codificam enzimas que atuam sobre substratos específicos: enquanto o primeiro catalisa a 15- α -hidroxilação de hormônios esteróides (*e.g.*, testosterona e estrogênio), o segundo catalisa a 7-hidroxilação da cumarina. A substituição de um único aminoácido (Phe209Leu) parece ser suficiente para mudar a especificidade da *Cyp2a4* para a testosterona 15- α -hidroxilase, em vez da cumarina 7-hidroxilase (Neigishi *et al.*, 1996). Os *primers* e a sonda usados neste estudo não distinguem o transcrito *Cyp2a4* do *Cyp2a5*, portanto os níveis de mRNA foram quantificados em conjunto.

Usando uma análise diagnóstica avançada de PCR, com base no método de Squires & Negishi (1988), Hahnemann e colaboradores (1992) estimaram a contribuição relativa do *Cyp2a4* e do *Cyp2a5* em relação ao teor total de mRNA de *Cyp2a4/5* presente no fígado de camundongos machos das linhagens D2 e B6. Embora os autores não tenham usado o método quantitativo em tempo real (qPCR), os resultados sugeriram que nas duas linhagens, o mRNA do *Cyp2a5* representa aproximadamente 90% dos níveis constitutivos do mRNA de *Cyp2a4/5*. Os autores também sugeriram que o aumento no mRNA de *Cyp2a4/5* produzido pelo PIR, se deveu predominantemente à indução dos níveis do mRNA do *Cyp2a5*. Esta hipótese foi confirmada através dos resultados obtidos no estudo, onde houve indução da atividade da COH (mediada pela *Cyp2a5*), mas o mesmo não ocorreu com a atividade de 15- α -hidroxilase (mediada pela *Cyp2a4*), após tratamento dos animais D2 com PIR (Hahnemann *et al.*, 1992).

Os resultados aqui apresentados indicam que a COH, atividade mediada pela *Cyp2a5*, varia em 10 vezes entre as linhagens. Entretanto, apesar desta marcante variação nas atividades constitutivas das linhagens estudadas, as respostas ao FEN e ao PIR ocorreram de forma semelhante, sugerindo que as diferenças constitutivas entre as linhagens ou não envolvem xenoreceptores ou envolvem mecanismos que não participam da regulação de *Cyp2a5* por xenobióticos. É digno de nota que o FEN, um indutor pleiotrópico de *Cyp2a5*, 2b9/10, 3a11 e outras isoformas, e o PIR, um indutor de *Cyp2a4*, 2a5, 2e1 e 2j, aumentam as atividades catalisadas pela *Cyp2a5* por mecanismos distintos (Geneste *et al.*, 1996; Ueda *et al.*, 2002; Franzén *et al.*, 2006).

Este estudo mostrou que o PIR aumentou o nível de mRNA do Cyp2a4/5 em todas as linhagens, um achado consistente com o relatado por outros autores que trataram camundongos D2 e B6 com compostos diazol-heterocíclicos (Aida & Negishi, 1991; Hahnemann *et al.*, 1992). Os primeiros autores demonstraram que a meia-vida do mRNA do Cyp2a5 hepático de camundongos D2 tratados com PIR era pelo menos 4 vezes maior do que a dos animais controles, um resultado que indicava que o aumento na transcrição gênica do *Cyp2a5* se devia predominantemente à estabilização do mRNA (Aida & Negishi, 1991). Estudos posteriores revelaram que o PIR aumenta os níveis da riboproteína nuclear heterogênea A1 (*heterogeneous nuclear riboprotein A1* - hnRNPA1), uma proteína que se liga à região do nucleotídeo 71 do mRNA do Cyp2a5, protegendo-o da degradação (Geneste *et al.*, 1996). Os estudos citados sugeriram fortemente que a indução do Cyp2a5 hepático pelo PIR era predominantemente um evento pós-transcricional e pré-traducional que envolvia a estabilização do mRNA do Cyp2a5. Entretanto, o mecanismo pelo qual o PIR e compostos relacionados promovem a alteração de proteínas que se ligam ao mRNA do Cyp2a5 ainda não está completamente compreendido.

Por outro lado, a indução do Cyp2a5 pelo FEN parece envolver a tradução eficiente e / ou a estabilização da apoproteína, além do aumento da taxa de transcrição. Por exemplo, enquanto o FEN aumenta a proteína Cyp2a e a atividade da Cyp2a5 (COH), os níveis do mRNA do Cyp2a4/5 no fígado de camundongos machos da linhagem D2 não aumentam (Aida & Negishi, 1991). Todavia, Hahnemann e colaboradores (1992) mostraram que o mRNA do Cyp2a4/5 e a atividade do Cyp2a5 foram aumentados em 2 a 3 vezes no fígado de camundongos B6, após o tratamento com FEN. No estudo aqui apresentado, apesar do aumento da atividade do Cyp2a5 (COH) pelo FEN de 2 a 3 vezes na maioria das linhagens, houve apenas um aumento pequeno (< 2 vezes) e não significativo nos níveis do mRNA do Cyp2a4/5, exceto na linhagem D2. Esta falta de um efeito claro sobre os níveis de mRNA do Cyp2a4/5 sugere que o FEN induz a atividade do Cyp2a5 aumentando a eficiência de tradução e / ou prolongando a meia-vida desta proteína, mais do que aumentando a taxa de transcrição e / ou estabilizando o transcrito.

A descoberta mais surpreendente desta comparação entre linhagens foi que apesar da atividade constitutiva do Cyp2a5 ser mais alta nas linhagens D2 e D1 (além da híbrida F1), os níveis de mRNA do Cyp2a4/5 não foram maiores do que aqueles observados nas outras linhagens de camundongos. Estudos anteriores sugeriam que a diferença da atividade constitutiva do Cyp2a5 entre as linhagens estava relacionada com quantidades

diferentes de proteínas devido às diferenças na eficiência de tradução e / ou estabilização da proteína. Esta interpretação é consistente com o fato de que apesar da V_{max} na reação de COH determinada na fração microsomal hepática da linhagem D2 ser maior do que a avaliada para as linhagens AKR e B6, o K_m da reação não diferiu entre as linhagens D2 e AKR (Lang *et al.*, 1989) nem entre as linhagens D2 e B6 (Pelkonen *et al.*, 1985). A partir do momento em que o K_m é essencialmente o mesmo, é justificável crer que as diferenças na atividade constitutiva da COH sejam decorrentes de quantidades diferentes da proteína Cyp2a5 na fração microsomal hepática. Tanto quanto os autores tem conhecimento, nenhum estudo anterior comparou os níveis constitutivos do mRNA do Cyp2a4/5 (ou Cyp2a5) entre as diversas linhagens usando um método quantitativo de qPCR.

Visto que a expressão e a atividade do Cyp2a5 são induzidas por agentes hepatotóxicos e algumas patologias hepáticas (Kirby *et al.*, 1994; Montero *et al.*, 1999; De-Oliveira *et al.*, 2010), tem-se afirmado que o estresse oxidativo ou outra mudança fisiopatológica associada ao dano hepático é capaz de justificar a superexpressão do *cyp2a5* (Gilmore *et al.*, 2003; Gilmore & Kirby, 2004). De acordo com esta linha de raciocínio, tem sido sugerido que o Nrf2, um fator transcricional regulado pelo estresse oxidativo, é peça chave para a indução do Cyp2a5 por agentes e condições que eventualmente acarretem dano hepático. O Nrf2 também é mediador da expressão de uma série de genes que regulam a homeostase do estado redox, incluindo o *hmx-1* (Lämsä *et al.*, 2010). Uma indução concomitante de Cyp2a5 e HO-1 hepáticos na linhagem de camundongo D2 após a intoxicação com o cádmio foi observada por alguns autores (Abu-Bakar *et al.*, 2005), e também em camundongos infectados da mesma linhagem por parasitas da malária murina (De-Oliveira *et al.*, 2010). A malária promove um aumento na taxa de hemólise, o que provoca a liberação do grupamento heme, que é convertido pela heme oxigenase em biliverdina, que por sua vez é transformada pela biliverdina redutase em bilirrubina. Embora a eliminação da bilirrubina seja mediada principalmente através da reação de glicuronização (através da UGT1A1 hepática), a degradação oxidativa da bilirrubina parece ser uma rota de desintoxicação secundária (Schmid & Hammaker, 1963; Kapitulnik & Ostrow, 1978). De qualquer forma, atividades aumentadas de HO-1 promovem o aumento na produção de bilirrubina, que ao se acumular no organismo, pode ser potencialmente tóxica. Se a Cyp2a5 está relacionada à oxidação da bilirrubina, conforme sugerido por Abu-Bakar e colaboradores em 2005, uma indução concomitante da HO-1 e da Cyp2a5, em casos de toxicidade e condições patológicas, poderia conferir alguma proteção contra o dano hepático causado pelo

aumento do estresse oxidativo, no sentido de manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação da bilirrubina.

Em hepatócitos primários de camundongos da linhagem B6, Lämssä *et al.* (2010) observaram que o tratamento com chumbo (PbCl₂) e metilmercúrio (MeHg) regulava positivamente Cyp2a5, o que não ocorria com hepatócitos *knockout* para Nrf2. Níveis reduzidos da expressão de Cyp2a5 nos hepatócitos *knockout* indicaram que o Nrf2 também atuava na regulação constitutiva de Cyp2a5. O tratamento com PbCl₂ e MeHg regulava *hmox-1* e Cyp2a5, mas embora o primeiro fosse regulado positivamente anteriormente (após 6 h) ao segundo (após 24 h), ambos os metais ativavam a via do Nrf2 (Lämssä *et al.*, 2010).

O pirazol é hepatotóxico, e regimes de doses deste composto heterocíclico capazes de causar forte indução do Cyp2a5, também são capazes de promover pronunciada elevação dos níveis séricos de aminotransferases (ALT e AST), marcadores de dano hepático (Gilmore *et al.*, 2003; Gilmore & Kirby, 2004; Lu *et al.*, 2008). No nosso estudo, embora o pirazol tenha provocado níveis mais altos de mRNA de Cyp2a5 comparado aos controles em todas as linhagens estudadas, os níveis do mRNA de *hmox-1* não foram alterados 24 h após o tratamento com uma dose única de 100 mg/kg de pirazol. Em estudo com camundongos B6 que receberam pirazol na dose de 150 mg/kg durante 2 dias consecutivos, Lu e colaboradores (2008) observaram indução das proteínas HO-1 e Cyp2a5, e da atividade de COH hepática com ativação da via do Nrf2, mas sem evidências de hepatotoxicidade: os animais que receberam uma dose de pirazol semelhante aos animais do nosso estudo, também não apresentaram níveis elevados de transaminases.

2.6. CONCLUSÕES

- Os resultados deste estudo mostraram que as atividades constitutivas da Cyp2a5 (COH) no fígado de camundongos D2 e D1 foram claramente maiores que a atividade da linhagem *outbred* SW e de qualquer das outras linhagens isogênicas (BALB, CBA, B6 e B10);
- Conforme esperado pelo modelo aditivo de herança, a atividade da Cyp2a5 no fígado do camundongo híbrido F1 foi intermediária em relação às atividades de seus genitores que apresentam altas e baixas atividades (D2 e B6 respectivamente);
- Desde que os níveis de transcrição do gene *Cyp2a4/5* nas linhagens com alta atividade (D2 e D1) não diferiram das linhagens de baixa atividade (*e.g.*, SW, B6, B10), levantamos a hipótese de que a regulação das atividades constitutivas não envolve os receptores que regulam Cyp ou os mecanismos que envolvem a regulação de Cyp por xenobióticos;
- O PIR induziu a expressão do *Cyp2a4/5* e a atividade da Cyp2a5, mas o mesmo não ocorreu com as atividades hepáticas do Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 em nenhuma das linhagens estudadas;
- O FEN aumentou as atividades do Cyp2a5, Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 nas diversas linhagens, conforme esperado de um indutor pleiotrópico;
- A indução do Cyp2a5 pelo FEN na maioria das linhagens estudadas não foi acompanhada por uma clara indução nos níveis de mRNA do *Cyp2a4/5*, um achado que é consistente com a ideia de que o efeito indutor do FEN é decorrente principalmente da eficiência da tradução e / ou da estabilização da apoproteína;

- A indução do Cyp2a5 pelo PIR, um conhecido agente hepatotóxico, não foi acompanhada de sinais clínicos de dano hepático na dose usada neste estudo (100 mg/kg / dia, por 3 dias, i.p.);
- Os tratamentos com PIR e FEN não induziram o mRNA da HO-1, um achado que está em desacordo com a ideia de que a indução do Cyp2a5 está associada à da HO-1.

CAPÍTULO III

Efeito do bloqueio da resposta inflamatória com pentoxifilina sobre a regulação negativa de citocromos P450 (Cyp 2a5, 1a1/2 e 2b9/10) produzida pelo LPS

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Regulação da expressão e atividade de CYPs na infecção e inflamação

Há muito se sabe que processos inflamatórios e infecciosos modulam a expressão e atividade de enzimas CYP. Entretanto, o modo pelo qual a resposta a estímulos inflamatórios e infecciosos regula a expressão das enzimas CYP ainda não foi elucidado. Embora vários autores tenham investigado o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias em estudos clínicos e experimentais (Sasaki *et al.*, 1984; Gharavi & El-Kadi, 2007; Williams *et al.*, 1987), o papel desses mediadores na modulação de enzimas hepáticas de metabolismo de xenobióticos permanece obscuro.

A resposta de fase aguda (RFA), reação inflamatória imediata de defesa do organismo contra a infecção ou o dano tissular, compreende a liberação de citocinas, ligação a receptores e ativação de cascatas de sinalização celular. As citocinas produzidas na RFA são os principais mediadores da inflamação. Essas proteínas de baixo peso molecular, de ação pleiotrópica e caráter redundante, embora ocorram em níveis muito baixos na circulação sanguínea, estão associadas à febre, vaso-dilatação, leucocitose e às alterações metabólicas observadas na RFA. As citocinas pró-inflamatórias interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon-gama (IFN- γ), liberadas durante uma RFA, desencadeiam uma cascata complexa de sinalização que compreende a síntese e liberação de outras citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda e alterações de expressão gênica (Bienvenuet *et al.*, 2000; Petrovic *et al.*, 2007).

Tomemos o LPS como exemplo de estímulo do sistema imune. Quando presente no sangue, o LPS liga-se a uma glicoproteína hepática, LBP (do inglês *LPS binding protein* - proteína ligante do LPS), formando o complexo LPS-LBP. Este complexo pode se ligar a receptores presentes em monócitos/macrófagos (CD14), ativando estas células a secretar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α , que rapidamente induzem a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-6, o melhor indicador sistêmico de ativação da cascata inflamatória (Shapiro & Gelfand, 1993 *apud* Bienvenu *et al.*, 2000). Além das citocinas, o LPS induz a secreção de NO por macrófagos e outras células, como músculo liso, células de Kupffer (macrófagos presentes no fígado) e

hepatócitos, funcionando como um potente vasodilatador, o que favorece a comunicação entre as distintas células imunes durante a RFA (Bienvenu *et al.*, 2000; Prandota, 2005).

Acredita-se que a ativação do mecanismo de defesa do hospedeiro seja o fator desencadeador da modulação de enzimas metabolizadoras de xenobióticos durante os processos infecciosos e inflamatórios. Neste contexto, o envolvimento de endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias na regulação de CYP em camundongos tem sido estudado desde a década de 1980. Alguns desses estudos estão comentados a seguir.

3.1.2. Regulação de CYP por citocinas inflamatórias

A contribuição de Sasaki e colaboradores data de 1984, quando os autores descreveram que a administração de uma dose única de 5 mg/kg de LPS de *E. coli* a camundongos machos da linhagem ddY comprometia a atividade hepática de Cyp2e1, evidenciada pela reação de hidroxilação da anilina (anilina hidroxilase) e reduzia o teor total de CYP 24 h após o tratamento. Alguns anos mais tarde, Stanley e colaboradores (1988) observaram que o LPS também podia aumentar as atividades de CYP, e que o efeito ora inibidor, ora indutor, dependia da isoforma CYP avaliada, do pré-tratamento dos animais com indutores de CYP e da dose de endotoxina administrada. Ghezzi *et al.* (1986_a), por outro lado, trataram camundongos diretamente com o TNF recombinante (TNFr) e evidenciaram depressão das atividades da etoxi-cumarina-desetilase (ECOD, Cyp1a1/2, Cyp2b9/10) e hidroxilação do aril hidrocarboneto (*aryl hydrocarbon hydroxylase*, AHH, Cyp1a1/2). O maior efeito ocorria 24 a 48 h após o tratamento e era dependente da dose de TNFr administrada.

Moriya e colaboradores (2012) investigaram o efeito do LPS sobre as atividades e o mRNA de Cyps hepáticos em camundongos. A endotoxina causou considerável depressão da expressão de *cyp3a11*, *2c29*, *2c55* e *1a2*, e da atividade de Cyp3a previamente induzida pela pregnenolona-16-alfa-carbonitrila (PCN). Os níveis do mRNA de IL-1 β e TNF- α estavam elevados após o tratamento com a endotoxina, o que levou os autores a sugerirem que a regulação negativa de Cyp durante o processo inflamatório dependeria das citocinas inflamatórias hepáticas.

Estudos conduzidos em camundongos *knockout* (KO) para determinada citocina tem contribuído para associar o papel de uma citocina específica à regulação negativa de

CYP pela endotoxina. Como exemplos, citamos os trabalhos de Ghezzi *et al.* (1986_b), Shedlofsky *et al.* (1987), Warren *et al.* (1999) e Ashino *et al.* (2004).

O primeiro grupo de pesquisadores observou que o LPS (0,0025 mg/animal) administrado a camundongos C3H/HeJ (resistentes à endotoxina) não alterava a reação da ECOD, o que contrastava com a acentuada depressão (40%) que ocorria nos animais selvagens (*wild type*, WT), C3H/HeN, que recebiam o mesmo tratamento. No entanto, quando o soro dos animais WT tratados com a endotoxina era posteriormente administrado à linhagem resistente ao LPS, a depressão de ECOD se instalava. Para testar o envolvimento de IL-1 na depressão da reação da monooxigenase hepática (ECOD), IL-1 recombinante humana (IL-1r) e IL-1 purificada obtida de monócitos sanguíneos humanos foram administradas aos animais não responsivos à endotoxina. Os resultados avaliados 24 h após a injeção mostraram que ocorria a depressão da reação de ECOD e que, no caso da IL-1r, a depressão era dose-dependente (Ghezzi *et al.*, 1986_b). A administração à mesma linhagem murina WT, C3H/HeN, de uma dose de LPS (0,5 mg/kg) 200 vezes maior do que a administrada no estudo comentado anteriormente (Ghezzi *et al.*, 1986_b), de IL-1r murina e de uma preparação semi-purificada de IL-1 reduziu as atividades hepáticas da etoxiresorufina-*O*-desetilase (EROD, CYP1a1/2) e benzanfetamina-desmetilase (BDM, Cyp2b9/10), assim como os níveis totais de CYP 24 h após o tratamento. Nos animais resistentes à endotoxina, C3H/HeJ, o LPS não alterou os níveis ou as atividades de CYP, mas as duas formas de IL-1 utilizadas no estudo provocaram desfechos semelhantes aos observados nos camundongos WT. Os autores concluíram que a depressão das CYP hepáticas observadas poderiam estar associadas à produção de IL-1 desencadeada pela administração de LPS (Shedlofsky *et al.*, 1987). No estudo de Ghezzi e colaboradores (1986_a) anteriormente citado, o TNF α administrado à mesma linhagem de camundongos resistentes ao LPS (C3H/HeJ) usada no estudo de Shedlofsky *et al.* (1987) deprimiu as reações de ECOD e AHH usadas como marcadores de CYP, sugerindo que a citocina produzida por macrófagos exerce um papel regulador no metabolismo hepático.

Utilizando camundongos KO para IL-1 α/β , IL-6 e TNF- α tratados com LPS ou vacina BCG, Ashino *et al.* (2004) investigaram o envolvimento de cada uma dessas citocinas na regulação negativa de CYP após o estímulo imune, e concluíram que as citocinas IL-6 e TNF- α eram fatores de provável importância na regulação negativa dos mRNAs das *Cyps 3a11* e *2c29*. Em estudo desenvolvido em camundongos deficientes dos receptores do TNF do tipo 1 (R-TNF-p55) e do tipo 2 (R-TNF-p75) para avaliar o

papel do TNF- α na regulação da expressão de CYPs hepáticas mediante a administração do LPS, os autores concluíram que o TNF- α estava envolvido na regulação constitutiva de Cyp2d9 e 2e1, mas não teria papel de destaque na regulação negativa de Cyp1a, 2b, 3a e 4a desencadeada pelo LPS (Warren *et al.*, 1999).

Desde a década de 1980 estudos em humanos associaram o comprometimento da eliminação de fármacos à resposta imune. O comprometimento do *clearance* de fármacos foi demonstrado em mulheres saudáveis após a ingestão de duas doses consecutivas de LPS. É o que descreve Shedlofsky *et al.* em artigo publicado em 1997: a eliminação reduzida de antipirina (CYP1A2, 2C e 3A), hexobarbital (CYP2C) e teofilina (CYP1A2) acompanhava o aparecimento de níveis plasmáticos elevados de IL-6, TNF- α e proteína C reativa.

Alguns biofármacos possuem propriedades anti-proliferativas e anti-virais e são usados, com frequência, como é o caso do IFN, no tratamento da hepatite crônica do tipo C, esclerose múltipla e câncer. A administração do IFN com fins terapêuticos somada à produção das citocinas endógenas durante o decurso do processo inflamatório pode comprometer a eliminação de outros fármacos administrados concomitantemente. Alguns casos foram relatados. Exemplificando, a administração de IFN- α a pacientes portadores de hepatite crônica do tipo B reduziu a eliminação da teofilina (substrato de CYP1A2), enquanto o tratamento com o IFN- β provocou igual efeito em pacientes portadores da hepatite C (Williams *et al.*, 1987; Okuno *et al.*, 1993). Pacientes portadores de melanoma tratados com altas doses de IFN- α -2b (*High-dose IFN-alfa-2b therapy*, HDI) que receberam cafeína e mefenitoína como marcadores das atividades de CYP1A2 e 2C19, respectivamente, tiveram 60% e 40% de redução das atividades dessas CYP hepáticas (Islam *et al.*, 2002).

Da mesma forma que os interferons, as interleucinas são administradas com fins terapêuticos. O exemplo clássico é o tratamento do câncer em estado avançado com a IL-2 recombinante (IL-2r). Embora sejam escassos os dados clínicos dos efeitos da administração da IL-2r sobre o metabolismo hepático mediado por CYP, altas doses de IL-2 administradas a pacientes com metástases hepáticas de carcinoma de cólon e reto provocaram redução de mais de 30% do teor total de CYPs hepáticas e queda das atividades de CYP1A2, 2C, 2E1 e 3A4 (Elkahwaji *et al.*, 1999; Christensen & Hermann, 2012).

Vale destacar alguns estudos desenvolvidos com linhagens de células hepáticas murinas e hepatócitos humanos que reforçam a hipótese da participação de citocinas na

regulação de CYP. Paton e Renton (1998) estudaram o efeito do LPS sobre a atividade de EROD em células de hepatoma murino, Hepa1. Curiosamente, o LPS não alterava a reação mediada pela Cyp1a1, mas a adição de uma linhagem de macrófagos murinos, IC-21, à cultura de células de hepatoma tratada com a endotoxina, desencadeava a regulação negativa da Cyp1a1. Quando a pentoxifilina, inibidora de TNF- α , era adicionada ao conjunto de células de hepatoma, macrófagos e LPS, a atividade das monooxigenases voltava aos níveis basais. Adicionalmente, a adição direta do TNF α às células Hepa1 resultava na depressão da atividade da Cyp1a1, o que confirmava o papel do TNF na regulação negativa da Cyp1a1.

O tratamento de cultura de hepatócitos humanos com a IL-6 reduziu a expressão do mRNA de CYP1A2 e 3A4, impediu a regulação positiva de CYP1A2 pelo omeprazol, e da CYP3A4 pela rifampicina. O anticorpo anti-IL-6 adicionado ao sistema reverteu a depressão da atividade de CYP1A2 e bloqueou parcialmente a depressão da atividade de CYP3A4 provocadas pela IL-6 (Dickmann *et al.*, 2011).

Aitken e Morgan (2007) estudaram os efeitos do LPS, IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF- β (*transforming growth factor* β) e IL-1 sobre a expressão do mRNA de CYPs em hepatócitos humanos. Para efeitos de comparação, os autores avaliaram os efeitos sobre várias CYPs: CYP3A4, a CYP hepática mais abundante, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 e 2C18, que ocorre em níveis baixos no fígado. Os resultados mostraram que as respostas aos estímulos inflamatórios são reguladas independentemente: CYP2C18 não foi afetada pelos tratamentos, 2C9 e 2C19 foram deprimidas por IL-6 e TGF, CYP3A4 e 2C8 foram deprimidas por todos os tratamentos, enquanto o mRNA de CYP2B6 respondeu apenas ao IFN e à IL-6.

