

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Paula Daniela Souza Alves

**Estudo do Papel das Células de *Kupffer* na modulação dos citocromos P450 hepáticos
por estímulos inflamatórios**

Rio de Janeiro

2016

Paula Daniela Souza Alves

**Estudo do Papel das Células de *Kupffer* na modulação dos citocromos P450 hepáticos
por estímulos inflamatórios**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Saúde Pública na área de concentração: Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Rio de Janeiro

2016

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

A474e Alves, Paula Daniela Souza
Estudo do Papel das Células de *Kupffer* na modulação dos citocromos P450 hepáticos por estímulos inflamatórios. / Paula Daniela Souza Alves. -- 2016.
68 f. : il. color. ; tab.

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2016.

1. Macrófagos do Fígado. 2. Sistema Enzimático do Citocromo P-450. 3. Xenobióticos - metabolismo. 4. Endotoxinas. 5. Gadolínio. 6. Eutanásia. 7. Fígado - enzimologia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 571.9685

Paula Daniela Souza Alves

**Estudo do Papel das Células de *Kupffer* na modulação dos citocromos P450 hepáticos
por estímulos inflamatórios**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Saúde Pública na área de concentração: Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Aprovada em: 26 de Abril de 2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^a. Dr^a. Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado

Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

AGRADECIMENTOS

Ao Klaus, melhor amigo e companheiro, por toda atenção e dedicação por ajudar quando precisei durante todo o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao meu pai, Claudio Francisco, e minha mãe Lisia por sempre me apoiarem, mesmo quando não concordando com as minhas escolhas.

Ao Professor Antônio Teva por abrir as portas da ENSP para mim e acreditar no meu potencial.

À Fernanda Santos por me indicar o Professor Francisco e acreditar no meu potencial.

Ao Professor Francisco Paumgarten pela oportunidade da orientação e a confiança para realizar essa dissertação.

À Dra. Ana Cecília de Oliveira pela oportunidade de grande aprendizado.

À Rose por todo carinho e paciência nos ensinamentos de manipulação com animais de laboratório.

À Sabrina Jorge pelo apoio. E obrigada também por sua infinita curiosidade e questionamentos.

À Ana Paula Carmo, Mônica, Gabriela, Thais, Manuella e ao Professor Davyson Moreira, que sempre estiveram presentes para qualquer ajuda, conversas e momentos de descontração.

À Hellen, Otávio, Onésimo e Maria por todo suporte laboratorial e apoio administrativo, e também pela paciência sempre que os pedi ajuda.

Ao Professor Eduardo Caio Santos (IOC), por ter me ensinado a administração intravenosa em camundongos e permitir que utilizasse seu espaço e equipamentos.

Ao Válter, Viviane, Solange e Luiza do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos (IOC) pelo apoio quando precisei utilizar seu espaço e equipamentos.

À Dra. Isabella Delgado, Professor Wlamir e Wilderberg (INCQS), pelo apoio quando precisei utilizar seu espaço e equipamentos.

Ao Professor Marcelo Alves Pinto (IOC), pelo super apoio, de ultracentrífuga à anticorpos e conversas sobre imunologia.

Ao Alexandre Fialho (IOC), pelo apoio, ensinamentos e paciência quando precisei utilizar seu espaço e equipamentos.

Ao Eduardo Volotão e Túlio (IOC), pelo apoio quando precisei utilizar seu espaço e equipamentos.

Ao Professor Marcelo Pelajo (IOC) por ter aceitado ser colaborador nas análises

histopatológicas e aceitar ser membro da banca, assim como pelas discussões sobre a dissertação, e por me receber para conversas relacionadas ou não à dissertação.

Ao Igor Silva (IOC), pelo incansável apoio e preocupação nas análises histopatológicas.

À Jessica Ferro (IOC), pelo apoio e updates surpresas das análises histopatológicas.

À Dra. PatriciaBozza(IOC) pelaajuda com a endotoxina.

Ao Fernando Cobra (IOC), pela preocupação e apoio para a realização do meu trabalho.