A expressão dos receptores nucleares que regulam CYP pode também ser modulada nos processos inflamatórios. Neste sentido, o estudo de Xu *et al.* (2004) mostrou que o LPS alterou os níveis hepáticos do mRNA do receptor PXR (*pregnane X receptor*) em camundongos. Além do mais, o LPS também regulou negativamente os níveis do mRNA de Cyp3a11 regulados positivamente pelo pré-tratamento com os indutores de PXR, dexametasona, rifampicina, mifepristona e fenobarbital. Richardson e Morgan (2005), no entanto, relataram que em camundongos KO para os receptores PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor* α) e PXR, os receptores nucleares estudados não estavam envolvidos na regulação da expressão de CYPs hepáticos pelo LPS.

A regulação de CYP na endotoxemia via PPAR- α foi investigada por Barclay *et al.* (1999). Como a indução da subfamília CYP4A por substâncias químicas requer a ativação do PPAR- α , os autores investigaram se a regulação positiva de CYP4A pelo LPS também envolveria este receptor. Usando camundongos WT e KO para PPAR- α (*PPAR- α -null*), os autores demonstraram que a regulação positiva renal de CYP4A nos animais WT pelo LPS também envolvia o receptor, uma vez que este efeito não foi observado nos KO. Como as substâncias que provocam a proliferação dos peroxissomos ativam as células de Kupffer, havendo estímulo para a produção de TNF, os autores sugeriram que vias inflamatórias estariam envolvidas na indução de CYP4A pelo LPS via PPAR- α .

O efeito do tratamento com o LPS sobre a expressão dos genes *PXR*, *cyp3a11* e *mdr1* na placenta de camundongos ICR foi estudado por Chen *et al.* (2005). Doze horas após a administração de diferentes doses da endotoxina às fêmeas no décimo sétimo dia gestacional, o RNA do tecido placentário foi extraído. Os resultados mostraram que a expressão dos três genes estudados foi deprimida pelo LPS. Duas horas após o tratamento das fêmeas grávidas com o LPS, a expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 estava também elevada.

O efeito da exposição de fêmeas grávidas ao LPS sobre o mRNA de *Cyp3a11* e a proteína *Cyp3a* nos fígados dos fetos foi estudado por Li *et al.* (2008_a). O mRNA e a proteína estavam deprimidos, enquanto os níveis da proteína TNF- α estavam elevados no fígado fetal quando avaliados. Curiosamente, o pré-tratamento com uma dose baixa (0,01 mg/mL) de LPS atenuava a depressão de *Cyp3a* e do receptor PXR provocada pelo LPS no fígado fetal.

Vale destacar, no contexto da regulação dos receptores nucleares na resposta inflamatória, o artigo de Gu e colaboradores, publicado em 2006, que causou grande impacto. Os autores demonstraram que o LPS e o TNF- α deprimiam o mRNA de CYP3A4 em cultura primária de hepatócitos. Em outro experimento em que os autores usaram células HepG2 transfectadas com os plasmídeos para a expressão do PXR humano, o envolvimento do PXR na regulação negativa do CYP3A4 pelo LPS e TNF- α , foi demonstrado, usando o ensaio do gene relator da luciferase. A hipótese que os autores levantaram foi que a interação do NF- κ B (liberado na cascata de sinalização celular durante o processo inflamatório) com o receptor RXR (*retinoid X receptor*, parceiro obrigatório de PXR no mecanismo de regulação gênica) impediria que o heterodímero PXR-RXR se ligasse aos elementos responsivos no DNA, impedindo a transcrição do gene *CYP3A4*.

3.1.3. Regulação da expressão e atividade de CYPs pelo óxido nítrico

Os primeiros relatos de estudos sobre a modulação das enzimas de biotransformação pelo óxido nítrico (NO) em camundongos datam da década de 1990. Sewer *et al.* (1998), por exemplo, investigaram o envolvimento do NO sobre a expressão dos genes *CYP* e suas atividades. Os autores mostraram que 24 h após o tratamento dos animais com o LPS, a expressão de *cyp2c29* e *3a11* estava deprimida tanto no camundongo WT quanto no KO, bem como os níveis das proteínas 2e1, 3a e 2c. Os animais WT que receberam LPS e o inibidor da iNOS, aminoguanidina (Ag), também apresentaram resultados semelhantes. Seis horas após o tratamento dos animais KO para iNOS com o LPS, não foram observadas alterações das atividades da testosterona 16- β hidroxilase, nem mesmo nos camundongos que receberam o co-tratamento com a Ag. Atividades reduzidas de testosterona 15- α e 16- β hidroxilase foram observadas nos camundongos WT 24 h após a administração de LPS, efeito não observado nos KOs. Mediante esse conjunto de dados, os autores concluíram que a regulação de proteínas e mRNA de Cyp3a, 2c e 2e1 em camundongos endotoxêmicos independe do NO, embora admitam que o NO liberado durante uma endotoxemia pode causar depressão da atividade de algumas CYP.

Outro estudo do grupo do Morgan usando camundongos WT e KO para iNOs (Li-Masters & Morgan, 2002) e uma ampla faixa de doses de LPS, de 0,3 a 10 mg/kg, revelou resultados diferentes de depressão de mRNA e proteínas Cyp2b induzidas pelo fenobarbital. Os efeitos variavam com a dose de LPS administrada, com o tempo de tratamento e o animal utilizado, WT ou KO. Os autores concluíram após a análise dos dados, que não existia um mecanismo dependente de NO para a depressão da proteína Cyp2b9 em camundongos, diferentemente do que foi observado no rato.

São escassos os estudos sobre o papel do NO na regulação de CYP por endotoxinas em camundongos. A grande maioria dos estudos foi realizada em ratos, e alguns foram desenvolvidos em culturas de células de camundongos, sendo comentados adiante.

Gharavi e El-Kadi (2007) investigaram o papel do NO na modulação de Cyp1a1 em células murinas, Hepa1c1c7, desencadeada pelo TNF- α ou LPS. Neste estudo, os aumentos observados tanto da expressão da iNOS quanto da produção de NO dependiam da concentração do TNF ou do LPS, e eram completamente inibidos pelo inibidor da iNOS, L-N6-(1-iminoethyl) lysine (L-NIL). Além do mais, o TNF e o LPS impediam a

indução de Cyp1a1 provocada pela β -naftoflavona. Após analisar os resultados encontrados, os autores levantam a hipótese de o NO estar envolvido na regulação negativa da Cyp1a1 mediada pelo LPS e TNF- α .

Nakamura *et al.* (1998) estimularam macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 com o LPS e IFN- γ , indutores da iNOS e de citocinas nas células, e observaram uma depressão de Cyp4a, mas não de Cyp2a ou Cyp2b.

3.1.4. Regulação de Cyp2a5/2A6 na resposta inflamatória

Tem sido concedida especial atenção à regulação de Cyp2a5/CYP2A6 durante o processo inflamatório e na hepatotoxicidade. Em artigo de 1994, Kirby e colaboradores associaram a infestação de hamsters machos pelo trematódeo *Opisthorchis viverrini* à elevada expressão do Cyp2a5 hepático. A maior contribuição dos autores no contexto regulação positiva de Cyp2a5 X inflamação foi a evidencia, neste estudo, de que o aumento de Cyp2a5 ocorria nos hepatócitos adjacentes às áreas de inflamação.

Posteriormente, usando a cumarina como marcador (*probe drug*) para a CYP2A6 humana, Satarug *et al.* (1996) sugeriram que os pacientes com infecção crônica pelo *O. viverrini* e portadores de fibrose do duto biliar intra-hepático tinham elevação da expressão de CYP2A6, uma vez que a eliminação do metabólito da cumarina, 7-hidroxycumarina, era superior nestes pacientes, quando comparada aos pacientes infectados sem presença de fibrose do duto biliar e aos indivíduos não infectados. Após o tratamento dos pacientes infectados com praziquantel, houve redução significativa da eliminação do metabólito entre os grupos infectados, sem que a eliminação se alterasse nos indivíduos que não tinham a infecção.

Recentemente, o aumento dos níveis de mRNA e da proteína, bem como das atividades de CYP2A6, foi demonstrado em estudo envolvendo 13 pacientes portadores de colangiocarcinoma (CCA) associado à infestação pelo *O. viverrini* (Yongvanit *et al.*, 2012). Este estudo demonstrou a especificidade da regulação positiva do CYP2A6 pela infecção, visto que os níveis de proteína e as atividades de CYP2E1 estavam deprimidos, enquanto o mRNA não estava alterado.

A infecção de camundongos com o parasito hepático *Fasciola hepatica* também foi associada à indução de Cyp2a5. Montero *et al.* (1999) observaram aumento da

atividade da isoforma no fígado dos animais, o que foi confirmado pela análise imuno-histoquímica do órgão inflamado.

Em camundongos naturalmente infectados com o *Helicobacter hepaticus*, que desenvolvem uma hepatite crônica que pode evoluir para o carcinoma hepatocelular, Chomarat e colaboradores (1997) observaram, por análise imuno-histoquímica, o aumento de Cyp2a5 e 1a, que aumentava com a idade dos animais e com a evolução da lesão. Estudo semelhante foi publicado pelo mesmo grupo no mesmo ano (Sipowicz *et al.*, 1997).

Em modelo de camundongos transgênicos devido à incorporação do DNA do vírus da hepatite B, que desenvolvem lesão necro-inflamatória aguda grave, Chemin *et al.* (1996) observaram por meio de análise imuno-histoquímica que Cyp2a5 e Cyp1a estavam induzidos, enquanto nenhuma alteração, ou apenas pequenas alterações, eram observadas para as Cyps 2b, 2c, 2e e 3a.

Wastl *et al.* (1998) observaram em experimentos de carcinogênese experimental induzida quimicamente em camundongos, que embora a intensidade do desenvolvimento tumoral diferisse entre as linhagens C57BL/6J, C3H/He e B6C3F1 estudadas, o fenótipo de super-expressão de Cyp2a5 era semelhante, estava presente em 90% dos adenomas e carcinomas hepatocelulares produzidos experimentalmente e em 50% dos focos tumorais de desenvolvimento espontâneo.

A estimulação do sistema imunológico de camundongos com LPS bacteriano foi modelo usado por Gilmore *et al.* (2003) para estudar os mecanismos que embasam a regulação positiva do Cyp2a5 no processo inflamatório. Os autores usaram o modelo de lesão hepática provocada pelo pirazol para efeito de comparação, e observaram que o tratamento com este agente hepatóxico provocava aumentos significativos nos níveis de mRNA e proteína Cyp2a5, bem como da atividade catalítica. No entanto, a endotoxina provocou o efeito oposto, deprimindo mRNA, proteína e atividade enzimática. Quando as citocinas murinas recombinantes IL-1 e IL-6 foram administradas aos animais, nenhum efeito sobre Cyp2a5 foi observado. A elevação dos níveis séricos da transaminase ALT após a administração de pirazol mostrou-se superior ao produzido pela injeção de LPS, evidenciando que o pirazol produziu danos hepáticos muito mais expressivos do que a endotoxina.

Em 2000, usando modelo de inflamação asséptica induzida pela turpentina em camundongos KO para IL-6, Siewert e colaboradores (2000) concluíram que a citocina tinha papel importante na regulação negativa de *cyp2a5*, *1a2* e *3a11*, sendo a inibição do

mRNA de *cyp2a5* a mais dependente de IL-6. Durante o processo inflamatório desencadeado pelo LPS nos camundongos KO para IL-6, no entanto, ocorria depressão de Cyp, sugerindo que o papel depressor de IL-6 sobre Cyp poderia ser substituído por outras citocinas ou mediadores inflamatórios no modelo de inflamação endotoxêmica.

Em amostras de fígados humanos normais e portadores de hepatite e cirrose, Kirby *et al.* (1996) testaram a hipótese de que o processo inflamatório aumenta a expressão de isoformas CYP específicas. Nos cortes de fígados infectados pelo vírus da hepatite B ou da hepatite C, a expressão de CYP2A6 estava acentuadamente elevada nos hepatócitos adjacentes às áreas de fibrose e inflamação, enquanto CYP3A4 e 2B1 estavam menos induzidas, e CYP1A2 estava inalterada.

A análise imuno-histoquímica de uma série de amostras de hepatocarcinoma humano revelou que o aumento da expressão da proteína CYP2A6 estava associado à inflamação crônica e a cirrose (Raunio *et al.*, 1998).

A expressão e também a atividade de CYP foi estudada em outra série de amostras de fígado humano com doença inflamatória. Pacientes com diferentes graus da doença gordurosa hepática não alcoólica (*non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) foram analisados quanto a atividade enzimática, expressão de mRNA e proteína. Os resultados mostraram que a atividade e a expressão de CYP2A6 eram significativamente induzidas com a progressão da doença, enquanto CYP1A2, 2D6 e 2E1 eram deprimidas. Como também foi observada a expressão elevada de TNF- α e IL-1 β , os autores sugeriram que as citocinas poderiam estar envolvidas na depressão de CYP (Fisher *et al.*, 2009).

Em hepatócitos humanos, o envolvimento de diferentes citocinas na depressão de CYP foi estudado por Guillén *et al.* (1998). O potencial inibitório da oncostatina M (citocina) foi comparado ao de outras citocinas que pertencem à família de receptores da IL-6 (IL-6, IL-11 e fator inibidor de leucemia, *leukemia inhibitory factor*, LIF), ao IFN- γ e ao fator estimulador de colônias de granulócitos (*granulocyte colony-stimulating factor*, GCSF, citocina que compartilha homologia estrutural com a família IL-6, mas que difere no sinal de transdução). A depressão das atividades de CYP2A6, 2B6, 3A4 e 1A2 foi superior para a oncostatina M, seguida pelo IFN- γ e IL-6. Os autores concluíram que a oncostatina M era a citocina mais eficaz na depressão das isoformas CYP em hepatócitos humanos, sendo o seu efeito ainda evidente mesmo após a sua remoção da cultura de células.

3.1.5. Inibição farmacológica da resposta inflamatória

3.1.5.1. Inibição da síntese de citocinas

O TNF- α é o principal mediador da resposta inflamatória aguda. Durante uma resposta normal de defesa do hospedeiro mediante a ameaça infecciosa ou traumática, o TNF- α ocorre em baixas concentrações na circulação sanguínea e exerce efeito protetor. No entanto, quando concentrações séricas muito altas são atingidas, eventos de autoimunidade e malignidade podem sobrevir. Durante uma septicemia por bactérias Gram-negativas, por exemplo, ocorre uma produção excessiva de TNF- α , podendo culminar em choque circulatório e morte (Pfeffer *et al.*, 1993, Tracey *et al.*, 1995, Barbara *et al.*, 1996 *apud* Alexandre-Moreira *et al.*, 2005). Este papel do TNF- α sobre o desfecho fatal de uma infecção foi demonstrado em um estudo, em que animais previamente tratados com a pentoxifilina (anti-inflamatório inibidor de TNF- α) ou com anticorpos anti-TNF- α recombinante humano (rhTNF- α) e, posteriormente estimulados com o LPS tinham os níveis séricos de TNF deprimidos e maior sobrevivência (Noel *et al.*, 1990; Mandell, 1988 *apud* Monshouwer *et al.*, 1996).

Os fármacos que inibem a produção de TNF- α , como os imunossuppressores ciclosporina A e dexametasona, provocam considerável toxicidade. A talidomida, usada no tratamento de algumas doenças inflamatórias devido principalmente à sua ação inibitória sobre a produção do TNF- α , tem sido utilizada para o tratamento do eritema nodoso na hanseníase, lupus eritematoso, mieloma múltiplo e outras doenças, mas é também um potente teratogêno e causa outros efeitos adversos importantes, como neuropatia periférica e trombose venosa.

A pentoxifilina, (1-(5'-oxohexil)-3,7-dimetilxantina), por outro lado, é um inibidor não específico (e não competitivo) da fosfodiesterase, que é usado clinicamente no tratamento de doenças vasculares periféricas. Tem sido documentado que a pentoxifilina também possui uma ampla gama de atividades imunomoduladoras, incluindo a regulação negativa da síntese de TNF- α (suprimindo a transcrição do gene) em macrófagos e monócitos. Experimentos *in vivo* mostraram que a pentoxifilina inibe o aumento de TNF- α em resposta à endotoxina e também atenua a elevação de IL-12.

Além desses efeitos anti-inflamatórios é descrito que a pentoxifilina (PTX) promove o sequestro de radicais livres, atenuando o estresse oxidativo. A inibição crucial dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B resulta na inibição adicional de outras citocinas

pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-8. Um mecanismo de ação anti-inflamatório e citoprotetor adicional foi atribuído à PTX, com base em experimentos realizados com células de fibrosarcoma L292 que mostraram que o fármaco induz a expressão da hemoxigenase 1 (HO-1) (Melo *et al.*, 2008; Taha *et al.*, 2009).

Vários estudos evidenciaram que a PTX bloqueia a produção do TNF- α em modelos *in vivo* de inflamação. Alguns exemplos são comentados a seguir.

Melo e colaboradores (2008) utilizaram a PTX, nas doses de 1,7, 5 e 15 mg/kg de peso corporal, para esclarecer no modelo murino (*Swiss Webster*) de mucosite intestinal provocada pelo irinotecan (CPT-11), se o aparecimento de diarreia tardia, efeito colateral do tratamento de pacientes com câncer, envolvia a produção das citocinas TNF- α e IL-1 β . Os autores verificaram que a PTX inibia a diarreia tardia provocada pelo CPT-11 e que a menor dose utilizada (1,7 mg/kg de peso corporal) era suficiente para reduzir significativamente os níveis de TNF- α e IL-1 β nos tecidos, sendo esta dose de PTX mais eficaz do que o tratamento com talidomida (60 mg/kg), que deprimiu os níveis do TNF- α , mas não os da IL-1 β .

Li *et al.* (2008_b), empregaram a PTX (100 mg/kg peso corporal) para investigar (em camundongos da linhagem ICR) o papel do TNF na regulação da HO-1 hepática nos fetos cujas mães haviam sido tratadas com LPS. A dose utilizada por Li *et al.* foi eficaz na redução do TNF, tanto no soro das mães quanto no líquido amniótico.

Monshouwer e colaboradores (1996) haviam demonstrado em ratos (Sprague-Dawley) machos adultos que duas injeções de 100 mg/kg de PTX, administradas concomitantemente com o LPS (0,5 mg/kg), restauram parcialmente as atividades de etoxi-resorufina-*O*-desetilase (EROD, Cyp1a1) e pentoxiresorufina-*O*-despentilase (PROD, Cyp2b1/2), mas não alteram a depressão das atividades da *p*-nitrofenol-hidroxilase (PNPH, CYP2E1) e da eritromicina *N*-desmetilase (ERMD, Cyp3a) pela endotoxina. Em relação ao teor total de CYPs na fração microsomal hepática, a PTX não reverteu a diminuição causada pelo tratamento com LPS.

Como a pentoxifilina bloqueia os aumentos da síntese de TNF- α e de outras citocinas pró-inflamatórias induzidos pelo LPS, utilizamos este fármaco para investigar se a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias é evento necessário para a regulação negativa das enzimas do citocromo P450 em decorrência do tratamento com LPS. Como Monshouwer *et al.* (1996) haviam verificado que a PTX, na dose de 200 mg/kg de peso corporal, não interferia com as atividades das monooxigenases hepáticas em ratos, selecionamos esta dose para o nosso estudo em camundongos.

3.1.5.2. Inibição da produção do NO

A inibição farmacológica da iNOS (ou NOS2) tem sido uma das estratégias usadas na pesquisa científica para estabelecer o papel do NO na regulação de CYP em estudos *in vivo* e *in vitro*. Alguns desses estudos desenvolvidos pelo grupo de Oleg Khatsenko em ratos e camundongos imune-estimulados destacaram-se na década de 1990 (Khatsenko *et al.*, 1993, 1997, 1998). Em estudos *in vitro* com microsossomos hepáticos de ratos, Khatsenko *et al.* observaram que o tratamento com uma substância doadora de NO, 3-morfolinossidnonimia *N*-etilcarbamida (SIN-1), inibia a atividade de Cyp2b1/2. Quando microsossomos de embrião de galinha e de rato pré-tratados com os indutores de CYP, fenobarbital, β -naftoflavona e 3-metilcolantreno, eram incubados com a iNOS e co-fatores, as atividades de CYP eram inibidas. Essa inibição, no entanto, era revertida com o co-tratamento com uma substância inibidora de NO, *N*-metil-L-arginina (NMA). Os estudos *in vivo* mostraram que o co-tratamento de ratos com LPS e *N*^o-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), inibidor da iNOS, revertia a inibição de CYP que era provocada quando os animais recebiam apenas o LPS. Os níveis séricos de NO que eram elevados após o tratamento com a endotoxina eram também revertidos quando os animais recebiam o co-tratamento, LPS e L-NAME (Khatsenko *et al.*, 1993). Em artigo de 1997, Khatsenko e Kikkawa mostraram em ratos que o NO não inibia apenas as atividades de CYP, mas também o mRNA e os níveis de proteína 24 h após tratamento com o LPS. A inibição da iNOS com a L-NAME ou a Ag revertia os níveis plasmáticos de NO elevados (em até 20 vezes os valores basais) pelo LPS e recuperava os valores basais das atividades catalíticas de CYP e os níveis de proteína e mRNA. Os autores concluíram que o NO poderia ser o mediador da inibição das isoformas hepáticas CYP2C11, 3A2, 1A2 e 2B1/2 pelo LPS em ratos Sprague-Dawley.

Em camundongos BALB/c(H-2d), Khatsenko e colaboradores (1998) investigaram no modelo de infecção pela *Chlamydia trachomatis* se o NO estava envolvido na alteração do metabolismo hepático mediado por CYP. A elevação dos níveis plasmáticos de NO coincidia com a depressão da atividade de EROD, e ambas as alterações eram revertidas pela L-NAME. A infecção também alterava a atividade hepática de Cyp2b9/10 (PROD e BROD), que era revertida pela L-NAME. Os autores concluíram que o NO estava associado à depressão do metabolismo hepático mediado por CYP na infecção pela *C. trachomatis*.

Morgan e colaboradores mostraram resultados que contestam os do grupo de Khatsenko. O artigo de Sewer, Barclay e Morgan (1998) conduzidos em camundongos WT e KO para iNOS mostraram que, após 24 h de tratamento com o LPS, as atividades, e os níveis de mRNA e proteína estavam deprimidos em ambas as linhagens. Nos animais que haviam recebido o co-tratamento LPS mais Ag, embora as atividades não estivessem alteradas, os níveis de mRNA e proteína estavam igualmente deprimidos. Após 6 h de tratamento, os animais WT tinham as atividades enzimáticas deprimidas, enquanto nos KO e nos animais co-tratados com LPS e Ag, as atividades não estavam alteradas. Os autores concluíram que a depressão de proteínas e mRNA das sub-famílias 2c e 3a, e da isoforma Cyp2e1, independe do NO liberado durante o quadro endotoxêmico.

Posteriormente, o grupo de Morgan (Ferrari *et al.*, 2001) investigou o papel do NO sobre a regulação de Cyp2b1 pelo LPS em hepatócitos de ratos. Os autores descreveram dois mecanismos para explicar a depressão de Cyp2b1 pela endotoxina: um mecanismo rápido de depressão da proteína dependente de NO, que ocorre mediante altas concentrações de LPS, e um mecanismo de supressão pré-traducional mais lento, independente de NO, que ocorre com baixas concentrações da endotoxina.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi investigar se a regulação negativa da expressão e atividade de CYPs no fígado em resposta a endotoxina (LPS de *E.coli*) estaria associada à elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e do óxido nítrico (em decorrência da indução da enzima óxido nítrico sintase 2 ou NOS2). Este trabalho é parte de uma linha de estudo do laboratório voltada para identificação do elo (ou elos) que articula(m) a resposta de defesa do hospedeiro à infecção (e inflamação) com a modulação da expressão e atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos, com ênfase nas isoformas citocromo P450.

3.2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Verificar se as elevações dos níveis do TNF e outras citocinas e do NO são eventos necessários para a modulação das atividades de Cyp2a5, Cyp1a1/2, Cyp2b9/10 pelo LPS em camundongos (DBA-2). Neste sentido investigamos o efeito do tratamento com pentoxifilina sobre a resposta a uma ampla faixa de doses (0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal) de LPS evidenciando:
 - As alterações da atividade da Cyp2a5 na fração microsomal hepática;
 - As alterações das atividades de Cyp2b9/10 e Cyp1a1/2 na fração microsomal hepática;
 - As alterações dos níveis de TNF e de outras citocinas no soro;
 - As alterações dos níveis de óxido nítrico no soro.
- Verificar se a elevação dos níveis séricos do óxido nítrico (NO) teria efeito direto sobre a atividade das CYPs empregando a aminoguanidina, um inibidor da óxido nítrico sintase induzível (NOS2).

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem DBA-2, com idades entre oito e doze semanas de vida, fornecidas pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório, (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz.

Ao chegarem ao laboratório, as fêmeas foram alojadas em grupos de seis por gaiola. Foi respeitado um período de aclimatação de (uma a três semanas) antes do início dos experimentos. No biotério e salas de experimentação, a temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade (aproximadamente 70%) e ciclo claro/escuro de 12 horas foram mantidos constantes. As trocas das camas de maravalha (de pinho branco), água filtrada e ração (Nuvital® - Nuvital CR1, Curitiba, PR, Brasil) foram realizadas três vezes por semana, sendo a água e a ração fornecidas *ad libitum*.

O estudo foi examinado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ (protocolo CEUA P-84/10-7)

3.3.2. Experimento para avaliar o efeito do co-tratamento com pentoxifilina sobre a modulação da atividade de CYPs pelo LPS

Os animais foram destinados aleatoriamente a um de dezesseis grupos experimentais (*i.e.*, LPS: 0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal, sem e com co-tratamento com pentoxifinina 100 mg/kg de peso corporal x 2). O LPS e a pentoxifina foram administrados por via i.p. (volume 10 mL/kg de peso corporal) e a eutanásia foi realizada 24 h após o tratamento com LPS. Os grupos foram os seguintes:

- Grupo I: controle, *i.e.* camundongos tratados apenas com o veículo (salina tamponada - PBS) usado para a pentoxifilina (PTX);
- Grupos II a VIII: camundongos tratados por via ip com LPS de *E. coli* (sorotipo 0127:B8, Sigma L3129, Lotes: 055K4064 e 020M4062) nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal;

- Grupo IX: camundongos que receberam PTX (Sigma P1784 – Lote: 065K1044) em duas injeções (2x 100 mg/kg de peso corporal), com 60 minutos de intervalo;
- Grupos X a XVI: co-tratamento com PTX, *i.e.*, LPS nas doses mencionadas + PTX 200 mg/kg de peso corporal (em duas injeções de PTX 100 mg/kg de peso corporal; uma 30 minutos antes e a outra 30 minutos depois da injeção de LPS).

O número de animais usados nos experimentos que avaliam o efeito do co-tratamento com pentoxifilina e LPS e as determinações realizadas estão apresentados abaixo, na **Tabela 3.1**.

3.3.2.1 Soluções

As soluções de PBS, LPS e PTX foram diluídas imediatamente antes da administração. Soluções estoques de PBS (10x) e LPS (50 mg/mL) foram armazenadas a 4 °C e a - 20 °C, respectivamente. No momento da injeção, as soluções estoque foram diluídas, PBS de 1:10 em água milliQ, e LPS, em salina 0,9%.

3.3.2.1.1 Diluição do LPS

O LPS foi diluído de modo a obter solução estoque de 50 mg/mL em salina 0,9%, preparada com ajuda de banho de ultrassom por 30 min. Alíquotas de 20 µL foram distribuídas em tubos tipo *ependorff* e congeladas a - 20°C. No momento de uso, a solução estoque foi levada ao ultrassom por 30 min e, em seguida, diluída em salina 0,9% para administrar a dose desejada.

3.3.2.1.2 Solução de pentoxifilina (PTX)

A PTX foi diluída em PBS no momento da administração aos animais. A dose (100 mg/kg de peso corporal por injeção). A divisão da dose total (200 mg/kg de peso corporal) em duas administrações (30 minutos antes e 30 minutos depois do tratamento com LPS) seguiu o esquema adotado por Monshouwer e colaboradores (1996).

Tabela 3.1. Efeito do tratamento com pentoxifilina sobre os níveis séricos de citocinas, NO e atividade de Cyp2a5, Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 pelo LPS. Número de animais (N) por grupo e determinação.

Grupo	Determinações dos níveis séricos (citocina, NO) ou da atividade de mono-oxigenases na fração microssomal hepática (Cyp)		
	Citocinas	NO	CYP
	(N)	(N)	(N)
CON 1 - PBS	10	19	13
LPS 0,05	8	10	6
LPS 0,1	8	10	6
LPS 0,5	8	17	10
LPS 1	8	10	6
LPS 5	8	16	9
LPS 10	8	14	9
LPS 20	10	12	13
CON 2 - PTX	8	14	5
PTX+LPS 0,05+PTX	8	10	6
PTX+LPS 0,1+PTX	8	10	6
PTX+LPS 0,5+PTX	8	16	10
PTX+LPS 1+PTX	8	10	6
PTX+LPS 5+PTX	8	17	8
PTX+LPS 10+PTX	8	18	9
PTX+LPS 20+PTX	8	14	8

CON1: controle (PBS 10 mL/kg de peso corporal); LPS (endotoxina de *Escherichia coli* em doses que variaram de 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal); CON2: pentoxifilina (PTX, 2x100 mg/kg de peso corporal, com intervalo de 60 min); PTX + LPS (PTX 2x100 mg/kg de peso corporal + LPS, doses de 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal); NO (óxido nítrico); citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10); CYP (COH, Cyp2a5, EROD, Cyp1a1/2 e BROD, Cyp2b9/10).

3.3.3. Experimento para avaliar o efeito do bloqueio da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) sobre a modulação da atividade de CYPs pelo LPS

Para avaliar o papel do óxido nítrico (NO) na regulação da atividade hepática de Cyp2a5, utilizamos um fármaco inibidor da NO-sintase induzível (iNOS ou NOS2), a aminoguanidina (Ag). Para efeitos de comparação, também avaliamos as atividades hepáticas de Cyp2b9/10 e Cyp1a1/2. Os níveis de NO foram determinados no soro dos animais.

Os animais, distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais, receberam injeções por via i.p (10 mL/kg) e foram mortos 24 h após o tratamento. Os animais que receberam os co-tratamentos (Ag+LPS) foram mortos 24 h após a dose de LPS.

- Grupo I: controle negativo (salina tamponada, PBS, veículo para a aminoguanidina, Ag);
- Grupos II: LPS de *Escherichia coli* (sorotipo 0127:B8, Sigma L3129, Lote 020M4062) na dose de 10 mg/kg de peso corporal;
- Grupos III e IV: Ag (Sigma A7009 – Lote: 093K0039) nas doses de 50 e 100 mg/kg de peso corporal, respectivamente;
- Grupos V e VI: co-tratamentos de Ag+LPS nas doses acima mencionadas (Ag 30 min antes do LPS).

O número de animais usados nos experimentos que avaliam o bloqueio da NOS2 sobre a modulação da atividade de CYPs pelo LPS e as determinações realizadas estão apresentados na **Tabela 3.2**.

3.3.3.1. Soluções

As soluções de PBS, LPS e Ag para o tratamento dos animais foram preparadas no momento de uso. As soluções de PBS e LPS foram preparadas como descrito acima.

3.3.3.1.1. Solução de aminoguanidina

A aminoguanidina foi preparada no momento do uso, pesando as quantidades necessárias de Ag em balança de quatro casas decimais e diluídas em PBS 1X para obter as doses de 50 e 100 mg/kg de peso animal.

Tabela 3.2. Efeito da inibição da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS2) sobre a atividade das CYPs. Número de animais (N) por grupo e determinação.

Grupo	Determinações	
	NO (N)	CYP (N)
CON	5	7
Ag50	6	6
Ag100	6	6
LPS 10	5	9
Ag 50 + LPS 10	6	6
Ag 100 + LPS 10	6	6

CON: controle (PBS 10 mL/kg peso corporal); LPS (endotoxina de *Escherichia coli* na dose de 10 mg/kg de peso corporal); Ag (aminoguanidina nas doses de 50 e 100 mg/kg de peso corporal); Ag + LPS (aminoguanidina nas doses de 50 ou 100 mg/kg de peso corporal + LPS 10 mg/kg de peso corporal); NO (óxido nítrico); CYP (COH, Cyp2a5, EROD, Cyp1a1/2 e BROD, Cyp2b9/10).

3.3.4. Eutanásia dos animais, coleta de sangue e fígado

Vinte e quatro horas após o tratamento com LPS ou seu veículo (PBS), os animais foram mortos por deslocamento cervical, sendo o fígado rapidamente removido e transferido para a uma placa de Petri resfriada em banho de gelo. Após remoção cirúrgica de gordura e tecido não hepático, o órgão foi pesado, envolto em papel alumínio e armazenado congelado em nitrogênio líquido até o momento do preparo da fração microsomal.

Imediatamente antes da eutanásia, o sangue foi coletado do plexo orbital do animal para quantificação dos níveis séricos de citocinas e/ou NO. O soro foi separado por centrifugação a 9.000 X g por 10 min, duas vezes, em centrífuga *eppendorf Minispin®*, distribuído em criotubos e armazenado em nitrogênio líquido até o momento das análises.

3.3.5. Determinação dos níveis de citocinas no soro sanguíneo

A determinação dos níveis de citocinas nas amostras de soro foram realizadas com a ajuda e supervisão do Pesquisador Paulo Renato Totino do Laboratório de Pesquisa em Malária do IOC / FIOCRUZ.

Para determinação dos níveis de citocinas nas amostras de soro foi usado o *kit* comercial da *Becton & Dickinson® – BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/TH17 Cytokine Kit*, (Referência 560485) para IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF, IL-17A e IL-10. O procedimento seguiu em linhas gerais as instruções do fabricante, com uma exceção, *i.e.*, foram feitas adaptações para redução do volume de soro a metade do indicado (25 μ L). As amostras foram lidas em citometro de fluxo *FAC Scalibur* da plataforma da FIOCRUZ e usando o programa *Cell Quest software*. Para a análise dos resultados, usamos o programa *FCAP Array Software*, de acordo com as recomendações do guia para análise de dados a partir do *kit* BD CBA. Os resultados foram expressos em pg/mL para cada uma das citocinas avaliadas no estudo.

3.3.6. Quantificação dos níveis de óxido nítrico no soro

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

3.3.6.1 Curva padrão de nitrito

A construção da curva de nitrito teve início preparando-se uma solução de nitrito de sódio 0,2 mM em água milliQ. 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 μ M. As diferentes diluições foram transferidas (50 μ L) a micropoços de uma placa de 96 poços e ao branco foi adicionado água milliQ, sempre em triplicata.

Em seguida, foi adicionado aos poços da microplaca, o reagente de Griess (50 μ L), preparado como uma solução constituída de partes iguais de sulfanilamida 2% em

ácido fosfórico 5%, dicloridrato de N-1-naftilenodiamino (NEED) 0,2% em água milliQ, ácido fosfórico 5% em água milliQ e água milliQ. A microplaca foi, então, levada à leitura da absorvância em espectrofotômetro para leitura em microplacas (*Spectramax Plus - Molecular Devices*®), com comprimento de onda fixado em 540 nm, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®.

3.3.6.2. Curva padrão de nitrato

A 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 0,4 mM até 0,3906 µM. As diferentes 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 (4 U/L), NADPH (0,1 mg/mL), tampão KH₂PO₄ 40 mM pH 7,5 e água milliQ foram acrescentados a todos os poços da microplaca, que foi levada à incubação *overnight* a 37°C.

Ao final do período de incubação foi adicionado o reagente de Griess (80 µL) a todos os poços, e a absorvância registrada em espectrofotômetro para microplacas (*Spectramax Plus - Molecular Devices*®), com comprimento de onda fixado em 540 nm, usando o *software Softmax Pro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®.

3.3.6.3. Quantificação de nitrito nas amostras de soro

Nos demais poços da microplaca (96 poços) usada para construir a curva padrão de nitrato foram adicionados, também em triplicata, 40 µL das amostras de soro e 40 µL do coquetel contendo a nitrato redutase. Ao final do período de incubação a 37 °C, o reagente de Griess foi adicionado e a leitura da absorvância ocorreu como descrito acima para as curvas padrão de nitrito e nitrato.

3.3.7. Preparo da fração microsomal hepática

O método de preparo da fração microsomal foi o mesmo descrito no capítulo anterior, seguindo as recomendações de De-Oliveira *et al.* (2010). Ao final do

procedimento, alíquotas das amostras foram distribuídas em tubos para criogenia e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento de uso.

3.3.8. Quantificação de proteínas na fração microsomal

A concentração de proteínas na fração microsomal de cada amostra foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), adaptado para microplaca, conforme detalhado no capítulo anterior.

3.3.9. Determinação das atividades enzimáticas

3.3.9.1. Cumarina 7-hidroxilase (COH)

As atividades da COH, marcador para a Cyp2a5, foram determinadas na fração microsomal hepática, segundo o método descrito por van Iersel *et al.* (1994) com algumas alterações tal como relatado no capítulo anterior. A atividade enzimática foi expressa como picomoles de umbeliferona / miligrama de proteína / minuto.

3.3.9.2. Alcoxi-resorufina-O-desalquilases: EROD e BROD

Como anteriormente descrito (capítulo II), as atividades da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) e benziloxiresorufina-O-desbenzilase (BROD) foram determinadas na fração microsomal hepática, de acordo com o método relatado por Burke *et al.* (1985), adaptado para reações e determinações em microplaca, segundo Kennedy & Jones (1994) e De-Oliveira *et al.* (2006). As atividades de EROD (marcador de Cyp1a1/2) e BROD (marcador para Cyp2b9/10) foram expressas como picomoles de resorufina / miligrama de proteína / minuto.

3.3.10. Análise estatística

A comparação estatística para as variáveis que apresentaram distribuição normal (paramétrica) foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal os grupos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Efeito do tratamento com a pentoxifilina e bloqueio da produção de citocinas sobre a modulação da atividade de Cyp2a5 pelo LPS

3.4.1.1. Determinação dos níveis séricos de citocinas

As concentrações do TNF, IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17A, IL-4 e IL-10 no soro dos camundongos foram determinadas tal como descrito nos métodos. Os resultados dessas análises mostraram que o tratamento dos animais com o LPS promoveu, de maneira dose dependente, aumento dos níveis das citocinas em relação ao observado no soro sanguíneo dos camundongos que não foram tratados com a endotoxina (**Figura 3.1**). Os níveis de IFN- γ e IL-6 aumentaram, em relação aos níveis registrados em camundongos controles não tratados, a partir da menor dose de LPS testada, ou seja, 0,05 mg/kg de peso corporal. Vinte quatro horas após tratamento com a maior dose de LPS (20 mg/kg de peso corporal) os níveis das duas citocinas (IFN- γ e IL-6) nos animais tratados eram mais de 1000 vezes os níveis registrados nos animais (controles) que não receberam a endotoxina. Os níveis de IL-17A e IL-10 estavam aumentados a partir da dose de 5 mg/kg de LPS. Entre os tratados com a dose de 0,1 mg/kg, foi observado um aumento de IL-10. Em doses superiores a 1 mg/kg de peso corporal, as concentrações séricas de IL-2 estavam aumentadas (exceto na dose de 10 mg/kg de peso corporal), enquanto elevação de IL-4 só foi constatada entre os animais que receberam a dose de 0,1 mg/kg de peso corporal (**Figura 3.1**). Os resultados mostram que os aumentos das citocinas classificadas como pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-2 e 17A), foram de magnitude maior do que os das citocinas consideradas anti-inflamatórias (IL-4 e 10).

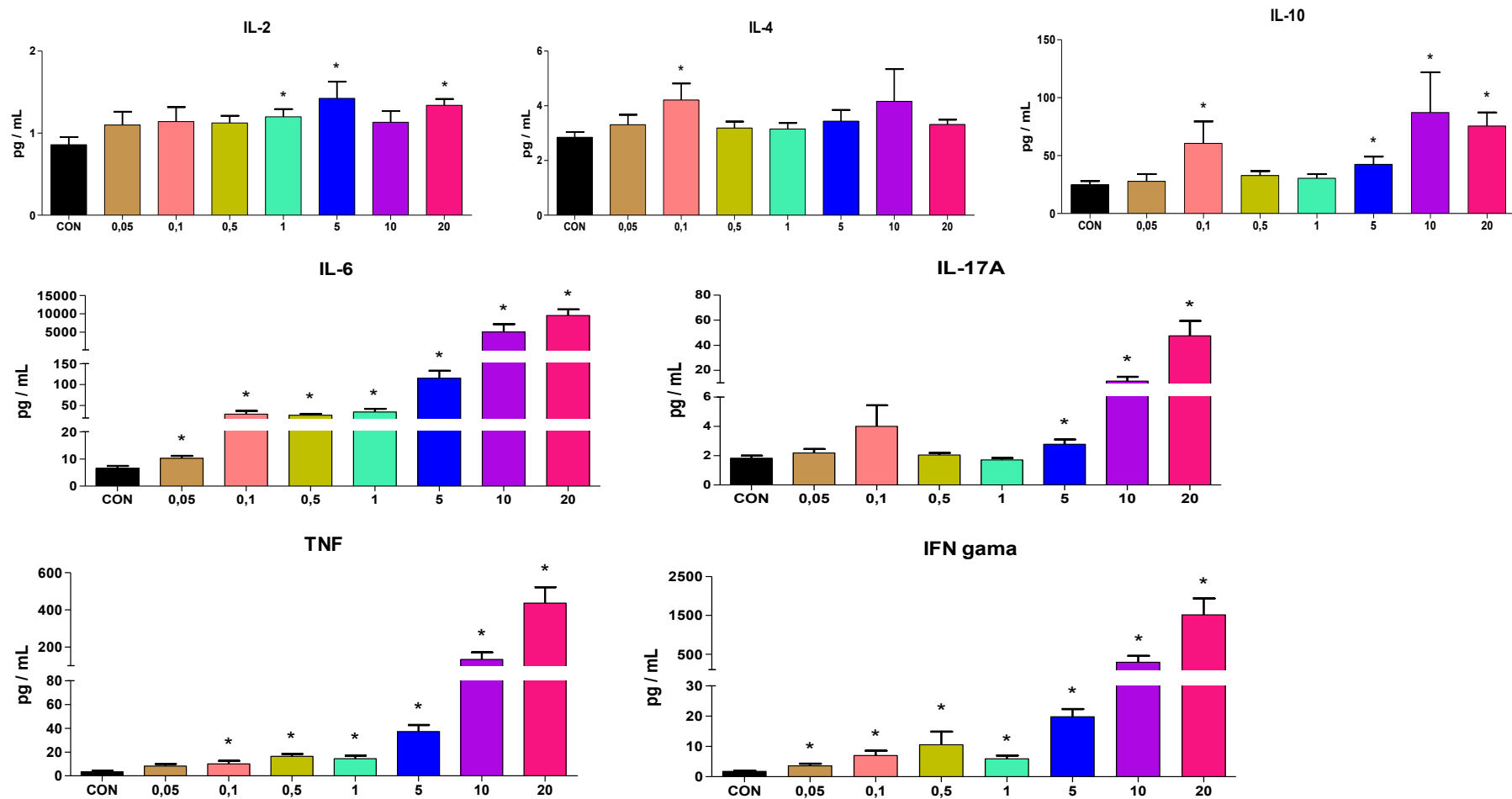


Figura 3.1. Níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF e IFN- γ (pg/mL) nas amostras de soro de animais tratados com LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal ip) mortos 24 h após a injeção i.p. Os valores são média \pm EPM. A comparação estatística foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. As diferenças em relação ao controle (não tratado com LPS) são assinaladas com um asterisco ($p < 0,05$, *, # de CON, controle tratado com PBS 10 mL/kg de peso corporal).

O co-tratamento dos animais com PTX 200 mg/kg de peso corporal (duas injeções de 100 mg/kg de peso corporal, uma 30 min antes e outra 30 min após o LPS), e LPS em doses entre 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal, atenuou (em graus variados) a produção de citocinas em resposta à endotoxina (**Figura 3.2**; $p < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney). Da mesma forma que o observado com o tratamento apenas com o LPS, o co-tratamento PTX + LPS também promoveu aumento dose-dependente, embora de magnitude muito menor, dos níveis séricos de IL-6 e IFN- γ .

Apesar do co-tratamento com a PTX ter – de um modo geral – diminuído a magnitude da resposta ao LPS, ainda assim, em todos os casos houve elevação dos níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e INF- γ nos animais tratados (PTX + LPS) em comparação com os níveis registrados entre os controles (**Figura 3.2**; $p < 0,05$, teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney). No caso do co-tratamento com PTX, a produção de IL-17A estava elevada apenas nas duas maiores doses de LPS (10 e 20 mg/kg de peso corporal). Na ausência da PTX não só o aumento de IL-17A registrado nestas doses de LPS foi muito mais expressivo, como também foi notado aumento das concentrações séricas na dose de 5 mg/kg de peso corporal de LPS (**Figura 3.2**; $p < 0,05$, teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

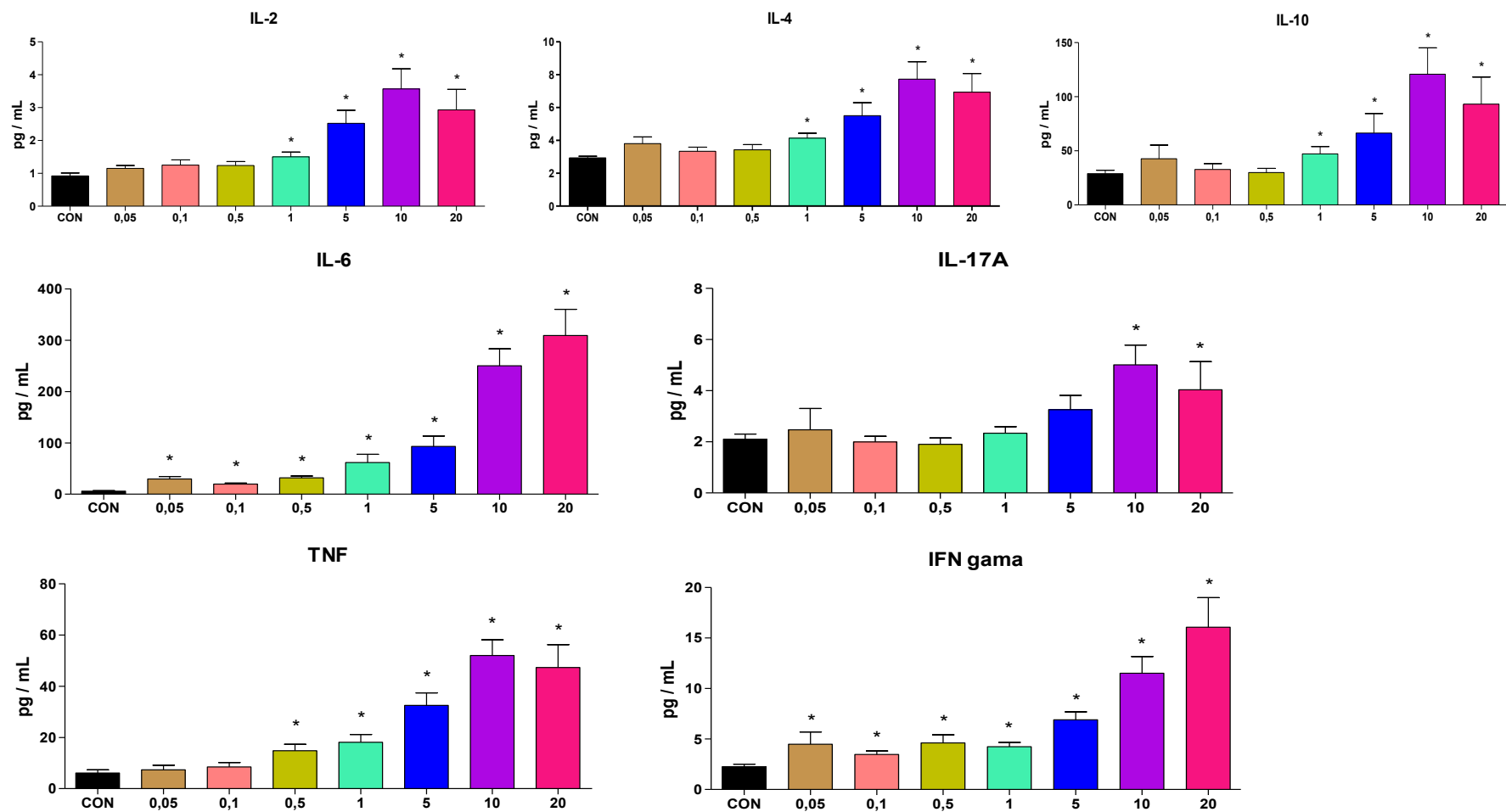


Figura 3.2. Níveis de IL-2, IL-4, IL-10, IL-6, IL-17A, TNF e IFN- γ (pg/mL) nas amostras de soro de animais tratados com PTX + LPS (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após LPS nas doses de 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) e mortos 24 h após injeção i.p. de LPS. Os valores são média \pm EPM. Os dados foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. As diferenças encontradas são assinaladas com um asterisco ($p < 0,05$, *, # de CON, controle tratado com PTX 100 mg/kg de peso corporal).