RESUMO

É conhecido que processos inflamatórios podem modular a expressão e atividade de enzimas CYPs. Não é claro, entretanto, o modo pelo qual estímulos inflamatórios regulam a expressão dessas enzimas. Neste trabalho investigamos a hipótese de que as células de Kupffer do fígado exerceriam um papel na modulação dos CYPs hepáticos em resposta à inflamação exacerbada ou sepse. O cloreto de gadolínio, é um inibidor seletivo das células de Kupffer, conhecido por atenuar o quadro de inflamação exacerbada, quando administrado previamente ao estímulo inflamatório, em diferentes modelos animais. Alguns autores sugeriram que as células de Kupffer atuam como intermediários na modulação da atividade de CYPs hepáticos desencadeada por estímulos inflamatórios. Há estudos que sugerem que a diminuição da população das células de Kupffer atenua ou elimina a regulação das CYPs hepáticas por estímulos inflamatórios. Além disso, estudos em culturas de hepatócitos *in vitro*, na ausência de células de Kupffer, tem constatado a regulação negativa da expressão de CYPs hepáticas após estimulação com LPS. Nessa linha, o objetivo deste presente trabalho é investigar o papel das células de Kupffer na regulação da atividade de enzimas hepáticas de biotransformação de xenobióticos (CYPs) após estimulação inflamatória com LPS. Para isso, os níveis séricos de transaminases, e a histopatologia foram empregados para avaliar o efeito do tratamento com diferentes doses de $GdCl_3$ sobre o tecido hepático. No experimento principal para investigar o papel das células de Kupffer, os ratos foram alocados ao acaso em quatro grupos. Foram quantificados marcadores bioquímicos no soro dos animais para evidenciar danos ao tecido hepático causados pelos tratamentos e realizado o exame histopatológico. Em seguida a atividade da CYP1A também foi analisada. Nos animais que receberam $GdCl_3$ + LPS não houve aumento de transaminases e o exame histopatológico não revelou dano ao tecido hepático. Entre os animais que receberam $GdCl_3$ + LPS notou-se acentuado depósito de ferro, diferentemente do observado naqueles tratados apenas com LPS. Como conclusão os resultados indicaram que a imuno-estimulação com LPS causou danos ao tecido hepático (hepatócitos), efeito este inibido pelo tratamento prévio com $GdCl_3$. Como o dano ao hepatócito causado por doses elevadas de LPS é em grande parte mediado pela ativação dos macrófagos residentes, este resultado constitui evidência indireta de que nesse grupo de ratos a população das células de Kupffer foi depletada e/ou teve sua atividade diminuída. O tratamento prévio com $GdCl_3$ não alterou a regulação negativa da CYP1A hepática causada pela administração de LPS aos ratos *Wistar fêmeas*.

Palavras-chave: $GdCl_3$. Células de Kupffer. Citocromo P450. CYP. CYP1A.

ABSTRACT

It is known that inflammatory processes may modulate the expression and activity of CYP enzymes. The mode by which inflammatory stimuli regulate CYP expression and activity, however, remains unclear. Kupffer cells are resident macrophages in the liver and thus play an important role in a systemic inflammatory process or in sepsis. Gadolinium chloride ($GdCl_3$) has been reported to selectively kill an/or inhibit the activity of Kupffer cells. Along this line, it has also been described that Gd decreases exacerbated inflammatory responses when it is administered prior to inflammatory stimuli in various animal models. The role of Kupffer cells in the modulation of CYPs activity triggered by inflammatory stimuli, however, is not entirely clear in the literature. There are studies suggesting that a reduction in the population of Kupffer cells attenuates the down-regulation of hepatic CYPs induced by inflammatory stimuli. However, $GdCl_3$ was also described to decrease liver CYP activity irrespective of whether it depletes or not Kupffer cells. Moreover, *in vitro* studies showed that LPS down-regulates the expression of CYP forms in hepatocyte cell lines in culture (in the absence of Kupffer cells). To investigate whether Kupffer cells play a role in the regulation of the activity of liver xenobiotic biotransformation enzymes (CYPs) by inflammatory stimulation with LPS. The activity of transaminases in the blood serum (a marker for liver injury) was determined and liver histopathology was evaluated in female Wistar rats. In a set of preliminary tests, rats were treated with different doses of $GdCl_3$ or with LPS for selecting doses and euthanasia time in the main experiment. In the main study experimental groups. Treatment associated liver injury was evaluated by levels of transaminases and alkaline phosphatase in the blood serum and by liver histopathology examination. Activity of EROD (a marker for CYP1A activity) was also determined in the liver microsomal fraction. In rats that received LPS + $GdCl_3$ there was no increase in transaminases, and no histological damage was observed in the liver. Rats treated with PLS showed and enhanced iron deposit in the liver whereas no increased iron (Fe) deposit was noted in Gd treated animals. In conclusion the inhibition of hepatotoxic effect due to immune overstimulation with LPS by previously administered $GdCl_3$ is consistent with the interpretation that treatment with Gd depleted Kupffer cells population and/or decreased their phagocytic activity. Since pretreatment with $GdCl_3$ did not alter down-regulation of hepatic CYP1A caused by LPS administration to Wistar female rats these results are also consistent with the notion that down-regulation of liver CYP by LPS do not require the presence of functional Kupffer cells.