As **Figuras 3.3 e 3.4** mostram claramente que a elevação dos níveis de citocinas no sangue é, com a exceção de IL-2, IL-4 e IL-10, maior quando os animais receberam apenas o tratamento com LPS do que nos casos em que foram tratados também com PTX. No caso de IL-2 (LPS nas doses de 5 a 20 mg/kg de peso corporal combinado a PTX, comparado ao LPS apenas nas mesmas doses) e IL-4 (LPS 1, 5 e 20 mg/kg de peso corporal combinada a PTX, comparado ao LPS apenas nas mesmas doses – $p < 0,05$, teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney) ocorreu o contrário, *i.e.*, houve aumento dos níveis após o co-tratamento. Por outro lado, os níveis séricos de IL-10 não foram alterados pelo co-tratamento PTX + LPS em relação ao LPS apenas (**Figura 3.4**).

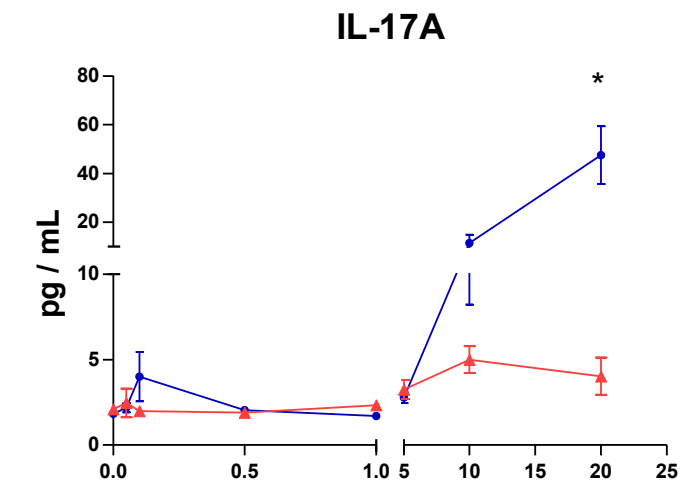
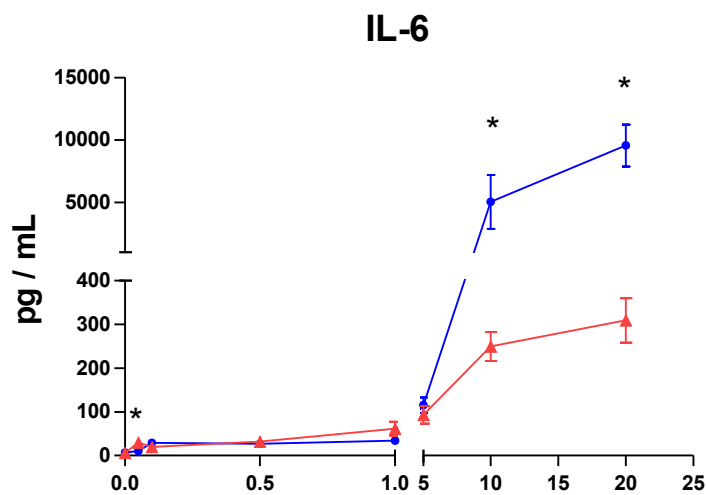
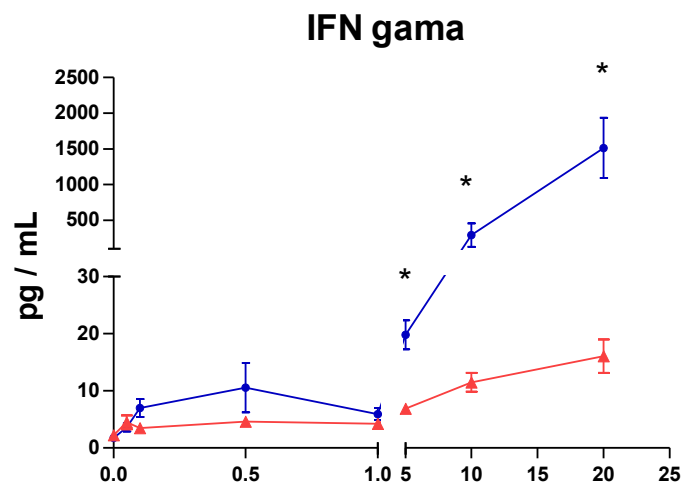
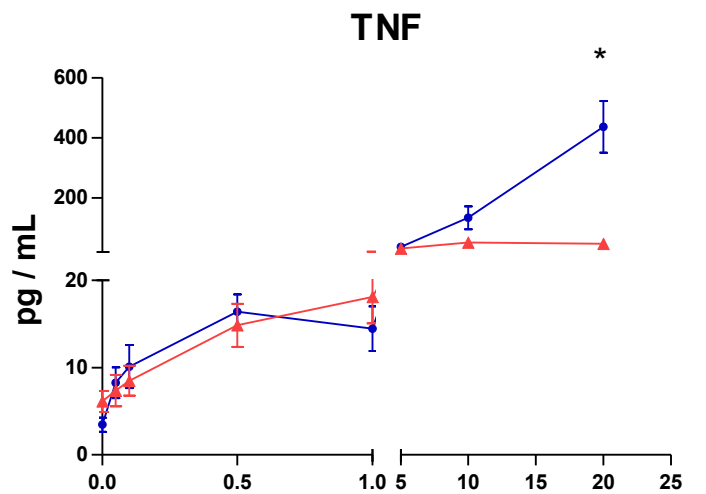


Figura 3.3. Níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-17A (pg/mL) em animais tratados com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, LPS (0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal) e suas combinações, mortos 24 h após injeção i.p. de LPS. Em azul (círculos) estão representados apenas os resultados do tratamento com LPS nas diversas doses e, em vermelho (triângulos), os resultados do co-tratamento PTX + LPS. As diferenças são assinaladas com um asterisco ($p < 0,05$, *, PTX + LPS difere do grupo tratado com a mesma dose de LPS, teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

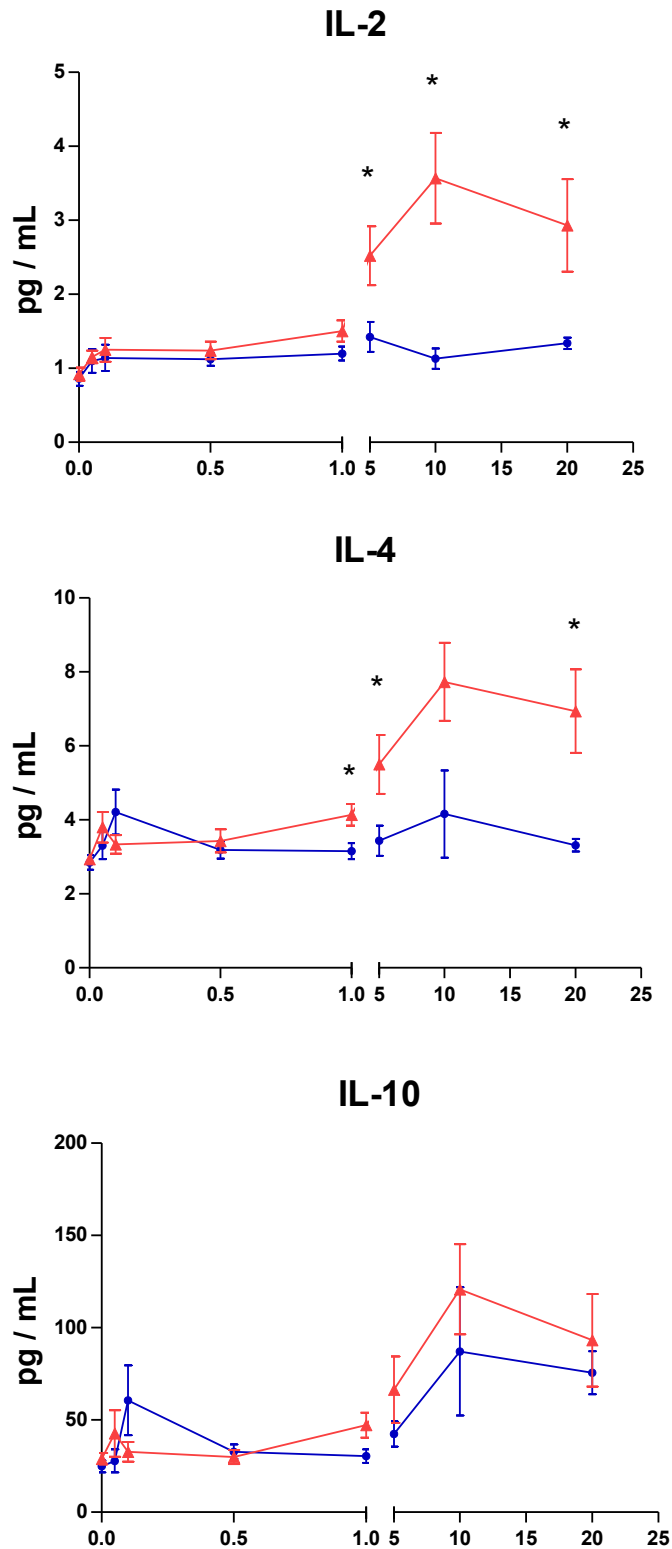


Figura 3.4. Níveis séricos de IL-2, IL-4 e IL-10 (pg/mL) nos animais tratados com LPS (0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal) apenas e com LPS + PTX (2x100 mg/kg de peso corporal), mortos 24 h após injeção i.p. de LPS. Os círculos cheios (**azul**) indicam os níveis após tratamento com LPS apenas e os triângulos cheios (**vermelho**) referem-se ao co-tratamento PTX + LPS. As diferenças entre os dois grupos a cada dose de LPS são assinaladas com um asterisco ($p < 0,05$, *, PTX + LPS difere da mesma dose de LPS; teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney).

3.4.1.2. Produção de NO e atividade de monooxigenases hepáticas

Os animais tratados apenas com a endotoxina exibiram aumento considerável da concentração sérica de NO nas doses mais altas de LPS (5 a 20 mg/kg de peso corporal), como pode ser visto na **Figura 3.5 e 3.7**. Nas doses inferiores a 5 mg/kg de peso corporal, o LPS ou não alterou (0,5 e 1 mg/kg de peso corporal) ou causou pequena redução dos níveis constitutivos (*i.e.*, níveis de controles não tratados com LPS) do óxido nítrico no soro 24 h após o tratamento.

Nas doses em que elevou as concentrações séricas de NO, o tratamento com LPS (5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal) deprimiu as atividades de EROD (marcador de Cyp 1a1/2) e BROD (marcador para Cyp2b9/10) na fração microssomal hepática ($p < 0,05$ em relação aos controles que não receberam LPS, teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney – **Figura 3.5 e 3.7**).

O efeito do LPS (0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) sobre a atividade da COH (marcador para a Cyp2a5) adquiriu a forma de “U”, *i.e.*, as doses baixas de LPS (0,05 a 1 mg/kg de peso corporal) inibiram a atividade, enquanto as doses altas (5 a 20 mg/kg de peso corporal) restauraram a atividade da Cyp2a5 aos valores dos controles ($p < 0,05$, teste Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney – **Figura 3.5 e 3.7**).

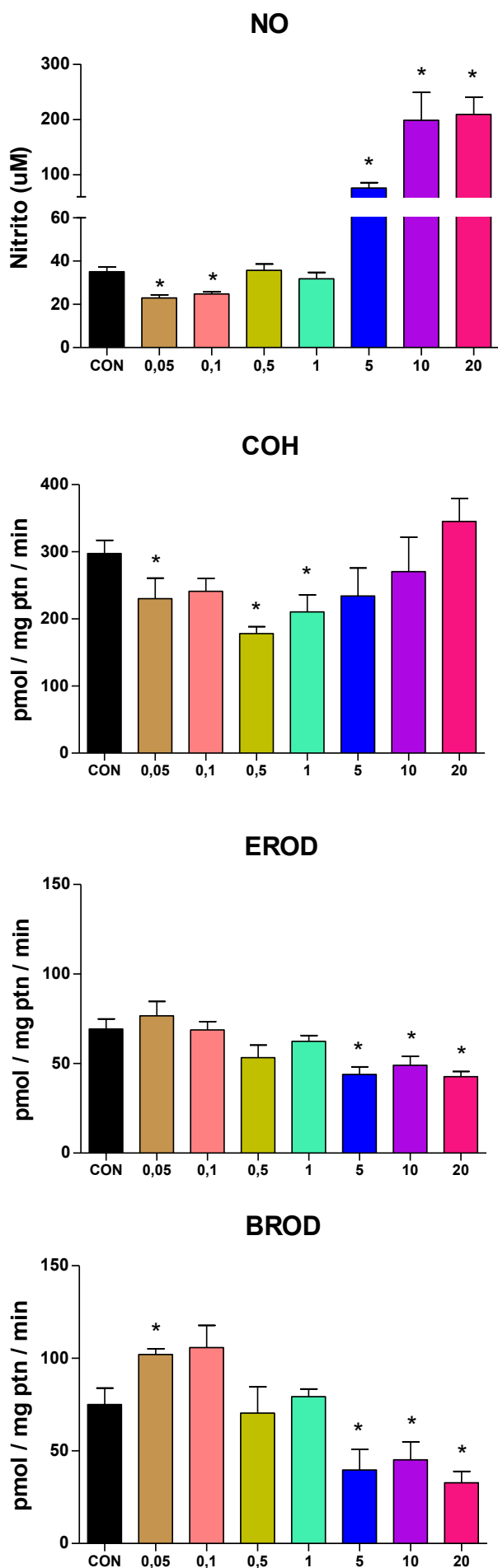


Figura 3.5. Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades ($\text{pmol}/\text{mg ptn}/\text{min}$) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases no fígado de camundongos DBA-2 tratados com LPS (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal). Os animais sofreram eutanásias 24 h após a injeção de LPS. CON: animais controle tratados apenas com PBS 10 mL/kg de peso corporal. Os valores são média \pm EPM. A análise estatística foi realizada pelo Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$, sendo a diferença em relação ao controle (CON) assinalada por um asterisco (*). Os valores dos controles foram: NO = $35,1 \pm 2,1 \mu\text{M}$; COH = $297,6 \pm 19,4 \text{ pmol umbeliferona}/\text{mg ptn}/\text{min}$; EROD = $69,3 \pm 5,6 \text{ pmol resorufina}/\text{mg ptn}/\text{min}$; BROD = $75,1 \pm 8,8 \text{ pmol resorufina}/\text{mg ptn}/\text{min}$.

O co-tratamento PTX e LPS (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após a injeção de LPS – 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal) elevou os níveis de NO a partir da dose 0,5 mg/kg de LPS de peso corporal ($p < 0,05$, teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney – **Figura 3.6 e 3.7**).

A co-administração de PTX promoveu uma alteração da forma em “U” da curva dose resposta LPS vs COH, estendendo a depressão da atividade da COH a praticamente todas as doses de LPS exceto a de 20 mg/kg de peso corporal ($p < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney – **Figura 3.6 e 3.7**). Por outro lado, o co-tratamento não alterou de forma evidente o efeito (depressor) do LPS sobre EROD e BROD (**Figura 3.7**).

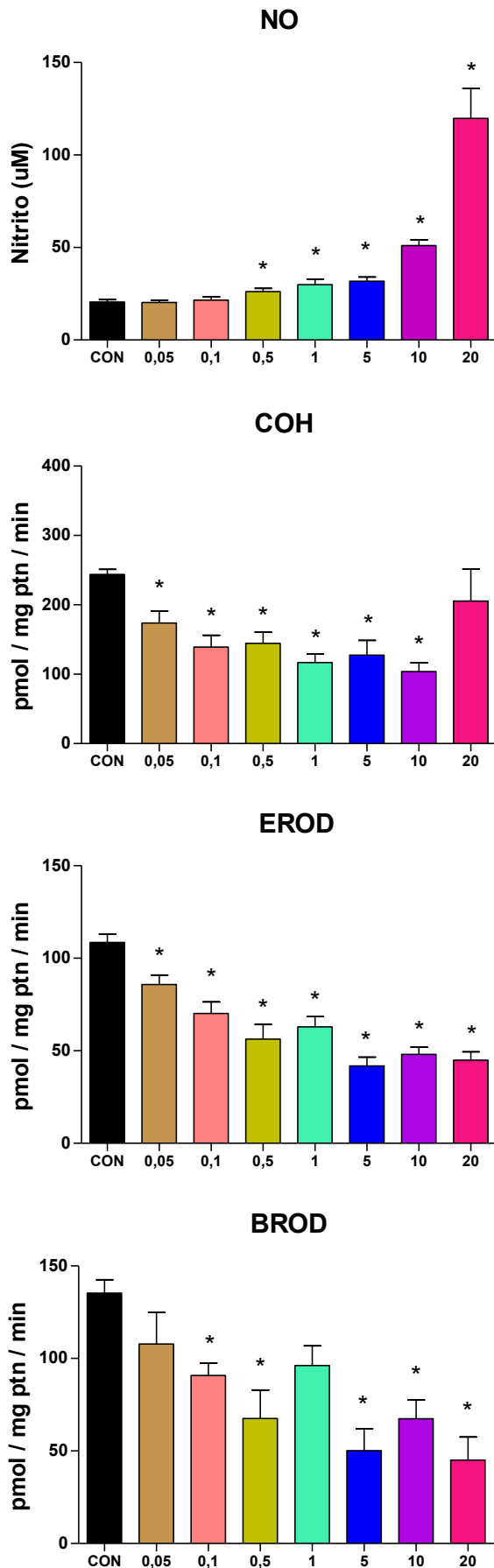
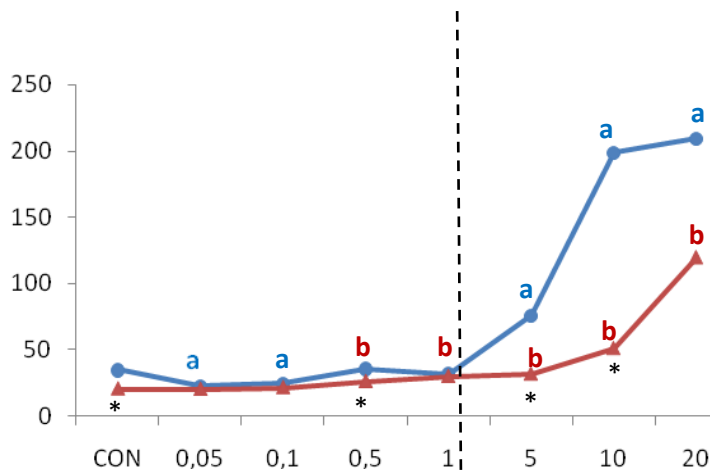
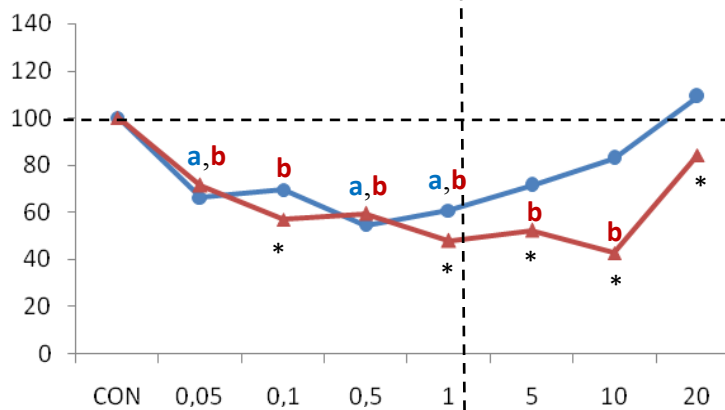


Figura 3.6. Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades ($\text{pmol} / \text{mg ptn} / \text{min}$) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases nos fígado de camundongos DBA-2 tratados com PTX ($2 \times 100 \text{ mg/kg}$ de peso corporal) e LPS (0, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal). Os animais foram mortos 24 h após a injeção de LPS. CON: animais controle tratados com PTX ($2 \times 100 \text{ mg/kg}$ de peso corporal). Os valores são média \pm EPM. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$, sendo a diferença em relação ao controle (CON) assinalada por um asterisco (*). Os valores dos controles foram: NO = $20,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$; COH = $243,9 \pm 7,3 \text{ pmol umbeliferona} / \text{mg ptn} / \text{min}$; EROD = $108,5 \pm 4,5 \text{ pmol resorufina} / \text{mg ptn} / \text{min}$; BROD = $135,4 \pm 7,2 \text{ pmol resorufina} / \text{mg ptn} / \text{min}$.

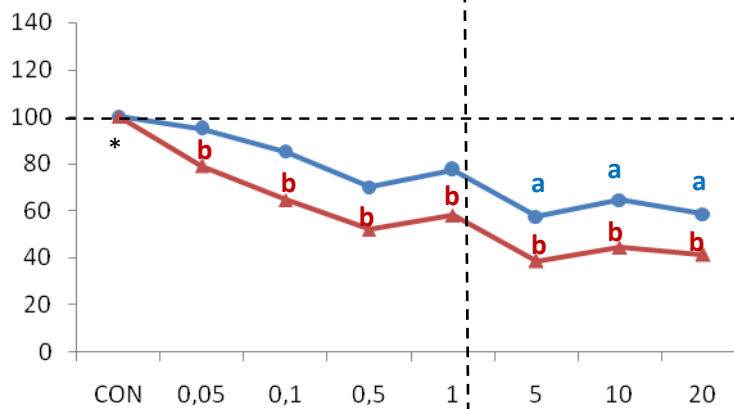
NO



COH



EROD



BROD

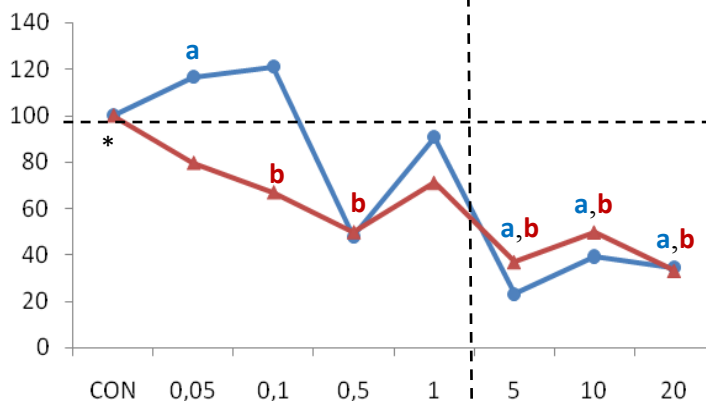


Figura 3.7. Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades (%) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases nos fígados de camundongos DBA-2. Círculos cheios (**azul**), animais tratados com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e mortos 24 h após a injeção. Triângulos cheios (**vermelho**), animais tratados com a combinação de PTX + LPS (PTX: 200 mg/kg peso corporal, ou 02 injeções de 100 mg/kg de peso corporal, uma 30 minutos antes e outra 30 minutos após o LPS – 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal). Os camundongos foram mortos 24 h após a injeção ip do LPS. CON: Os controles receberam apenas uma injeção de PBS 10 mL/kg de peso corporal, ou apenas PTX 200 mg/kg de peso corporal (mas não LPS), conforme o caso. Os valores são média \pm EPM. Análise estatística: teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$. **a** # CON no tratamento com LPS (PBS, círculos cheios; **azul**). **b** # CON no tratamento combinado (PTX + LPS, triângulos cheios; **vermelho**). * LPS apenas difere do co-tratamento PTX + LPS para a mesma dose de LPS.

Para avaliar o efeito da PTX *per se* sobre as atividades de COH, EROD e BROD, tratamos camundongos fêmeas DBA-2 com PTX e PBS (controle).

Como tivemos dois grupos controle diferentes, um com PBS em um volume de 10 mL/kg e morte 24 h após o tratamento (CON 1 – grupo controle 1) para os animais tratados apenas com LPS nas doses de 0,05 a 20 mg/kg de peso corporal e, outro grupo controle (CON 2) que receberam PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, injeções com intervalo de 60 min e morte 24h e 30 min após o primeiro tratamento para os animais com tratamento combinado de PTX e LPS, fizemos dois esquemas diferentes de tratamento com a PTX.

Em um dos esquemas de tratamento, os animais foram divididos em dois grupos:

- **Grupo 1.1:** Animais receberam PTX 100 mg/kg de peso corporal e foram mortos 24 h após.
- **Grupo 1.2:** CON 1. Os animais receberam PBS 10 mL/kg de peso corporal e foram mortos 24 h após.

No outro esquema de tratamento, os animais também foram divididos em dois:

- **Grupo 2.1:** CON 2. Animais receberam PTX 2x100 mg/kg de peso corporal com intervalo de 60 min entre as injeções e morte 24 h e 30 min após o primeiro tratamento.
- **Grupo 2.2:** Os animais receberam PBS 2x10 mL/kg de peso corporal e também foram mortos 24h e 30 min após o primeiro tratamento.

Os resultados mostram que as atividades de COH e EROD, após o tratamento com PTX 100 ou 2x100 mg/kg não são diferentes dos seus respectivos controles, mas o mesmo não ocorreu para BROD onde o tratamento com PTX 2x100 mg/kg induziu a atividade enzimática da Cyp2b9/10 ($p < 0,05$, Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney), conforme podemos observar com a **Figura 3.8**.

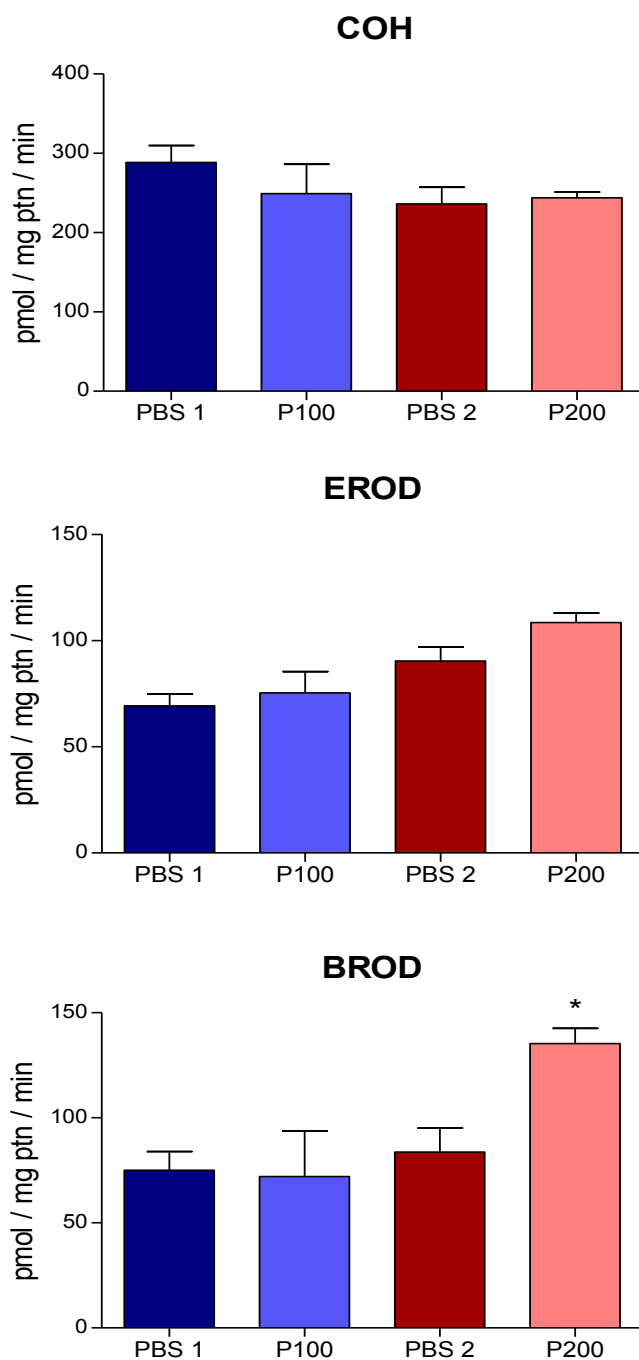


Figura 3.8. Alterações das atividades da COH (Cyp2a5), EROD (Cyp1a1/2) e BROD (Cyp2b9/10) nos fígados dos camundongos DBA-2 tratados com PTX nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg de peso corporal (2x100 mg/kg, com 60 min de intervalo). PBS1: Tratamento com PBS 10 mL/Kg de peso corporal e morte 24 h após. PBS2: Tratamento com PBS (2x10 mL/kg, 60 min de intervalo) e morte 24 h e 30 min após primeiro tratamento. Análise estatística: teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$. * difere do respectivo controle. Os valores (pmol/ mg ptn/ min) dos controles foram: COH=288,6±21,33; EROD=69,3±5,6; BROD=75,1±8,1 para PBS1 e COH=236,2±21,0; EROD=90,4±6,6; BROD=83,7±11,3 para PBS2.

3.4.2. Efeito da inibição da produção de óxido nítrico (bloqueio da NO sintase induzível: NOS2) sobre a atividade de Cyp2a5

Nesta etapa foi realizada a inibição seletiva da produção de óxido nítrico induzível através da administração de aminoguanidina (Ag), um inibidor seletivo da NO-sintase induzível (iNOS ou NOS2). Os níveis séricos de NO e as atividades de COH, EROD e BROD foram determinados 24 h após a administração de LPS (10 mg/kg de peso corporal) com e sem o co-tratamento com aminoguanidina. Nos animais que receberam Ag, nas doses de 50 e 100 mg/kg de peso corporal, a produção de óxido nítrico foi semelhante à observada nos animais tratados apenas com PBS (grupo controle). A administração de LPS induziu a produção de NO, conforme esperado, mas o tratamento conjunto com LPS (10 mg/kg de peso corporal) e Ag (50 ou 100 mg/kg de peso corporal) bloqueou a NOS2 e, conseqüentemente, atenuou a elevação dos níveis séricos de NO (**Figura 3.9**).

A atividade da COH (Cyp2a5), após o tratamento com LPS (10 mg/kg de peso corporal), foi um pouco mais elevada que aquela registrada no grupo controle ($361,5 \pm 69,9$ versus $263,3 \pm 38,0$, respectivamente – **Figura 3.9**). As atividades do Cyp2a5 registradas nos animais tratados com Ag nas doses de 50 e 100 mg/kg não foram diferentes da atividade apresentada pelos animais do grupo controle. Entretanto, o co-tratamento LPS (10 mg/kg de peso corporal) e Ag (100 mg/kg de peso corporal) deprimiu a atividade da COH em relação ao registrado nos camundongos do grupo tratado com LPS apenas e controles que não receberam a endotoxina.

O tratamento com LPS (10 mg/kg de peso corporal) deprimiu a atividade de EROD em relação aos controles (que não receberam endotoxina) e o co-tratamento com a Ag (100 mg/kg de peso corporal) não alterou este efeito depressor sobre a atividade de Cyp1a1/2. De modo semelhante, o tratamento com LPS deprimiu BROD, e o co-tratamento (LPS+Ag) também não modificou a magnitude deste efeito depressor da endotoxina (**Figura 3.9**).

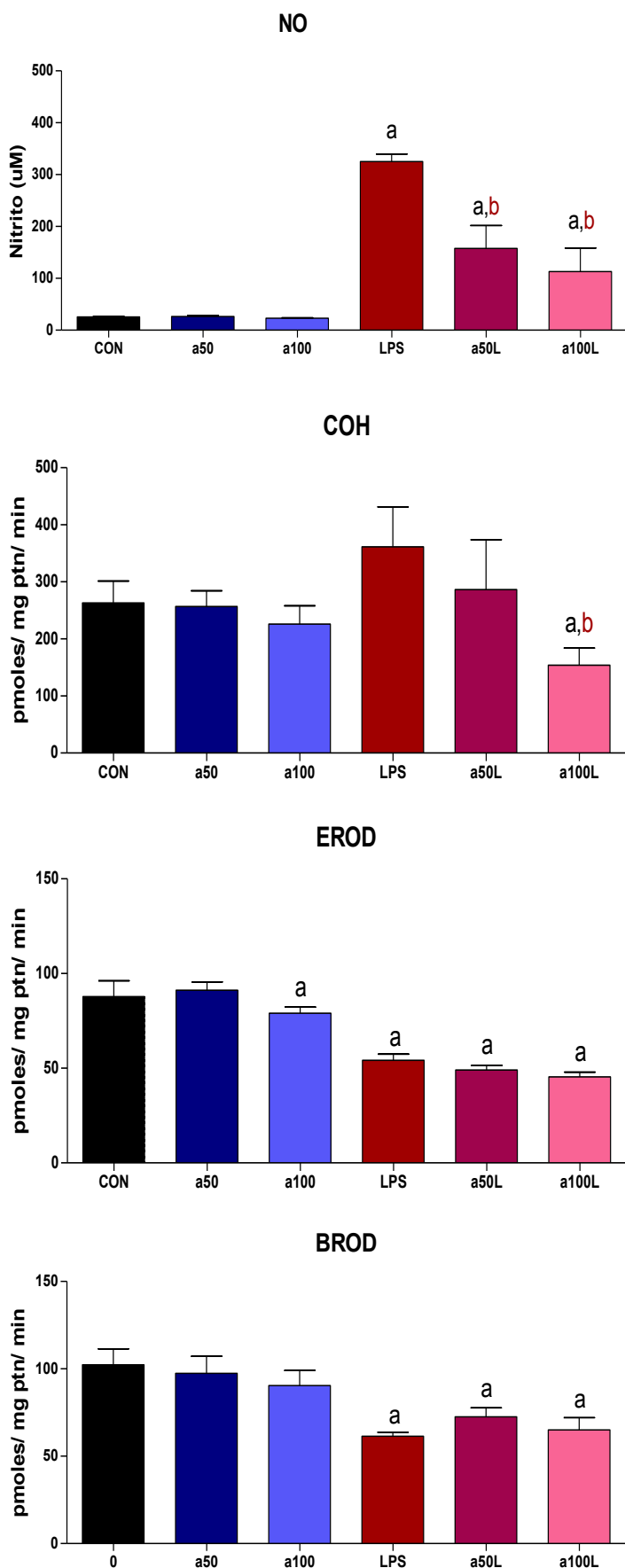


Figura 3.9. Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) e das atividades da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), etoxi- (EROD, Cyp1a1/2) e benziloxi- (BROD, Cyp2b9/10) resorufina-*O*-desalquilases nas frações microsossomais de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS (10 mg/kg de peso corporal), aminoguanidina (a) (50 e 100 mg/kg de peso corporal) e aminoguanidina + LPS (aL) mortos 24 h após injeção i.p. Os valores são média \pm EPM. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney (a # de CON, b # LPS, $p < 0,05$). Os valores para o grupo controle foram: NO = 25,4 \pm 0,9 μM ; COH = 263,3 \pm 38,0 pmol umbeliferona/mgptn/min; EROD = 87,8 \pm 8,3 pmol resorufina/mgptn/min; BROD = 102,4 \pm 9,0 pmol resorufina/mgptn/min.

3.5. DISCUSSÃO

Infecções de diferentes tipos (virais, bacterianas, parasitárias) e processos inflamatórios modulam a expressão e atividade de enzimas do CYP450 e em virtude deste efeito alteram a cinética e a toxicidade de xenobióticos. O(s) elo(s) entre as respostas do sistema imunológico e a regulação das enzimas de biotransformação, e o modo pelo qual a infecção e os estímulos inflamatórios modulam essas enzimas, permanece(m) em grande parte, se não totalmente, obscuro(s). Neste sentido, alguns autores sugerem que a elevação dos níveis de citocinas e do óxido nítrico em decorrência da ativação da resposta imune do hospedeiro possa de alguma forma estar envolvida nessa modulação. Como salientado no início deste capítulo (Objetivo geral), este estudo investigou se a elevação dos níveis de TNF e de outras citocinas e a indução da NOS2, aumentando a concentração sérica de NO, seriam eventos necessários para a modulação das Cyp2a5, 1a1/2 e 2b9/10 pela inflamação/infecção.

A injeção da endotoxina (LPS de *E. coli*) é o estímulo inflamatório utilizado na maioria dos estudos que tentam desvendar as relações entre os dois sistemas de defesa do hospedeiro a ameaças externas, *i.e.*, a biotransformação de xenobióticos e a ativação do sistema imune. O LPS ativa macrófagos e promove a secreção de proteínas de fase aguda e citocinas, tais como o TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-10 (Bienvenu *et al.*, 2000).

Os resultados mostraram que, 24 h após o tratamento com LPS, os níveis séricos de IL-6, IL-17A, TNF e INF- γ estavam consideravelmente elevados em relação aos níveis registrados nos controles, particularmente nos animais que receberam doses de endotoxina superiores a 1 ou 5 mg/kg de peso corporal (**Figura 3.1**). Aumentos discretos, mas estatisticamente significativos de IL-2 e IL-10 foram também notados, enquanto as concentrações de IL-4 no soro sanguíneo permaneceram praticamente inalteradas (**Figura 3.1**). Os níveis de óxido nítrico (NO) no soro estavam muito aumentados nos camundongos tratados 24 h antes com dose de LPS igual ou maior que 5 mg/kg de peso corporal (painel superior da **Figura 3.5**), indicando que ocorreu forte indução da enzima NO sintase 2 (NOS2) nessa faixa de doses altas. Esse conjunto de dados mostra que a resposta ao estímulo inflamatório, em termos da promoção da síntese de IL-6, IL-17A, TNF, INF- γ e NOS2, mostrava-se particularmente intensa 24 h após o tratamento com doses de LPS superiores a 1 mg/kg de peso corporal.

A pentoxifilina (200 mg/kg peso corporal) *per se* não alterou os níveis séricos das citocinas analisadas e do óxido nítrico nos animais não tratados com LPS. Entretanto, como esperado em virtude do seu conhecido efeito anti-inflamatório, a PTX atenuou substancialmente a magnitude da elevação dos níveis séricos de TNF, INF- γ , IL-6, IL-17A, IL-10 e do NO desencadeada pelo LPS (**Figura 3.3, 3.4** e painel superior da **Figura 3.7**). Em sentido oposto, o co-tratamento com PTX exacerbou o aumento dos níveis de IL-2 e de IL-4 (praticamente inalterados após tratamento com LPS apenas) promovido por dose de LPS igual ou superior a 5 mg/kg de peso corporal (**Figura 3.4**).

Camundongos que receberam 5 mg/kg de peso corporal, ou doses mais elevadas (10 e 20 mg/kg de peso corporal) de LPS, apresentaram atividades de EROD e BROD deprimidas em relação aos controles e aos grupos tratados com dose igual ou menor que 1 mg/kg de peso corporal (**Figura 3.5**). Essas alterações são consistentes com a regulação negativa da expressão e atividade de Cyp1a1/2 e 2b9/10 no fígado por doses de LPS que causam também pronunciadas elevações dos níveis séricos de IL-6, IL-17A, TNF, INF- γ e NO (**Figura 3.1 e 3.5**). O efeito do LPS regulando negativamente enzimas das subfamílias Cyp1a e Cyp2b expressas no tecido hepático tem sido observado em outros estudos com ratos e camundongos.

A resposta de COH (Cyp2a5) ao estímulo com LPS, entretanto, exibiu uma relação dose-efeito claramente não-monotônica, *i.e.*, depressão da atividade nas doses inferiores (entre 0,05 e 1 mg/kg de peso corporal) e reversão desta modulação negativa com retorno a atividades registradas nos controles não tratados com endotoxina nas doses mais elevadas (**Figura 3.5**). Esse surpreendente comportamento não-linear / não monotônico na modulação de Cyp2a5 pelo LPS (depressão em doses baixas que não elevam o NO sérico e não alteram os Cyp1a e Cyp2b, e retorno a atividade basal nas doses que induzem NOS2 e deprimem os demais Cyps havia sido descrito originalmente por De-Oliveira (2008), em trabalho ainda não publicado, e foi portanto confirmado pelo presente estudo.

Em aparente desacordo com o que havia sido descrito em ratos por Monshouer *et al.* (1996), a PTX na dose de 200 mg/kg de peso corporal induziu discretamente a atividade de EROD (Cyp1a1/2) e BROD (Cyp2b9/10) em camundongos (**Figura 3.7**). Apesar da indução de Cyp1a e 2b deslocar a linha de base dos controles não tratados com LPS para nível mais elevado, a magnitude da regulação negativa dessas isoformas (*i.e.*, depressão da atividade basal expressa como % do controle) promovida pelo LPS (5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal) não foi afetada pelo co-tratamento com PTX (**Figura 3.7**). Considerando que o co-tratamento com PTX bloqueou o aumento dos níveis séricos de IL-6, IL-17A, TNF, INF- γ e NO (indução

de NOS2) produzidos por doses mais altas de LPS, esses resultados sugerem fortemente que a regulação negativa (da expressão e atividade) de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 não é mediada pelas referidas citocinas ou pelo NO.

O tratamento de camundongos controle (*i.e.*, que não receberam LPS) com PTX (200 mg/kg de peso corporal) não alterou a atividade de COH (Cyp2a5). O co-tratamento com PTX, entretanto, aboliu a reversão e o retorno da atividade de COH (Cyp2a5) aos níveis basais (*i.e.*, aos níveis da atividade nos controles) nas doses de 5 e 10 mg/kg de peso corporal de LPS. A comparação do efeito do co-tratamento com PTX sobre os níveis séricos de NO (**Figura 3.7**, painel superior) com o efeito do PTX sobre a atividade de COH (**Figura 3.7**, segundo painel de cima para baixo), sugere que a reversão da regulação negativa da atividade de Cyp2a5 acompanha a elevação dos níveis de NO. A PTX, abolindo ou reduzindo drasticamente o aumento de NO (e também de IL-6, IL-17A, TNF, e INF- γ), fez desaparecer, nas doses de 5 e 10 mg/kg peso corporal de LPS, a recuperação da atividade desta isoforma, cuja atividade permaneceu deprimida em relação ao controle. Na dose mais elevada de LPS (em que há claros sinais de choque séptico e morte de animais), a PTX atenuou o aumento de NO, reduziu a mortalidade e produziu parcial recuperação da atividade de COH (Cyp2a5 – **Figura 3.7**).

Como a atenuação ou abolição da elevação dos níveis de NO pelo co-tratamento com PTX fez com que a atividade da COH permanecesse deprimida (em vez de aumentar), é improvável que o NO atue bloqueando a enzima. De qualquer modo investigamos o efeito da inibição da NOS2 usando aminoguanidina, um inibidor relativamente específico desta isoforma (em relação a NOS1, constitutiva). A aminoguanidina *per se*, nas doses de 50 mg/kg de peso corporal ip, não teve qualquer efeito sobre as atividades de EROD (Cyp1a1/2), BROD (Cyp2b9/10) ou COH (Cyp2a5). As atividades de BROD e de COH não foram alteradas após a administração da maior dose do inibidor de NOS2, mas a atividade de EROD foi discretamente deprimida pela dose mais elevada de aminoguanidina (**Figura 3.9**). Em decorrência da inibição da NOS2, as duas doses de aminoguanidina reduziram os níveis séricos de NO apesar da indução da NOS2 que ocorre com a administração de doses altas de LPS (10 mg/kg de peso corporal). Como as atividades de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 dos camundongos que receberam aminoguanidina e LPS não foram alteradas em relação aos controles tratados com LPS apenas, é razoável supor que o aumento de NO causado pelo LPS não tem qualquer papel direto na depressão das atividades dessas isoformas CYP. Raciocínio análogo e conclusão semelhante podem ser válidos em relação a Cyp2a5 levando-se em conta a redução de NO sérico causada pela menor dose de aminoguanidina. A maior dose do inibidor

da NOS2, entretanto, deprimiu a atividade de COH em relação à atividade registrada nos camundongos tratados com LPS 10 mg/kg de peso corporal apenas e também em relação aos controles não tratados com LPS (**Figura 3.9**). É interessante notar que a atividade de Cyp2a5 é deprimida por doses muito baixas de LPS, até 1 mg/kg de peso corporal (**Figura 3.5**, segundo painel a partir do topo), mas nas doses altas de LPS a atividade não difere dos níveis registrados entre os controles não tratados com LPS. Portanto, o co-tratamento tanto com PTX quanto com aminoguanidina 100 mg/kg de peso corporal, aparentemente aboliram a reversão da depressão de COH observada nas doses mais elevadas de LPS. Ambas as intervenções tem em comum o fato de terem reduzido consideravelmente a elevação dos níveis séricos de NO produzida por altas doses de LPS. Vale destacar que os mecanismos pelos quais os dois fármacos diminuem os níveis de NO são completamente diferentes, a aminoguanidina inibe diretamente a NOS2 e a PTX age na cadeia de eventos desencadeados pelo LPS regulando negativamente a síntese de citocinas e proteínas de fase aguda, aí incluída a expressão da NOS2.

A partir dos dados obtidos neste estudo é possível especular que a reversão da regulação negativa da expressão e atividade de Cyp2a5 ao nível do hepatócito é de alguma forma mediada pela elevação dos níveis de NO. Os elevados níveis séricos de NO e das citocinas analisadas neste estudo tem origem fundamentalmente nos macrófagos (incluindo os residentes no fígado, ou células de Kupffer), monócitos e linfócitos. Estudos adicionais devem ser realizados para investigar como esses eventos se articulam resultando na modulação negativa da expressão de Cyp2a5 e sua reversão pela elevação dos níveis de NO.

Este estudo mostrou que a atividade da COH é deprimida por doses baixas de LPS (0,05 a 1 mg/kg de peso corporal), que não induzem NOS2 (*i.e.*, não causam elevação do NO sérico) nem aumentam de forma expressiva a síntese de IL-6, IFN- γ e TNF. Nesta faixa de doses baixas de LPS que não induzem a produção de NO e das citocinas anteriormente citadas, a atividade de COH é deprimida (regulação negativa de Cyp2a5), mas as atividades de EROD e BROD não são alteradas (Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 não são reguladas negativamente).

3.5.1. Resultados deste estudo face ao encontrado na literatura

Os achados de estudos anteriores parecem sugerir que algumas citocinas envolvidas na RFA (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) poderiam ser mediadoras da regulação negativa das

atividades (e expressão) de CYPs no fígado em resposta a estímulos infecciosos e inflamatórios (Shedlofsky *et al.*, 1987; Panton & Renton, 1998; Richardson & Morgan, 2005; Aitken & Morgan, 2007; Dickmann *et al.*, 2011).

O fato das atividades de EROD e BROD (marcadores de Cyp1a1/2 e 2b9/10 respectivamente) serem deprimidas pelo LPS apenas nas doses (5 a 20 mg/kg de peso corporal) que também causam aumento dos níveis séricos das citocinas avaliadas (*e.g.*, IL-6, TNF, IFN- γ e IL-17A) e do NO, é a primeira vista consistente com essa interpretação. Entretanto, o fato da PTX ter bloqueado a produção de citocinas e NO sem alterar a magnitude da depressão das atividades de Cyp1a1/2 e Cyp 2b9/10 indica claramente que a depressão das atividades das monooxigenases em questão independe da elevação dos níveis séricos destas citocinas e do NO.

A maioria dos estudos encontrados na literatura que avaliam a participação de citocinas na modulação de enzimas de biotransformação de xenobióticos investigaram o envolvimento de IL-6, TNF- α e IFN- γ . Neste sentido, os grupos de Guillén e Aitken, usando cultura de hepatócitos humanos, associaram a presença de IL-6 e IFN- γ como fatores responsáveis por deprimir a atividade de CYP2A6, 2B6, 3A4 e 1A2 (Guillén *et al.*, 1998). A redução dos níveis do mRNA de CYP2C9 e 2C19 foi associada a IL-6 e TGF e, a depressão de CYP3A4 e 2C8 pelo LPS foi relacionada ao IL-6, TNF- α , IFN- γ , TGF β e IL-1 (Aitken & Morgan, 2007).

Os estudos *in vivo* com emprego de camundongos KO para diversas citocinas e receptores de citocinas, de um modo geral apresentam resultados semelhantes. O grupo de Warren (1999) usou camundongos deficientes dos receptores de TNF do tipo 1 e 2 (R-TNF-p55 e R-TNF-p75 respectivamente) para avaliar o papel desta citocina na regulação da expressão de CYPs hepáticas. Os autores sugeriram o envolvimento do TNF- α na regulação de Cyp2d9 e 2e1, mas concluíram que o TNF- α não teria papel de destaque na depressão de Cyp1a, 2b, 3a e 4a após estímulo do sistema imunológico pelo LPS.

Empregando também o estímulo com LPS e camundongos KO para IL-6, Siewert e colaboradores (2000) concluíram que esta citocina tinha importante papel na depressão de Cyp2a5, 1a2 e 3a11, sendo a redução dos níveis do mRNA de Cyp2a5 a alteração mais dependente de IL-6. Posteriormente, o grupo de Ashino (2004), usando camundongos KO para IL-1 α/β , IL-6 e TNF- α e estimulação com LPS ou vacina BCG, observou que tanto IL-6 quanto TNF- α provavelmente seriam citocinas envolvidas na regulação da expressão (mRNAs) das Cyps 3a11 e 2c29.

Os estudos em humanos sugerem que mediadores inflamatórios produzidos em resposta a doenças crônicas seriam responsáveis por alterar o *clearance* de fármacos nestas condições. Há alguns exemplos neste sentido na literatura. Williams e colaboradores (1987) trataram pacientes portadores de hepatite crônica com INF e verificaram que o aumento dos níveis desta citocina (INF terapêutico e endógeno) está associado a eliminação reduzida (*clearance* metabólico diminuído) da teofilina, que é substrato para a CYP1A2. O grupo de Islam (2002) também observou que, após a administração de INF (INF- α -2b: *High-dose INF- α -2b therapy*, HDI) a portadores de melanoma, ocorria redução de 60 e 40% nas atividades de CYP1A2 e 2C19, evidenciadas pela diminuição do metabolismo da cafeína e da mefenitoína (marcadores de CYP1A2 e 2C19 respectivamente).

A literatura sobre o envolvimento do NO na regulação das isoformas CYP por estímulos inflamatórios e ou infecciosos é controversa. Alguns estudos – principalmente Khatsenko (1993, 1997 e 1998) - sugerem que a indução da NOS2, e a consequente elevação dos níveis de NO, deprime a atividade das enzimas, ao nível transcripcional (mRNA) e/ou inibindo a atividade catalítica das proteínas. Com base em resultados de estudo *in vitro* com microsomas hepáticos de ratos, Khatsenko *et al.* (1993) levantaram a hipótese de que a superprodução de NO promovida pelo LPS é o principal fator que leva à regulação negativa de Cyp2b1/2. Em ratos Sprague-Dawley tratados com LPS, Khatsenko e Kikkawa (1997) encontraram evidências de que o NO seria um dos mediadores responsáveis por deprimir a atividades das isoenzimas Cyp2c11, 3a2, 1a2 e 2b1/2. Posteriormente, o mesmo grupo publicou estudo com camundongos BALB/c (H-2d) infectados com *Chlamydia trachomatis* em que notaram que a infecção deprimia a atividade de Cyps das subfamílias 1a e 2b e que a elevação do NO estaria relacionada a esta depressão de enzimas CYP (Khatsenko *et al.*, 1998).

Dados que não são consistentes com a hipótese de Khatsenko e colaboradores, apareceram ainda no ano de 1998. Morgan e colaboradores, empregando camundongos selvagens (WT) e KO para iNOS, observaram que a injeção de LPS deprime os níveis de proteínas e mRNA de enzimas das sub-famílias Cyp 2c e 3a, e da isoforma Cyp2e1, e também que esta regulação negativa era independente da produção do NO (i.e., ocorria tanto nos camundongos selvagens quanto nos KO para iNOS ou NOS2) (Sewer *et al.*, 1998). Entretanto, em estudo em hepatócito de ratos, publicado em 2001, Morgan e colaboradores notaram dois mecanismos envolvidos na depressão de CYP2B1 pelo LPS, um dos quais seria rápido e dependeria dos efeitos do NO sobre a proteína (e.g., apareceria em doses mais altas de LPS). O outro mecanismo seria mais lento, envolveria a supressão da expressão ao nível

pré-traducional e não dependeria do NO (e.g., ocorreria mesmo em baixas doses de LPS que não elevam NO) (Ferrari *et al.*, 2001).

Como anteriormente comentado, os resultados do presente estudo são consistentes com a hipótese que o NO não participa da regulação negativa de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 visto que o co-tratamento com PTX e com as duas doses de Ag (50 e 100 mg/kg) não atenuaram a depressão de EROD e BROD causada pelo LPS.

Os resultados deste estudo também sugerem que a elevação do NO não é necessária para deprimir a atividade de Cyp2a5 (COH), notada principalmente nas baixas doses de LPS e que não foi modificada pelo co-tratamento quer com a PTX quer com a Ag. O aumento dos níveis de NO entretanto pareceu estar relacionado à reversão da depressão de Cyp2a5 notada nas doses mais elevadas da endotoxina. Experimentos adicionais são necessários para esclarecer de que forma o NO estaria envolvido nesta transição da regulação negativa para a positiva que confere o caráter não-monotônico a curva dose resposta.

A PTX inibe a produção de TNF mediada por bactérias Gram-negativas, aumentando consequentemente a sobrevivência de animais na sepse e em modelos letais de infecção. Nesse sentido, Noel e colaboradores (1990) verificaram em ratos Sprague-Dawley machos que a indução de TNF promovida pelo LPS podia ser antagonizada pela administração de PTX. Os autores sugeriram que esta diminuição dos níveis de TNF seria o responsável pela maior sobrevivência dos animais tratados com endotoxina, já que o mesmo efeito era observado quando os animais recebiam anticorpo anti-TNF (rhTNF) no lugar da PTX.

A melhora do quadro clínico de processos inflamatórios, com o uso da PTX, também foi observada em modelo murinho de mucosite intestinal provocada pelo CPT-11 (Melo *et al.*, 2008). Neste estudo os autores enfatizaram a importância das citocinas TNF- α e IL-1 β na patogênese da mucosite, além de constatar que a diminuição nos níveis destas citocinas promovida pela PTX, inibia a diarreia tardia e reduzia os danos histopatológicos.

No presente estudo, os animais co-tratados com PTX e doses elevadas de LPS (PTX + LPS) também exibiram sobrevivência mais longa e melhora do quadro clínico. Nenhum dos animais do grupo que recebeu PTX (co-tratamento) morreu, enquanto importante letalidade foi registrada nos grupos que receberam apenas LPS (Mortalidade; 5 mg/kg de peso corporal: 1/17; 20 mg/kg de peso corporal: 9/23). Os sinais clínicos da endotoxemia, que incluíram piloereção, hipoatividade, e hipotermia, também foram mais frequentes e intensos nos animais que receberam apenas o LPS.

Há apenas dois estudos (um *in vitro* e outro *in vivo*) que investigaram o efeito da PTX sobre a regulação negativa de CYPs induzida pelo LPS. Em cultura de hepatócito murino

(Hepa1), associada a macrófagos murinos (IC-21), Panton e Renton (1998) verificaram que a inibição da produção de TNF- α pela PTX era responsável pela reversão da regulação negativa da Cyp1a1 causada pela endotoxina. Monshouwer e colaboradores também relataram que o TNF- α era o responsável por promover a inibição de CYP1A2 e 2B1/2 após tratamento com LPS. Os autores chegaram a esta conclusão após verificarem que o co-tratamento com PTX revertia a depressão da atividade dessas isoformas em microsossomos hepáticos de ratos machos Sprague-Dawley (Monshouwer *et al.*, 1996).

Os achados deste estudo em camundongos não confirmam o relatado por esses autores visto que a PTX não reverteu a depressão de EROD, BROD nem COH (marcadores de Cyp1a1/2, 2b9/10 e 2a5 respectivamente). Possíveis explicações para as discrepâncias seriam diferenças entre estudos (*in vitro* para *in vivo*) (Panton & Renton, 1998) e espécies/gênero de roedores (ratos machos Sprague-Dawley, camundongos Fêmeas DBA-2) (Monshouwer *et al.*, 1996).

As discrepâncias podem estar relacionadas à peculiaridades da resposta das diferentes espécies e linhagens ao estímulo inflamatório com LPS. Segundo Mills e colaboradores (2000), os camundongos DBA-2 apresentam um perfil intermediário de células Th1 e Th2, mas dependendo de qual célula é ativada, a resposta inflamatória pode caminhar para direções opostas (Dileepan *et al.*, 1995; Marcinkiewicz *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2000).

De acordo com o estudo de Elkahwaji e colaboradores, altas doses de IL-2r usadas na terapêutica do câncer, em estado avançado, faz com que os pacientes apresentem o teor de CYP total inibida, além de terem a regulação negativa de CYP1A2, 2C, 2E1 e 3A4 no fígado (Elkahwajiet *al.*, 1999).

Existem poucas informações a respeito da citocina pró-inflamatória IL-4. Em estudos em hepatócitos humanos, IL-4 foi associada à regulação positiva de mRNA e atividade de CYP2E1 (aumento maior que 5x), mas sem efeito significativo sobre CYP1A1/2 (Abdel-Razzak *et al.*, 1993).

Diversos estudos sugerem um papel de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF e IFN na regulação negativa de CYPs (Williams *et al.*, 1987; Guillén *et al.*, 1998; Warren *et al.*, 1999; Siewert *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2002; Ashino *et al.*, 2004; Aitken & Morgan, 2007). Como já comentamos, os resultados do presente trabalho não são consistentes com essa interpretação.

3.6. CONCLUSÕES

3.6.1 Conclusões pontuais

O LPS aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias e do óxido nítrico (NO) no soro sanguíneo de camundongos tratados.

- O LPS aumentou de forma dose-dependente, 24 h após a administração, os níveis séricos de IL-2, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e INF- γ em camundongos DBA-2. No mesmo intervalo de tempo após o tratamento, as concentrações de IL-4 aumentaram discretamente após administração da segunda menor dose testada (0,1 mg/kg de peso corporal), mas a administração de dose menor ou de doses maiores não alterou os níveis desta citocina.
- Os aumentos dos níveis séricos de IL-6, INF- γ , TNF e IL-17A, citocinas consideradas pró-inflamatórias, foram particularmente acentuados após administração de doses de LPS superiores a 1 mg/kg de peso corporal.
- Os aumentos de IL-2, IL-4 (praticamente inalterado, exceto na segunda menor dose de LPS) e IL-10 produzidos pelo tratamento com LPS, mesmo quando estatisticamente significativos, foram de pequena magnitude.
- Aumentos acentuados dos níveis séricos de NO foram registrados após a administração de dose de LPS igual ou superior a 5 mg/kg de peso corporal.

O tratamento com LPS regula negativamente a atividade de Cyp1a1/2, Cyp2a5 e Cyp2b9/10 no fígado dos camundongos.

- No caso do efeito do LPS sobre a atividade de Cyp2a5, a relação dose resposta é do tipo não-monotônico. As menores doses de LPS (0,05 a 1 mg/kg de peso corporal) inibem a atividade de COH enquanto a atividade retorna gradualmente a níveis comparáveis aos registrados nos camundongos controles (não tratados com LPS) nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal.
- No caso dos Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10, o LPS regulou negativamente a atividade catalítica apenas nas três maiores doses testadas (5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal).

A pentoxifilina (PTX, 200 mg/kg de peso corporal, ip) bloqueia a elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e do óxido nítrico desencadeada pela administração de LPS.

- O co-tratamento com pentoxifilina atenuou de forma marcante a produção de TNF, INF- γ , IL-6 e IL-17A induzida pelo LPS. Por outro lado, a elevação dos níveis de IL-4 e IL-2 promovida pelo LPS foi acentuada, pela pentoxifilina, enquanto os níveis de IL-10 não foram alterados pelo co-tratamento com PTX.
- O co-tratamento com pentoxifilina atenuou de forma drástica o aumento dos níveis séricos de NO produzido pelo LPS.

O bloqueio da resposta inflamatória pelo co-tratamento com a pentoxifilina não alterou a regulação negativa da atividade das Cyps 1a1/2 e 2b9/10 no fígado promovido pelo LPS. Portanto pode-se concluir que a elevação dos níveis das citocinas avaliadas e do óxido nítrico no sangue não são eventos necessários para mediar a regulação negativa dessas isoformas pelo LPS.

O co-tratamento com pentoxifilina ampliou a faixa de doses em que o LPS deprimiu a atividade de Cyp2a5 (0,05 a 10 mg/kg de peso corporal) de modo que, apenas na dose mais elevada da endotoxina (20 mg/kg de peso corporal), houve uma reversão da inibição da atividade desta isoforma. A elevação dos níveis das citocinas avaliadas e do óxido nítrico no sangue não são eventos necessários para depressão da atividade de Cyp2a5 pelo tratamento com LPS.

O bloqueio da óxido nítrico sintase induzível (NOS2) pela aminoguanidina, e a consequente atenuação da elevação dos níveis de NO promovida pelo LPS não alterou a regulação negativa de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10.

O bloqueio da óxido nítrico sintase induzível (NOS2) pela aminoguanidina, e a consequente atenuação da elevação dos níveis de NO promovida pelo LPS (10 mg/kg de peso corporal) deprimiu a atividade de Cyp2a5 em relação a atividade da isoforma registrada em camundongos tratados apenas com LPS e em controles não tratados com LPS. Este efeito do co-tratamento com a aminoguanidina (100 mg/kg de peso corporal) sobre a atividade de Cyp2a5 foi semelhante ao do co-tratamento com pentoxifilina. Embora os dois fármacos atuem por mecanismos diversos, compartilham o efeito de atenuar o aumento de NO

promovido pelo LPS e o de abolir a reversão da inibição da atividade de Cyp2a5 observada nas doses mais elevadas de LPS (10 mg/kg de peso corporal).

A reversão da depressão da atividade de Cyp2a5 que ocorre após doses mais elevadas de LPS não foi observada quando a elevação dos níveis séricos de NO foi bloqueada, quer pela pentoxifilina quer pela aminoguanidina. A hipótese de que a elevação dos níveis de NO é o evento desencadeador desta reversão da regulação negativa e retorno à regulação positiva não pode ser descartada.

3.6.2 Conclusões gerais

Os resultados desse estudo sugerem que as citocinas pró-inflamatórias cuja produção em resposta ao LPS foi bloqueada pela pentoxifina (TNF, IFN- γ , IL-6, IL-17A) não são mediadoras da regulação negativa de Cyp1a1/2, Cyp2b9/10 e Cyp2a5 em processos inflamatórios e infecciosos.

Além disso, os resultados obtidos confirmam o relato de De-Oliveira de que a modulação de Cyp2a5 pelo LPS segue uma relação dose resposta do tipo não-linear e não-monotônico com reversão da depressão (notada em doses baixas) na faixa superior de doses.

A atenuação ou bloqueio da elevação de NO desencadeada pelo tratamento com LPS desloca a dose em que há transição da regulação negativa para positiva de Cyp2a5 para níveis mais altos.

CAPÍTULO IV
Síntese final e perspectivas

4. Síntese final e perspectivas

Este trabalho reuniu dois estudos que focalizaram a regulação da expressão e atividade da Cyp2a5 em tecido hepático de camundongos.

No primeiro estudo comparamos a expressão e a atividade constitutiva de Cyp2a5, assim como a indução desta enzima pelo pirazol e pelo fenobarbital, em camundongos (fêmeas) de diferentes linhagens e colônias. A possível relação das diferenças de expressão/atividade da Cyp2a5 entre linhagens e colônias murinas e a expressão da heme-oxigenase 1, e o papel do dano hepático com a indução pelo pirazol foram também investigados.

Os resultados da primeira parte deste trabalho mostraram que a expressão e a atividade constitutiva de Cyp2a5 no fígado variam amplamente entre os camundongos das diversas linhagens/colônias examinadas, destacando-se a linhagem DBA-2 e, em seguida a DBA-1, como aquelas que exibem níveis constitutivos mais elevados de atividade da enzima (medida pela reação de 7-hidroxilação da cumarina). Além disso, os dados obtidos sugeriram que a indução da expressão (mRNA) do *cyp2a5* e da *heme-oxigenase 1* não são eventos necessariamente coordenados. Em algumas situações em que houve clara indução de *cyp2a5*, não houve aumento da expressão da *heme-oxigenase 1* no tecido hepático. Essas observações contrariam a hipótese levantada por alguns autores sugerindo que haveria coordenação entre as induções das duas enzimas.

Os nossos resultados também sugerem que a regulação positiva da expressão de *cyp2a5* não está necessariamente associada à toxicidade hepática. A dose de pirazol (hepatotóxica) que usamos neste estudo foi suficiente para induzir a expressão e a atividade de Cyp2a5, mas não alterou marcadores de lesão hepatocelular (*i.e.*, não elevou as transaminases hepáticas).

No segundo estudo investigamos os efeitos da administração de ampla faixa de doses de LPS sobre a atividade de Cyp2a5 (cumarina 7-hidroxilase, COH) Cyp1a1/2 (etoxi-resorufina-*O*-desetilase, EROD) e Cyp2b9/10 (benziloxi-resorufina-*O*-desbenzilase, BROD) em fígado de camundongos (fêmeas) DBA-2. Como esperado, ocorreu uma regulação negativa das atividades de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 nos microsomos hepáticos de camundongos em resposta ao tratamento com LPS, evidente nas doses mais elevadas que também aumentaram consideravelmente os níveis séricos do óxido nítrico (NO) e das citocinas TNF, INF- α , IL-6, e IL-17A. A regulação de Cyp2a5 pelo LPS, entretanto, exibiu

uma peculiar relação dose resposta não linear e não monotônica, com depressão da atividade de cumarina 7-hidroxilase (COH) em doses baixas, em que não há alteração dos níveis séricos de NO e das atividades de EROD e BROD no fígado e não há aumentos expressivos das citocinas pró-inflamatórias, e retorno aos níveis basais de atividade da COH, comparáveis aos registrados em controles não tratados com LPS, nas doses mais elevadas (em que ocorre a regulação negativa da atividade das demais mono-oxigenases). Essa observação sobre a peculiar relação entre dose e resposta na modulação da atividade de Cyp2a5 pelo LPS confirma o que havia sido anteriormente descrito por De-Oliveira (2008).

Nesta segunda parte do trabalho, investigamos como o bloqueio da resposta inflamatória (*i.e.*, bloqueio da indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da expressão da NOS2) pela administração de pentoxifilina (PTX) altera o efeito do LPS sobre as Cyps 2a5, 1a1/2 e 2b9/10. O co-tratamento PTX + LPS não modificou o efeito de altas doses de LPS deprimindo as atividades de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10, o que indica que a modulação negativa dessas atividades pelo LPS independe das elevações dos níveis séricos de citocinas e NO. Em experimento adicional, observamos que a inibição da atividade da NOS2 super-expressa (após o tratamento com LPS) pelo co-tratamento com aminoguanidina, não alterou também a depressão das atividades de Cyp1a1/2 e Cyp2b9/10 promovida pelo LPS. Por outro lado, o co-tratamento com PTX, que antagonizou a expressiva elevação dos níveis séricos do óxido nítrico (NO) e das citocinas TNF, INF- γ , IL-6, e IL-17A, aboliu também (exceto na dose máxima de 20 mg/kg de peso corporal) o retorno das atividades de Cyp2a5 aos níveis basais (*i.e.*, a atividades comparáveis às registradas em controles não tratados com endotoxina). Nessas condições (co-tratamento com PTX) o efeito depressor do LPS sobre Cyp2a5 passou a ser notado também na faixa de doses altas (exceto 20 mg/kg de peso corporal).

Em relação à modulação de Cyp2a5 pelo LPS, o bloqueio da atividade da NOS2 super-expressa com o co-tratamento com aminoguanidina foi semelhante ao efeito do inibidor da expressão de NOS2 no co-tratamento com PTX, sugerindo que possivelmente é o NO elevado que de alguma forma dispara a transição da regulação negativa para positiva de Cyp2a5 em animais tratados com LPS. Essa hipótese será alvos de estudos subsequentes – *in vitro* em células HepG2 em cultura e *in vivo* em camundongos – que procurarão investigar como o NO interfere com os mecanismos de regulação da expressão de Cyp2a5 (camundongos) e CYP2A6 (humano).

CAPÍTULO V
Referências Bibliográficas

Abbas AK, Lichtman AH. “Imunidade inata: A defesa inicial contra as infecções” In: *Imunologia Básica - Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. Elsevier, 2007. p. 23-44.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. “Immunity to microbes” In: *Cellular and molecular immunology*. Elsevier. 2012. p. 345-364.

Abdel-Razzak Z, Lover P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, et al. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol*. 1993;44 (4):707-15.

Abu-Bakar A, Satarug S, Marks GC, Lang MA, Moore MR. Acute cadmium chloride administration induces hepatic and renal CYP2A5 mRNA, protein and activity in the mouse: involvement of transcription factor NRF2. *Toxicol Lett*. 2004;148(3):199-210.

Abu-Bakar A, Moore MR, Lang MA. Evidence for induced microsomal bilirubin degradation by cytochrome P450 2A5. *Biochem Pharmacol*. 2005;70(10):1527-35.

Abu-Bakar A, Lämsä V, Arpiainen S, Moore MR, Lang MA, Hakkola J. Regulation of CYP2A5 gene by the transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(5):787-94.

Aida K, Negishi M. Posttranscriptional regulation of coumarin 7-hydroxylase induction by xenobiotics in mouse liver: mRNA stabilization by pyrazole. *Biochemistry*. 1991;30(32):8041-45.

Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:123-49.

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.

Alexandre-Moreira MS, Takiya CM, Arruda LB, Pascarelli B, Gomes RN, Castro Faria Neto HC, et al. LASSBIO-468: a new achiral thalidomide analogue which modulates TNF- α and

NO production and inhibits endotoxic shock and arthritis in an animal model. *Int Immunopharmacol.* 2005;5(3):485-94.

Arpiainen S, Raffalli-Mathieu F, Lang MA, Pelkonen O, Hakkola J. Regulation of the Cyp2a5 gene involves an aryl hydrocarbon receptor-dependent pathway. *Mol Pharmacol.* 2005;67(4):1325-33.

Arpiainen S, Lämsä V, Pelkonen O, Yim SH, Gonzalez FJ, Hakkola J. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and upstream stimulatory factor regulate Cytochrome P450 2a5 transcription through a common E-box site. *J Mol Biol.* 2007;369(3):640-52.

Arpiainen S, Järvenpää SM, Manninen A, Viitala P, Lang MA, Pelkonen O, et al. Coactivator PGC-1alpha regulates the fasting inducible xenobiotic-metabolizing enzyme CYP2A5 in mouse primary hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;232(1):135-41.

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 2C9 down-regulation by Bacillus Calmette-Guerin and lipopolysaccharide in mouse liver. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32(7):707-14.

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;290(3):1250-57.

Beyer TA, Werner S. The cytoprotective Nrf2 transcription factor control insulin receptor signaling in the regenerating liver. *Cell cycle.* 2008;7(7):874-78.

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.

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.

Cai Y, Konishi T, Han G, Campwala KH, French SW, Wan YJ. The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15(1):89-96.

Chemin I, Takahashi S, Belloc C, Lang MA, Ando K, Guidotti LG, et al. Differential induction of carcinogen metabolizing enzymes in a transgenic mouse model of fulminant hepatitis. *Hepatology.* 1996;24(3):649-56.

Chemin I, Ohgaki H, Chisari FV, Wild CP. Altered expression of hepatic carcinogen metabolizing enzymes with liver injury in HBV transgenic mouse lineages expressing various amounts of hepatitis B surface antigen. *Liver.* 1999;19(2):81-7.

Chen YL, Florentin I, Batt AM, Ferrari L, Giroud JP, Chauvelot-Moachon L. Effects of interleukin-6 on cytochrome P450-dependent mixed-function oxidases in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1992;44(1):137-148.

Chen Y-H, Wang J-P, Wang H, Sun M-F, Wei L-Z, Wei W et al. Lipopolysaccharide treatment downregulates the expression of the pregnane X receptor, cyp3a11 and mdr1a genes in mouse placenta. *Toxicology.* 2005;211(3):242-52.

Choi AM, Alam J. Heme-oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15(1):9-19.

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.* 1997;18(11):2179-90.

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

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.

De-Oliveira ACAX, Da-Matta AC, Paumgarten FJR. *Plasmodium berghei* (ANKA): Infections induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the liver. *Exp Parasitol*. 2006;113(4):256-61.

De-Oliveira, ACAX. Modulação da atividade das enzimas de biotransformação de xenobióticos na malária murina letal e não-letal. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, IOC / FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 2008.

De-Oliveira AC, Carvalho RS, Paixão FH, 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;9:81.

Dickmann LJ, Patel SK, Rock DA, Wienkers LC; Slatter JG. Effects of interleukin-6 (IL-6) and an anti-IL-6 monoclonal antibody on drug-metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(8):1415-1422.

Dileepan KN, Page JC, Li Y, Stechschulte DJ. Direct action of murine peritoneal macrophages for nitric oxide production and tumor cell killing by interferon- γ . *J Interferon Citokine Res*. 1995; 15 (5): 387-394.

Elkhwaji J, Robin MA, Berson A, Tinel M, Letteron P, Labbe G et al. Decrease in hepatic cytochrome P450 after interleukin-2 immunotherapy. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(8):951-54.

Ferrari L, Peng N, Halpert JR, Morgan ET. Role of nitric oxide in down-regulation of CYP2B1 protein, but not RNA, in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 2001;60(1):209-16.

Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Soares MP: A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med*. 2008;86(10):1097-1111.

Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Ranger-Moore J, Jackson JP, Fergusson SS, et al. Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(10):2087-94.

Franzén A, Carlsson C, Hermansson V, Lang M, Brittebo EB. CYP2A5-mediated activation and early ultrastructural changes in the olfactory mucosa: studies on 2,6-dichlorophenyl methylsulfone. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(1):61-8.

Geneste O, Raffalli F, Lang MA. Identification and characterization of a 44 kDa protein that binds specifically to the 3'-untranslated region of CYP2a5 mRNA: inducibility, subcellular distribution and possible role in mRNA stabilization. *Biochem J.* 1996;313(Pt 3):1029-37.

Gharavi N, El-Kadi AO. Role of nitric oxide in downregulation of cytochrome P450 1a1 and NADP: quinone oxidoreductase 1 by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J Pharm Sci.* 2007;96(10):2795-807.

Ghezzi P, Saccardo B, Bianchi M. Recombinant tumor necrosis factor depresses cytochrome P450-dependent microsomal drug metabolism in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986a;136(1):316-21.

Ghezzi P, Saccardo B, Villa P, Rossi V, Bianchi M, Dinarello CA. Role of interleukin-1 in the depression of liver drug metabolism by endotoxin. *Infect Immun.* 1986b;54(3):837-40.

Gilmore WJ, Hartmann G, Piquette-Miller M, Marriot J, Kirby GM. Effects of lipopolysaccharide-stimulated inflammation and pyrazole-mediated hepatocellular injury on mouse hepatic Cyp2a5 expression. *Toxicology.* 2003;184(2-3):211-26.

Gilmore WJ, Kirby GM. Endoplasmic reticulum stress due to altered cellular redox status positively regulates murine hepatic CYP2A5 expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(2):600-8.

Gong P, Cederbaum AI. Nrf2 is increased by CYP2E1 in rodent liver and HepG2 cells and protects against oxidative stress caused by CYP2E1. *Hepatology.* 2006;43(1):144-53.

Griess JP. *Ber Deutsch Chem Ges.* 1879;12,426

Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, et al. Role of NF-kB in regulation of PXR-mediated gene expression. *J Biol Chem.* 2006;281(26):17882-89.

Guengerich FP. Comparison of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact.* 1997;106(3):161-82.

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.

Hahnemann B, Salonpää P, Pasanen M, Mäenpää J, Honkakoski P, Juvonen R, et al. Effect of pyrazole, cobalt and phenobarbital on mouse liver cytochrome P-450 2a-4/5 (Cyp2a-4/5) expression. *Biochem J.* 1992;286(Pt 1):289-94.

Islam M, Frye RF, Richards TJ, Sheitan I, Donnelly SS, Glue P, et al. Differential effect of IFN α -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.

Kapitulnik J, Ostrow JD. Stimulation of bilirubin catabolism in jaundice Gunn rats by an inducer of microsomal mixed-function monooxygenases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(2):682-5.

Kennedy SW, Jones SP. Simultaneous measurement of cytochrome P4501A catalytic activity and total protein concentration with fluorescent plate reader. *Anal Biochem.* 1994;222(1):217-23.

Khatsenko OG, Gross SS, Rifkind AB, Vane JR. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(232):11147-151.

Khatsenko O, Kikkawa Y. Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280(3):1463-70.

Khatsenko OG, Barteneva NS, de la Maza LM, Kikkawa Y. Role of nitric oxide in the inhibition of cytochrome P450 in the liver of mice infected with *Chlamydia trachomatis*. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(11):1835-42.

Kirby GM, Chemin I, Montesano R, Chisari FV, Lang MA, Wild CP. Induction of specific cytochrome P450s involved in aflatoxin B1 metabolism in hepatitis B virus transgenic mice. *Mol Carcinog.* 1994;11(2):74–80.

Kirby GM, Batist G, Alpert L, Lamoureux E, Cameron RG, Alaoui-JAmali MA. Overexpression of cytochrome P-450 isoforms involved in aflatoxin B1 bioactivation in human liver with cirrhosis and hepatitis. *Toxicol Pathol.* 1996;24(4):458-67.

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.

Lämsä V, Levonen AL, Leinonen H, Ylä-Herttuala S, Yamamoto M, Hakkola J. Cytochrome P450 2A5 constitutive expression and induction by heavy metals is dependent on redox-sensitive transcription factor Nrf2 in liver. *Chem Res Toxicol.* 2010;23(5):977-85.

Lang MA, Juvonen R, Järvinen P, Honkakoski P, Raunio H. Mouse liver P450Coh: genetic regulation of the pyrazole-inducible enzyme and comparison with other P450 isoenzymes. *Arch Biochem Biophys.* 1989;271(1):139-48.

Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res.* 2008;58(5-6):262-70.

Li XY, Zhang C, Wang H, Ji YL, Wang SF, Zhao L, et al. Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced downregulation of CYP3A in fetal liver: its repression by a low dose LPS pre-treatment. *Toxicol Lett.* 2008a; 179(2):71-7.

Li XY, Zhang C, Wang SF, Ji YL, Wang H, Zhao L, et al. Maternally administered lipopolisaccharide (LPS) upregulates the expression of heme-oxygenase-1 in fetal liver: The role of reactive oxygen species. *Toxicol Lett.* 2008b; 176 (3): 169-77.

Li-Masters T, Morgan ET. Down-regulation of phenobarbital-induced cytochrome P4502B mRNAs and proteins by endotoxin in mice: independence from nitric oxide production by inducible nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(12):1703-11.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-08.

Lu Y, Gong P, Cederbaum AI. Pyrazole induced oxidative liver injury independent of CYP2E1/2A5 induction due to Nrf2 deficiency. *Toxicology*. 2008;252(1-3):9-16.

Marcinkiewicz J, Grabowseka A, Lauterbach R, Bobek M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. *Immunopharmacology*. 2000;49(3):335-343.

Marinkovic S, Jahreis GP, Wong GG, Baumann H. IL-6 modulates synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins *in vivo*. *J Immunol*. 1989;142(3):808-812.

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.

Melo MLP, Brito GAC, Soares RC, Carvalho SBLM, Silva JV, Soares PMG et al. Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β e KC) in the pathogenesis of the CPT-11 induced in the intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(5):775-84.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.

Monshouwer M, McLellan RA, Delaporte E, Witkamp RF, van Miert AS, Renton KW. Differential effects of pentoxifylline on lipopolysaccharide-induced downregulation of cytochrome P450. *Biochem Pharmacol*. 1996;52(8):1195-1200.

Montero R, Gentile GJ, Frederick L, McMannis J, Murphy T, Silva G, et al. Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. *Mutagenesis*. 1999;14(2):217-20.

Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev.* 1997;29(4):1129-88.

Morgan ET. Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450- mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(4):434-38.

Moriya N, Kataoka H, Fujino H, Nishikawa J, Kugawa F. Effects of lipopolysaccharide on the xenobiotic-induced expression and activity of hepatic cytochrome P450 in mice. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(4):473-80.

Nakamura M, Imaoka S, Amano F, Funae Y. P450 isoforms in a murine macrophage cell line, RAW264.7, and changes in the levels of P450 isoforms by treatment of cells with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Jun, 1385(1):101-6.

Neigishi M, Uno T, Honkakoski P, Sueyoshi T, Darden TA, Pendersen LP. The roles of individual amino acids in altering substrate specificity of the P450 2a4 / 2a5 enzymes. *Biochimie.* 1996;78(8-9):685-94.

Nelson DR. The Cytochrome P450 Homepage. *Human Genomics.* 2009;4(1):59-65. Disponível em: <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>

Noel P, Nelson S, Bokulic R, Bagby G, Lipton H, Lipscomb G, Summer W. Pentoxifyline inhibits lipopolysaccharide-induced serum tumor necrosis factor and mortality. *Life Sci.* 1990;47(12):1023-29.

Okuno H, Takasu M, Kano H, Seki T, Shiozaki Y, Inoue K. Depression of drug-metabolizing activity in the human liver by interferon-beta. *Hepatology.* 1993;17(1):65-9.

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.

Parkinson A. Biotransformation of Xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Klaassen, CD, Amdur MO & Doull J, McGraw-Hill, editors. Inc., New York, St. Louis, San Francisco. 2001. p. 113-86.

Paton TE, Renton KW. Cytokine-mediated down-regulation of CYP1A1 in Hepa1 cells. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(11):1791-96.

Pelkonen O, Sotaniemi EA, Ahokas JT. Coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Properties of the enzyme and interspecies comparisons. *Br J Clin Pharmacol.* 1985;19(1):59-66.

Petrovic V, Teng S, Piquette-Miller M. Regulation of drug transporters during infection and inflammation. *Mol Interv.* 2007;7(2):99-111.

Prandota J. Important role of proinflammatory cytokines/Other endogenous substances in drug-induced hepatotoxicity: depression of drug metabolism during infection/inflammation states, and genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes/Cytokines may markedly contribute to this pathology. *Am J Ther.* 2005; 12 (3): 254-261.

Raunio H, Syngelmä T, Pasanen M, Juvonen R, Honkakoski P, Kairaluoma MA, et al. Immunochemical and catalytical studies on hepatic coumarin 7-hydroxylase in man, rat, and mouse. *Biochem Pharmacol.* 1988;37(20):3889-95.

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.

Ribeiro Pinto LF, Moraes E, Albano RM, Silva MC, Godoy W, Glisovic T, et al. Rat oesophageal cytochrome P450 (CYP) monooxygenase system: comparison to the liver and relevance in N-nitrosodiethylamine carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2001;22(11):1877-83.

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

Robottom-Ferreira AB, Aquino SR, Queiroga R, Albano RM, Ribeiro Pinto LF. Expression of CYP2A3 mRNA and its regulation by 3-methylcholanthrene, pyrazole, and b-ionone in rat tissues. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(7):839-44.

Rosenfeld JM, Vargas R Jr, Xie W, Evans RM. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol Endocrinol.* 2003;17(7):1268-82.

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant response element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11632-39.

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;5(10):795-800.

Schmid R, Hammaker L. Metabolism and disposition of ¹⁴C-bilirubin in congenital non-hemolytic jaundice. *J Clin Invest.* 1963;42:1720-34.

Schmidt HHW, Wike P, Evers B, Böhme E. Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;165(1):284-291.

Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(37):15837-42.

Sewer MB, Barclay TB, Morgan ET. Down-regulation of cytochrome P450 mRNAs and proteins in mice lacking a functional NO2 gene. *Mol Pharmacol.* 1998;54(2):273-79.

Shedlofsky SI, Swim AT, Robinson JM, Gallicchio VS, Cohen DA, McClain CJ. Interleukin-1 (IL-1) depresses cytochrome P450 levels and activities in mice. *Life Sci.* 1987;40(24):2331-6.

Shedlofsky SI, Israel BC, Tosheva R, Blouin RA. Endotoxin depresses hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism in women. *Br J Clin Pharmacol*. 1997;43(6):627-32.

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.

Simonsson USH, Lindell M, Raffali-Mathieu F, Lannerbro A, Honkakoski P, Lang MA. In vivo and mechanistic evidence of nuclear receptor CAR induction by artemisinin. *Eur J Clin Invest*. 2006;36(9):647-53.

Sipowicz MA, Chomarat P, Diwan BA, Anver MA, Awashi YC, Ward JM, et al. Increased oxidative DNA damage and hepatocyte over expression of specific cytochrome P450 isoforms in hepatitis of mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol*. 1997;151(4):933-41.

Squires EJ, Negishi M. Reciprocal regulation of sex-dependent expression of testosterone 15 alpha-hydroxylase (P-450 (15 alpha)) in liver and kidney of male mice by androgen. Evidence for a single gene. *J Biol Chem*. 1988;263(9):4166-71.

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.

Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2396-402.

Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82(22):7738-7742.

Su T, Ding X. Regulation of the cytochrome P450 2A genes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;199(3):285-94.

Taha H, Grochot-Przeczek A, Was H, Kotlinowski J, Kosakovska M, Marek A, et al. Modulation of inflammatory response by pentoxifylline is independent of heme-oxygenase-1 pathway. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(2):3-12.

Ueda K, Hamadeh HK, Webb HK, Yamamoto Y, Sueyoshi T, Afshari CA, et al. Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital. *Mol Pharmacol.* 2002;61(1):1-6.

Urvila J, Arpiainen S, Pelkonen O, Aida K, Sueyoshi T, Negishi M, et al. Regulation of Cyp2a5 transcription in mouse primary hepatocytes: roles of hepatocyte nuclear factor 4 and nuclear factor I. *Biochem J.* 2004;381(Pt 3):887-94.

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(4):387-90.

Visoni S, Meireles N, Monteiro L, Rossini A, Pinto LFR. Different modes of inhibition of mouse Cyp2a5 and rat CYP2A3 by the food-derived 8-methoxypsoralen. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(3):1190-95.

Xu D-X, Wei W, Sun M-F, Wu C-Y, Wang J-P, Wei LZ, et al. Kupffer cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane X receptor and its target gene Cyp3A4 in mouse liver. *Free Rad Biol Med.* 2004;37(1):10-22.

Wang H, Donley KM, Keeney DS, Hoffman SM. Organization and evolution of the Cyp2 gene cluster on mouse chromosome 7, and comparison with the syntenic human cluster. *Environ Health Perspect.* 2003;111(15):1835-42.

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.

Wastl UM, Rossmannith W, Lang MA, Camus-Randon AM, Grasl-Kraupp B, Bursch W, et al. Expression of cytochrome P450 2A5 in preneoplastic and neoplastic mouse liver lesions. *Mol Carcinog.* 1998;22(4):229-34.

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.

Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis.* 1992;13(10):1789-94.

Yang XX, Hu ZP, Chan SY, Zhou SF. Monitoring drug-protein interaction. *Clin Chim Acta.* 2006;365(1-2):9-29.

Yongvanit P, Phanomsri E, Namwat N, Kampan J, Tassaneeyakul W, Loilome W, et al. Hepatic cytochrome P450 2A6 and 2E1 status in peri-tumor tissues of patients with *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma. *Parasitol Int.* 2012;6 (1):162-6.

CAPÍTULO VI

Anexos

6.1. Anexo 1

Este anexo contempla diversas tabelas com valores (Média \pm EPM) e número absoluto (N) de animais em cada grupo e nas diversas análises biológicas realizadas no **Capítulo II** deste estudo.

Tabela 6.1. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média \pm EPM) de camundongos BALBc/An (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	21,42 \pm 0,36	21,98 \pm 0,33	1,12 \pm 0,02	6
PIR	20,98 \pm 0,50	20,77 \pm 0,69	1,05 \pm 0,05	6
FEN	21,34 \pm 0,51	21,04 \pm 0,54	1,19 \pm 0,06	5

Tabela 6.2. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média \pm EPM) de camundongos B6D2F1 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	19,96 \pm 0,21	20,25 \pm 0,21	0,98 \pm 0,02	6
PIR	19,91 \pm 0,16	19,40 \pm 0,34	1,02 \pm 0,04	6
FEN	19,91 \pm 0,29	19,93 \pm 0,23	1,09 \pm 0,03	6

Tabela 6.3. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos CBA (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	18,30±0,33	18,55±0,24	0,96±0,01	6
PIR	18,40±0,18	17,78±0,31	0,94±0,01	6
FEN	17,53±0,83	16,92±0,73	1,01±0,03	6

Tabela 6.4. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos C57BL/6 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	17,60±0,27	17,91±0,38	0,89±0,03	6
PIR	18,13±0,44	17,22±0,20	1,04±0,02	6
FEN	17,82±0,41	17,52±0,34	1,03±0,04	6

Tabela 6.5. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos C57BL/10(fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	20,22±0,28	20,87±0,33	1,06±0,02	6
PIR	20,64±0,44	20,40±0,36	1,22±0,03	6
FEN	19,47±0,46	19,72±0,36	1,10±0,04	6

Tabela 6.6. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos DBA-1 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	17,09±0,22	17,63±0,16	0,92±0,01	6
PIR	17,08±0,28	17,08±0,22	0,97±0,02	6
FEN	17,92±0,44	17,86±0,37	1,06±0,03	6

Tabela 6.7. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D3 (g)	Fígado (g)	N
CON	21,30±0,69	21,06±0,71	1,03±0,04	6
PIR	20,15±0,58	19,90±0,51	1,09±0,03	6
FEN	20,01±0,41	18,94±0,50	1,05±0,04	6

Tabela 6.8. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D3) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos Swiss Webster (fêmeas adultas) tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24h após o último tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D2 (g)	Fígado (g)	N
CON	35,97±1,90	36,30±1,82	1,57±0,08	6
PIR	36,12±0,97	34,21±0,81	1,70±0,05	6
FEN	38,03±0,94	36,53±0,89	1,99±0,08	6

Tabela 6.9. Atividades de COH (média±EPM) nos microsomas de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Linhagem	Atividades (pmoles umbeliferona /mg ptn / min)			N
	CON	PIR	FEN	
BALB/cAn	35,2 ± 2,9	69,7 ± 4,4	75,3 ± 6,0	6*
B6D2F1	113,3 ± 11,6	437,8 ± 24,3	308,4 ± 20,6	6
CBA	32,9 ± 5,0	119,7 ± 5,2	91,9 ± 5,4	6
C57BL/6	44,5 ± 6,0	112,1 ± 8,4	62,2 ± 5,5	6
C57BL/10	24,4 ± 3,8	88,1 ± 4,1	63,6 ± 5,9	6**
DBA-1	142,5 ± 28,3	344,8 ± 50,6	261,8 ± 24,6	6
DBA-2	228,4 ± 24,8	507,7 ± 12,5	493,5 ± 11,7	6
SwissWebster	24,1 ± 5,3	79,1 ± 10,4	42,53 ± 3,1	6

* O grupo tratado com FEN apresenta 5 fêmeas.

** O grupo tratado com PIR apresenta 5 fêmeas.

Tabela 6.10. Atividades de EROD (média±EPM) nos microsomas de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Linhagem	Atividades (pmoles resorufina /mg ptn / min)			N
	CON	PIR	FEN	
BALB/cAn	71,2 ± 6,0	103,1 ± 9,0	532,7 ± 77,5	6*
B6D2F1	68,8 ± 3,4	66,6 ± 3,6	251,1 ± 14,1	6
CBA	74,9 ± 4,9	61,5 ± 5,5	293,0 ± 33,7	6
C57BL/6	99,2 ± 7,2	98,7 ± 8,6	444,3 ± 28,6	6
C57BL/10	132,2 ± 9,4	135,5 ± 16,9	598,7 ± 59,5	6**
DBA-1	50,2 ± 3,3	50,0 ± 4,0	265,7 ± 13,1	6
DBA-2	74,9 ± 7,9	64,3 ± 6,3	338,1 ± 14,8	6
SwissWebster	72,8 ± 7,6	74,8 ± 9,1	348,5 ± 29,7	6

* O grupo tratado com FEN apresenta 5 fêmeas.

** O grupo tratado com PIR apresenta 5 fêmeas.

Tabela 6.11. Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Linhagem	Atividades (pmoles resorufina /mg ptn / min)			N
	CON	PIR	FEN	
BALB/cAn	56,6 ± 5,7	53,3 ± 4,0	192,8 ± 23,9	6*
B6D2F1	35,2 ± 4,1	45,0 ± 5,3	306,5 ± 8,8	6
CBA	22,0 ± 2,3	19,8 ± 3,5	212,5 ± 22,4	6
C57BL/6	47,3 ± 5,8	33,4 ± 4,8	158,9 ± 8,7	6
C57BL/10	42,6 ± 3,5	72,9 ± 29,9	181,3 ± 5,5	6**
DBA-1	26,8 ± 1,4	43,4 ± 12,4	271,0 ± 2,3	6
DBA-2	39,8 ± 2,8	41,0 ± 3,8	266,9 ± 28,5	6
SwissWebster	41,2 ± 7,8	38,8 ± 10,2	143,6 ± 4,4	6

* O grupo tratado com FEN apresenta 5 fêmeas.

** O grupo tratado com PIR apresenta 5 fêmeas.

Tabela 6.12. Níveis de ALT (média±EPM) no soro de camundongos fêmeas de diferentes linhagens tratadas com PBS (Controle – CON), Pirazol (PIR 100 mg/kg) ou fenobarbital (FEN 80 mg/kg). Os animais foram tratados por 3 dias consecutivos por via ip e mortos 24 h após o último tratamento. N = número de animais.

Linhagem	Nível sérico (UI / L)			N
	CON	PIR	FEN	
BALB/cAn	135,2 ± 4,1	155,9 ± 7,38	141,5 ± 8,0	6*
B6D2F1	136,9 ± 8,7	194,9 ± 37,6	134,7 ± 6,0	6
CBA	139,7 ± 2,6	227,8 ± 36,7	147,6 ± 3,9	6
C57BL/6	137,4 ± 7,4	143,5 ± 6,4	138,0 ± 9,9	6**
C57BL/10	146,0 ± 6,3	258,3 ± 23,3	161,5 ± 5,3	6
DBA-1	165,7 ± 9,0	164,6 ± 6,1	148,8 ± 4,8	6
DBA-2	146,9 ± 11,3	159,8 ± 6,3	158,3 ± 2,2	6***
SwissWebster	134,0 ± 12,3	168,8 ± 13,6	145,2 ± 10,3	6

* O grupo tratado com FEN apresenta 5 fêmeas.

** O grupo CON apresenta 5 fêmeas.

*** O grupo CON apresenta 4 fêmeas.

6.2. Anexo 2

Este anexo contempla diversas tabelas com valores (Média \pm EPM) e número absoluto (N) de animais em cada grupo e nas diversas análises biológicas realizadas, além de figuras criadas para o **Capítulo III** deste estudo.

Tabela 6.13. Pesos nos dias do tratamento (D0), no dia da morte (D1) e pesos dos fígados (Média \pm EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS (PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min depois do LPS nas diversas doses). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1: controle para o LPS (animais tratados com PBS 10 mL/kg de peso corporal; morte 24 h após). CON2: controle para PTX + LPS (animais tratados com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com intervalo de 60 min entre as injeções e morte 24 h e 30 min após primeiro tratamento. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D1 (g)	Fígado (g)	N
CON 1 - PBS	19,13 \pm 0,45	18,84 \pm 0,39	0,88 \pm 0,02	19
0,05	18,61 \pm 0,29	17,85 \pm 0,25	0,87 \pm 0,02	10
0,1	17,95 \pm 0,61	16,85 \pm 0,58	0,87 \pm 0,04	10
0,5	18,66 \pm 0,60	16,85 \pm 0,62	0,88 \pm 0,05	17
1	16,99 \pm 0,53	15,08 \pm 0,52	0,78 \pm 0,03	10
5	17,94 \pm 0,56	15,55 \pm 0,50	0,75 \pm 0,02	16
10	17,98 \pm 0,46	15,92 \pm 0,32	0,73 \pm 0,02	14
20	19,20 \pm 0,40	16,99 \pm 0,42	0,73 \pm 0,02	14
CON 2 - PTX	17,59 \pm 0,46	17,05 \pm 0,28	0,92 \pm 0,02	5
PTX+LPS 0,05+PTX	19,44 \pm 0,63	18,66 \pm 0,58	0,97 \pm 0,03	10
PTX+LPS 0,1+PTX	18,44 \pm 0,67	17,49 \pm 0,63	0,90 \pm 0,04	10
PTX+LPS 0,5+PTX	19,31 \pm 0,45	17,88 \pm 0,47	0,97 \pm 0,04	16
PTX+LPS 1+PTX	18,28 \pm 0,46	16,39 \pm 0,40	0,85 \pm 0,03	10
PTX+LPS 5+PTX	18,26 \pm 0,45	16,26 \pm 0,48	0,84 \pm 0,04	17
PTX+LPS 10+PTX	18,18 \pm 0,33	16,04 \pm 0,32	0,83 \pm 0,03	14
PTX+LPS 20+PTX	18,67 \pm 0,42	16,70 \pm 0,42	0,79 \pm 0,03	18

Tabela 6.14. Pesos nos dias do tratamento (D0), no dia da morte (D1) e pesos dos fígados (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com PTX na dose de 100 mg/kg de peso corporal e mortos 24 h após; tratados com PTX na dose de 200 mg/kg (2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo) e mortos 24 h e 30 min após o primeiro tratamento. PBS 1: animais receberam PBS 10 mL/kg de peso corporal e são controle para a PTX 200 mg/kg. PBS 2: animais receberam PBS 2x10 mL/kg de peso corporal e são controle para a PTX 2x100 mg/kg. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D1 (g)	Fígado (g)	N
PBS 1	19,13±0,45	18,84±0,39	0,88±0,02	19
P 100	19,07±0,70	18,88±0,56	0,89±0,03	14
PBS 2	17,00±0,53	16,50±0,60	0,89±0,05	4
P 200	17,59±0,46	17,05±0,28	0,92±0,02	5

Tabela 6.15. Atividades de COH, EROD e BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com PTX na dose de 100 mg/kg de peso corporal e mortos 24h após; tratados com PTX na dose de 200 mg/kg (2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo) e mortos 24 h e 30 min após o primeiro tratamento. PBS 1: animais receberam PBS 10 mL/kg de peso corporal e são controle para a PTX 100 mg/kg. PBS 2: animais receberam PBS 2x10 mL/kg de peso coprpral e são controle para a PTX 2x100 mg/kg. N = número de animais.

Grupo Experimental	Atividade (pmol / mg ptn / min)			N
	COH	EROD	BROD	
PBS 1	297,6±19,4	69,3±5,6	75,1±8,8	13
P 100	249,1±36,9	75,4±10,0	72,1±21,7	8
PBS 2	236,2±21,0	90,4±6,6	83,7±11,3	4
P 200	243,9±7,1	108,5±4,5	135,4±7,2	5

Tabela 6.16. Níveis séricos das citocina (média±EPM) pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IFN- γ , IL-2 e IL-17A) em camundongos DBA-2 fêmeas tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. N = número de animais.

Grupos (mg / kg)	Concentração (pg / mL)					N
	IL-6	TNF	IFN-γ	IL-2	IL-17A	
CON 1 - PBS	6,5±0,9	3,5±0,8	1,7±0,3	0,9±0,1	1,8±0,2	10
0,05	10,3±0,9	8,3±1,8	3,6±0,7	1,1±0,2	2,2± 0,3	8
0,1	29,2±7,7	10,1±2,5	7,0±1,5	1,1±0,2	4,0±1,4	8
0,5	26,9±3,2	16,4±2,0	10,6±4,3	1,1±0,1	2,0±0,1	8
1	34,4±7,7	14,5±2,6	5,9±1,1	1,2±0,1	1,7±0,1	8
5	115,5±17,6	37,3±5,6	19,8±2,5	1,4±0,2	2,8±0,3	8
10	5041±2158	134,0±37,8	292,1±164,5	1,1±0,1	11,5±3,3	8
20	9557±1678	436,2±85,8	1512±421,6	1,3±0,1	47,5±11,8	10
CON 2 - PTX	6,0±0,8	6,1±1,2	2,3±0,3	0,9±0,1	2,1±0,2	8
PTX+LPS 0,05+PTX	29,6±4,8	7,4±1,8	4,5± 1,2	1,2±0,1	2,5±0,8	8
PTX+LPS 0,1+PTX	19,7±1,8	8,5±1,7	3,5±0,3	1,3±0,2	2,0±0,2	8
PTX+LPS 0,5+PTX	31,8±3,6	14,9±2,5	4,6±0,8	1,2±0,1	1,9±0,2	8
PTX+LPS 1+PTX	61,7±16,0	18,1±3,0	4,2±0,4	1,5±0,1	2,3±0,3	8
PTX+LPS 5+PTX	93,2±20,0	32,5±4,9	6,9±0,8	2,5±0,4	3,3±0,6	8
PTX+LPS 10+PTX	250,0±33,1	52,0±6,1	11,5±1,7	3,6±0,6	5,0±0,8	8
PTX+LPS 20+PTX	309,2±51,0	47,3±8,9	16,1±2,9	2,9±0,6	4,0±1,1	8

Tabela 6.17. Níveis séricos das citocinas (média±EPM) anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) em camundongos DBA-2 fêmeas tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS). Os animais foram mortos 24h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Concentração (pg / mL)		N
	IL-4	IL-10	
CON 1 - PBS	2,9 ± 0,2	24,9 ± 3,2	10
0,05	3,3 ± 0,4	27,8 ± 6,2	8
0,1	4,2 ± 0,6	60,6 ± 18,9	8
0,5	3,2 ± 0,2	32,8 ± 3,9	8
1	3,2 ± 0,2	30,4 ± 3,6	8
5	3,4 ± 0,4	42,4 ± 6,8	8
10	4,2 ± 1,2	87,1 ± 34,8	8
20	3,3 ± 0,2	75,6 ± 11,6	10
CON 2 - PTX	2,9 ± 0,1	29,0 ± 3,1	8
PTX+LPS 0,05+PTX	3,8 ± 0,4	42,7 ± 12,6	8
PTX+LPS 0,1+PTX	3,3 ± 0,3	32,8 ± 5,4	8
PTX+LPS 0,5+PTX	3,4 ± 0,3	29,9 ± 3,9	8
PTX+LPS 1+PTX	4,1 ± 0,3	47,2 ± 6,8	8
PTX+LPS 5+PTX	5,5 ± 0,8	66,4 ± 18,0	8
PTX+LPS 10+PTX	7,7 ± 1,1	120,8 ± 24,4	8
PTX+LPS 20+PTX	6,9 ± 1,1	93,2 ± 25,1	8

Tabela 6.18. Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal e morte 24h e 30 min após primeira injeção. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Nitrito (μM)	N
CON 1- PBS	35,1 \pm 2,1	19
0,05	23,0 \pm 1,4	10
0,1	24,9 \pm 0,9	10
0,5	35,6 \pm 2,9	17
1	31,8 \pm 3,0	10
5	75,8 \pm 9,9	16
10	198,7 \pm 50,3	14
20	221,4 \pm 31,4	12
CON 2 - PTX	20,6 \pm 1,2	14
PTX+LPS 0,05+PTX	20,3 \pm 1,3	10
PTX+LPS 0,1+PTX	21,6 \pm 1,7	10
PTX+LPS 0,5+PTX	26,2 \pm 1,7	16
PTX+LPS 1+PTX	30,0 \pm 2,8	10
PTX+LPS 5+PTX	31,8 \pm 2,2	17
PTX+LPS 10+PTX	51,1 \pm 3,1	18
PTX+LPS 20+PTX	119,8 \pm 16,2	14

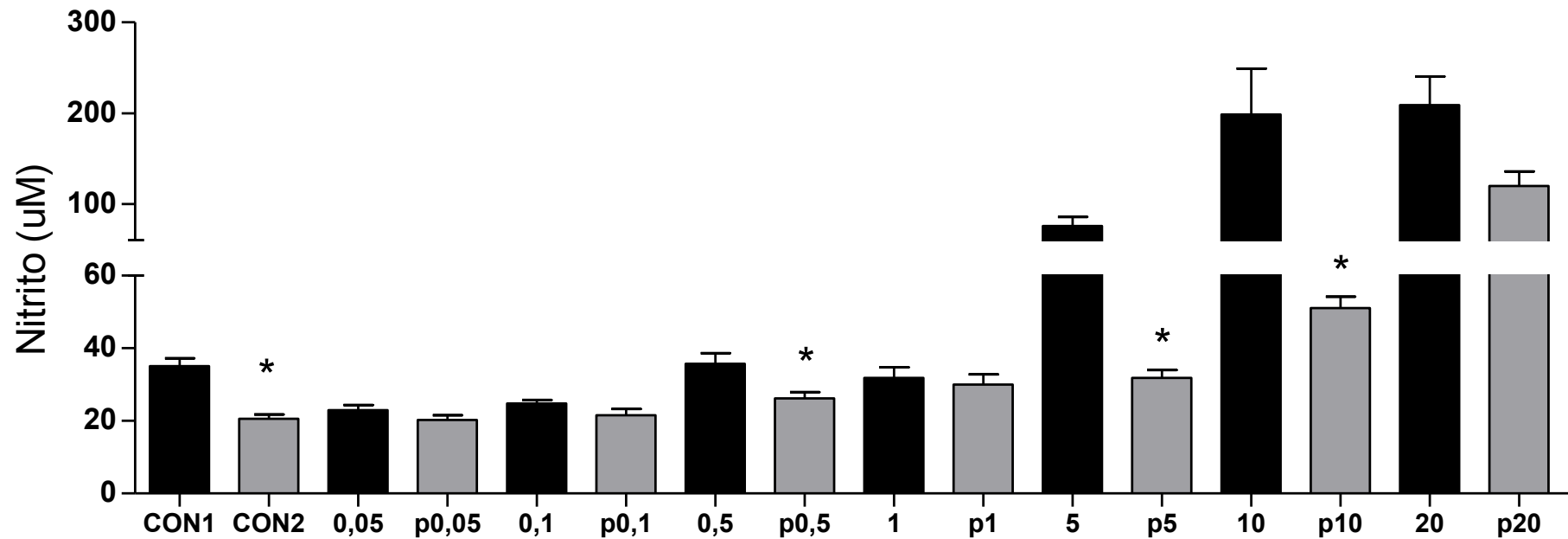


Figura 6.1. Alterações da concentração sérica de nitrito (μM) em camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mL/kg de peso corporal (em preto) e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS – em cinza). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. Análise estatística: Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$. * tratado com LPS difere do co-tratamento (PTX + LPS) na mesma dose.

Tabela 6.19. Atividades de COH (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Atividade (pmol umbeliferona / mg ptn / min)	N
CON 1 - PBS	297,6 ± 19,4	13
0,05	230,2 ± 30,6	6
0,1	241,1 ± 19,4	6
0,5	178,2 ± 10,4	10
1	210,4 ± 25,4	6
5	234,2 ± 41,6	9
10	270,6 ± 51,1	9
20	345,3 ± 34,4	13
CON 2 - PTX	243,9 ± 7,13	5
PTX+LPS 0,05+PTX	173,9 ± 17,2	6
PTX+LPS 0,1+PTX	139,2 ± 17,0	6
PTX+LPS 0,5+PTX	144,5 ± 16,1	10
PTX+LPS 1+PTX	117,0 ± 12,1	6
PTX+LPS 5+PTX	127,4 ± 21,3	8
PTX+LPS 10+PTX	103,9 ± 12,6	9
PTX+LPS 20+PTX	205,5 ± 46,3	8

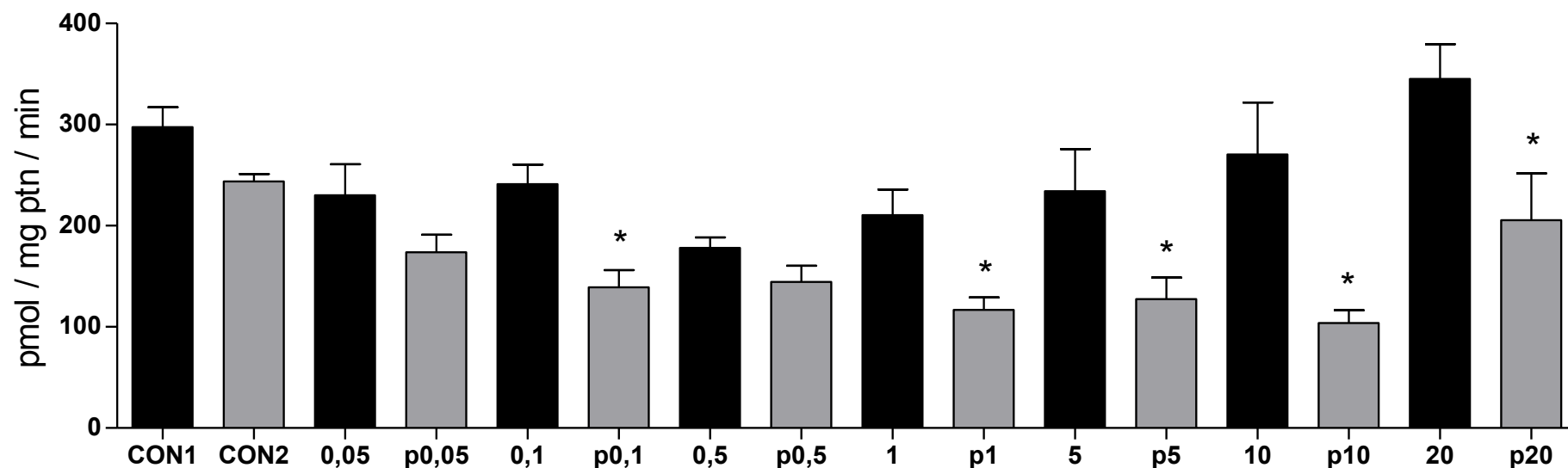


Figura 6.2. Alterações da atividade (pmol umbeliferona / mg ptn / min) da cumarina 7-hidroxilase (COH, Cyp2a5), nos fígados de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mL/kg de peso corporal (em preto) e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS – em cinza). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. Análise estatística: Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$. * tratado com LPS difere do co-tratamento (PTX + LPS) na mesma dose.

Tabela 6.20. Atividades de EROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Atividade (pmol resorufina / mg ptn / min)	N
CON 1 - PBS	69,3 ± 5,6	13
0,05	76,7 ± 8,0	6
0,1	68,9 ± 4,5	6
0,5	53,4 ± 7,0	10
1	62,5 ± 3,3	6
5	43,9 ± 4,3	9
10	49,2 ± 5,1	9
20	42,7 ± 3,0	13
CON 2 - PTX	108,5 ± 4,5	5
PTX+LPS 0,05+PTX	85,8 ± 5,2	6
PTX+LPS 0,1+PTX	70,2 ± 6,3	6
PTX+LPS 0,5+PTX	56,3 ± 7,8	10
PTX+LPS 1+PTX	62,9 ± 5,7	6
PTX+LPS 5+PTX	41,8 ± 4,7	8
PTX+LPS 10+PTX	48,0 ± 3,9	9
PTX+LPS 20+PTX	44,9 ± 4,6	8

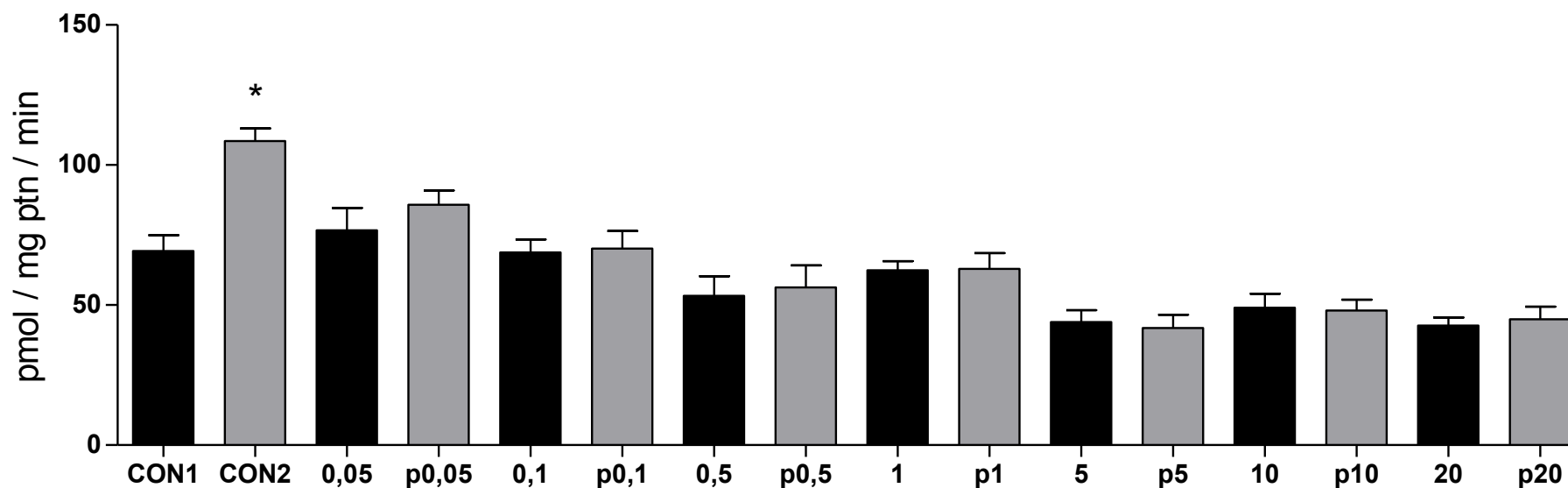


Figura 6.3. Alterações da atividade (pmol resorufina / mg ptn / min) da etoxi-resorufina-*O*-desalquilase (EROD, Cyp1a1/2), nos fígados de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mL/kg de peso corporal (em preto) e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS – em cinza). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. Análise estatística: Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$. * tratado com LPS difere do co-tratamento (PTX + LPS) na mesma dose.

Tabela 6.21. Atividades de BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mg/kg de peso corporal e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo e morte 24 h e 30 min após primeira injeção. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Atividade (pmol resorufina / mg ptn /min)	N
CON 1 - PBS	75,1 ± 8,8	13
0,05	102,1 ± 3,1	6
0,1	105,9 ± 11,9	6
0,5	70,4 ± 14,2	10
1	79,3 ± 4,2	6
5	39,7 ± 11,1	9
10	45,2 ± 9,7	9
20	32,8 ± 6,2	13
CON 2 - PTX	135,4 ± 7,2	5
PTX+LPS 0,05+PTX	107,8 ± 17,1	6
PTX+LPS 0,1+PTX	90,9 ± 6,8	6
PTX+LPS 0,5+PTX	67,6 ± 15,4	10
PTX+LPS 1+PTX	96,2 ± 10,6	6
PTX+LPS 5+PTX	50,2 ± 11,9	8
PTX+LPS 10+PTX	67,4 ± 10,1	9
PTX+LPS 20+PTX	45,0 ± 12,6	8

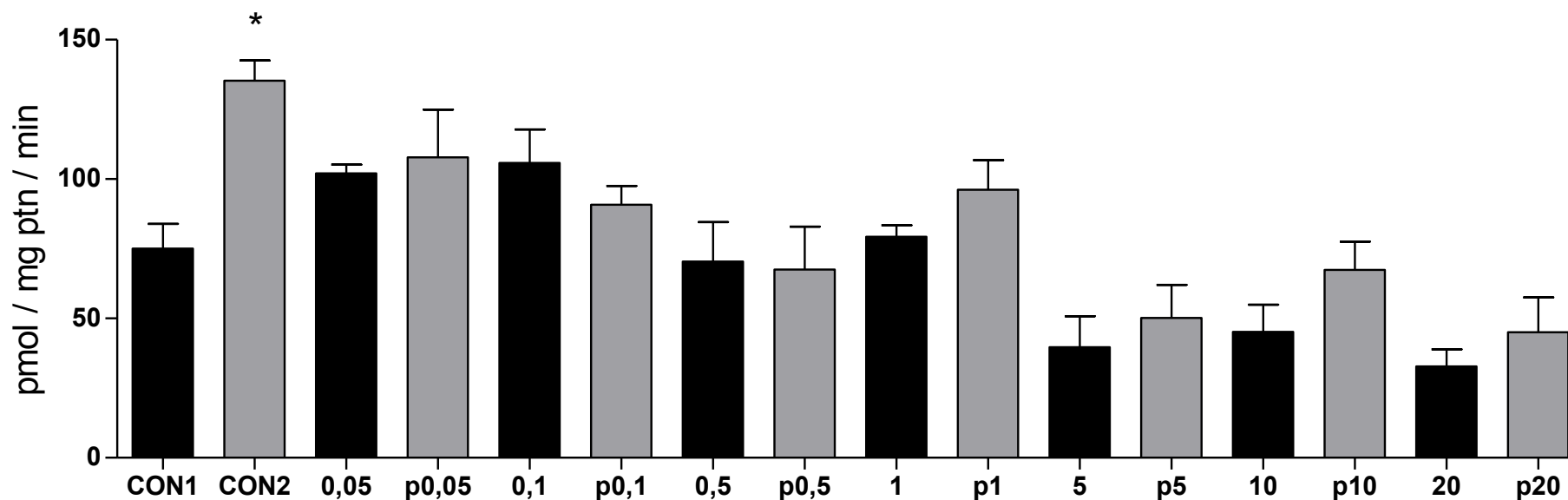


Figura 6.4. Alterações da atividade (pmol resorufina / mg ptn / min) da benziloxi-resorufina-*O*-desalquilase (BROD, Cyp2b9/10), nos fígados de camundongos DBA-2 tratados com LPS nas doses de 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 mL/kg de peso corporal (em preto) e combinação de PTX + LPS nas diferentes doses (PTX: 2x100 mg/kg de peso corporal, 30 min antes e 30 min após o LPS – em cinza). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON1 = Tratamento com PBS 10 mL/kg de peso corporal e morte 24 h após. CON2 = Tratamento com PTX 2x100 mg/kg de peso corporal, com 60 min de intervalo e morte 24h e 30 min após primeira injeção. Análise estatística: Kruskal Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney, $p < 0,05$. * tratado com LPS difere do co-tratamento (PTX + LPS) na mesma dose.

Tabela 6.22. Peso dos animais no dia do tratamento (D0), no dia da morte (D1) e peso do fígado (Média±EPM) de camundongos DBA-2 (fêmeas adultas) tratadas com LPS na dose de 10 mg/kg de peso corporal, aminoguanidina nas doses de 50 ou 100 mg/kg de peso corporal e suas combinações (Ag + LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON = animais receberam PBS (10 mL/kg de peso corporal) e foram mortos 24 h após. N = número de animais.

Grupos (mg/kg)	D0 (g)	D1 (g)	Fígado (g)	N
CON	17,92±0,78	17,75±0,66	0,86±0,04	7
Ag 50	17,16±0,25	16,79±0,25	0,91±0,04	6
Ag 100	17,62±0,44	17,36±0,45	0,90±0,05	6
LPS 10	19,04±0,32	16,80±0,35	0,72±0,037	9
a50L	16,88±0,22	14,27±0,36	0,70±0,02	6
a100L	16,69±0,26	14,33±0,15	0,77±0,01	6

Tabela 6.23. Concentração de nitrito (média±EPM) no soro de fêmeas DBA-2 tratadas com LPS na dose de 10 mg/kg de peso corporal, aminoguanidina nas doses de 50 ou 100 mg/kg de peso corporal e suas combinações (Ag + LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON = animais receberam PBS (10 mL/kg de peso corporal) e foram mortos 24 h após. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Nitrito (µM)	N
CON	25,4 ± 0,9	5
Ag 50	26,3 ± 2,3	6
Ag 100	23,0 ± 1,0	6
LPS 10	325,2 ± 14,6	5
a50L	157,6 ± 44,4	6
a100L	113,0 ± 45,6	6

Tabela 6.24. Atividade de COH, (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS na dose de 10 mg/kg de peso corporal, aminoguanidina nas doses de 50 e 100 mg/kg de peso corporal e suas combinações (Ag + LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON = animais receberam PBS (10 mL/kg de peso corporal) e foram mortos 24 h após. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Atividade (pmol umbeliferona / mg ptn /min)	N
CON	263,3 ± 38,0	7
Ag 50	256,8 ± 27,7	6
Ag 100	226,1 ± 32,2	6
LPS 10	361,5 ± 69,9	9
a50L	286,3 ± 87,7	6
a100L	154,1 ± 30,0	6

Tabela 6.25. Atividade de EROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS na dose de 10 mg/kg de peso corporal, aminoguanidina nas doses de 50 e 100 mg/kg de peso corporal e suas combinações (Ag + LPS). Os animais foram mortos 24h após o tratamento com LPS. CON = animais receberam PBS (10 mL/kg de peso corporal) e foram mortos 24 h após. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Atividade (pmol resorufina / mg ptn /min)	N
CON	87,8 ± 8,3	7
Ag 50	91,1 ± 4,4	6
Ag 100	79,0 ± 3,3	6
LPS 10	54,2 ± 3,3	9
a50L	49,1 ± 2,4	6
a100L	45,4 ± 2,5	6

Tabela 6.26. Atividade de BROD (média±EPM) nos microsossomos de camundongos DBA-2 fêmeas, tratadas com LPS na dose de 10 mg/kg de peso corporal, aminoguanidina nas doses de 50 e 100 mg/kg de peso corporal e suas combinações (Ag + LPS). Os animais foram mortos 24 h após o tratamento com LPS. CON = animais receberam PBS (10 mL/kg de peso corporal) e foram mortos 24 h após. N = número de animais.

Grupo experimental (mg / kg)	Atividade (pmol resorufina / mg ptn /min)	N
CON	102,4 ± 9,0	7
Ag 50	97,5 ± 9,7	6
Ag 100	90,5 ± 8,6	6
LPS 10	61,5 ± 2,2	9
a50L	72,6 ± 5,1	6
a100L	65,1 ± 7,0	6

Verdade

A porta da verdade estava aberta,
mas só deixava passar
meia pessoa de cada vez.

Assim não era possível atingir toda a verdade,
porque a meia pessoa que entrava
só trazia o perfil de meia verdade.
E sua segunda metade
voltava igualmente com meio perfil.
E os meios perfis não coincidiam.

Arrebentaram a porta. Derrubaram a porta.
Chegaram ao lugar luminoso
onde a verdade esplendia seus fogos.
Era dividida em metades
diferentes uma da outra.

Chegou-se a discutir qual a metade mais bela.
Nenhuma das duas era totalmente bela.
E carecia optar. Cada um optou conforme
seu capricho, sua ilusão, sua miopia.

Carlos Drummond de Andrade