Keywords: $GdCl_3$. Kupffer Cell. Cytochrome P45. CYP. CYP1A.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Doses de GdCl ₃ testadas nos experimentos preliminares.....	24
Quadro 2 -	Organização dos diferentes grupos tratados.....	26
Quadro 3 -	Análises bioquímicas realizadas.....	28
Figura 1 -	Níveis de atividade de ALT (UI/L) no soro de camundongos <i>SW</i>	36
Figura 2 -	Níveis de atividade (UI/L) de ALT(A)e AST(B) no soro de camundongos C57BL/6.....	36
Figura 3 -	Níveis de atividade (UI/L) de ALT(A)e AST(B) de ratos Wistar fêmeas.....	37
Figura 4 -	Imagem de corte histológico do fígado de camundongo <i>SW</i> do grupo controle (tratado apenas com salina) corado com hematoxilina e eosina.....	39
Figura 5 -	Imagem de corte histológico do fígado de camundongo C57BL/6 do grupo controle (tratado apenas com salina) corado com hematoxilina e eosina.....	40
Figura 6 -	Imagem de corte histológico do fígado de ratos fêmeas <i>Wistar</i> do grupo controle (tratado apenas com salina) corado com hematoxilina e eosina.....	41
Figura 7 -	Imagem de corte histológico do fígado de ratos fêmeas <i>Wistar</i> do tratado com GdCl ₃ 0,1 mmol/kg.....	42
Figura 8 -	Níveis de atividade (UI/L) de ALT(A) e AST(B) registrados no soro de ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	44
Figura 9 -	Níveis de atividade (UI/L) de ALP no soro de ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	45
Figura 10 -	Imagens de cortes histológicos do fígado de ratos <i>Wistar</i> fêmeas corados por hematoxilina e eosina (microscopia ótica).....	47
Figura 11 -	Fotografia do fígado de rato <i>Wistar</i> fêmeas que recebeu salina + LPS durante a necrópsia.....	49
Figura 12 -	Fotografia do fígado de rato fêmea <i>Wistar</i> que recebeu salina + LPS no momento da necrópsia.....	49
Figura 13 -	Imagem de corte histológico do fígado de rato <i>Wistar</i> fêmea corado com hematoxilina e eosina.....	50
Figura 14 -	Imagem de corte histológico do fígado de rato <i>Wistar</i> fêmea corado	

	com hematoxilina e eosina.....	51
Figura 15 -	Imagem de corte histológico do fígado de rato <i>Wistar fêmea</i> corado com hematoxilina e eosina.....	52
Figura 16 -	Imagens de tecidos hepáticas de ratos <i>Wistar</i> por microscopia de luz pela coloração de <i>Perls</i>	54
Figura 17 -	Atividades da CYP1A (reação de etoxiresorufina-O-desetilase) de ratos fêmeas <i>Wistar</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Swiss Webster</i>	33
Tabela 2 - C57BL/6.....	33
Tabela 3 - Ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	34
Tabela 4 - Alterações clínicas após tratamento com LPS em ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -NADP	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato de sódio
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
ALP	Fosfatase Alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetil sulfóxido
<i>e.g.</i>	<i>Exempli gratia</i>
EROD	Etoxiresorufina- <i>O</i> -desetilase
<i>i.e.</i>	<i>ist est</i>
i.p.	Intraperitonal
i.v	Intravenosa
IL-1	Interleucina1
IL-4	Interleucina4
IL-6	Interleucina6
h	Hora
kg	Kilograma
L	Litro
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
n	Número
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
nm	Nanômetro
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase quantitativa

RPM	Rotações por minuto
SW	<i>Swiss Webster</i>
TLR-4	Receptor do tipo Toll4
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UI	Unidades internacionais

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
<i>g</i>	Unidade de aceleração (9,806 65 m/s ²)
-COOH	Radical ácido carboxílico
-NH ₂	Radical amino
-OH	Radical hidroxilo
-SH	Radical sulfanilo
Fe ³⁺	Íon férrico
GdCl ₃	Cloreto de gadolínio
GdCl ₃ · H ₂ O	Cloreto de gadolínio hexahidratado (III)
KCl	Cloreto de potássio
<i>p</i>	Valor estatístico de "p"

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS.....	15
1.1.1	Regulação dos citocromos P450	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	REGULAÇÃO DOS CITOCROMOS P450 NA INFLAMAÇÃO.....	18
2.2	CÉLULAS DE KUPFFER E CLORETO DE GADOLÍNIO.....	19
2.3	CÉLULAS DE KUPFFER E A REGULAÇÃO DAS CYPS.....	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL.....	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	ANIMAIS.....	23
4.2	ENDOTOXINA E CLORETO E GADOLÍNIO.....	23
4.3	PROCEDIMENTOS.....	23
4.3.1	Experimentos Preliminares	23
4.3.1.1	Tratamento com cloreto de gadolínio.....	23
4.3.1.2	Administração de lipopolissacarídeo (LPS).....	24
4.3.2	Experimento Principal	25
4.3.2.1	Tratamento com cloreto de gadolínio e lipopolissacarídeo.....	25
4.3.3	Eutanásia, coleta de sangue e remoção do fígado	26
4.3.3.1	Experimentos preliminares e experimento final.....	26
4.3.3.2	Experimento preliminar - com cloreto de gadolínio.....	27
4.3.3.3	Experimento principal.....	27
4.3.4	Análises bioquímicas no soro	28
4.3.4.1	Quantificação de transaminases e fosfatase alcalina.....	28
4.3.5	Análises realizadas com o tecido hepático	28
4.3.5.1	Exame histopatológico.....	28
4.3.5.1.1	<i>Coloração por Hematoxilina & Eosina</i>	29
4.3.5.1.2	<i>Coloração de Perls</i>	29
4.3.5.2	Análises dos microssomas hepáticos.....	30

4.3.5.2.1	<i>Preparação das frações subcelulares</i>	30
4.3.5.2.2	<i>Determinação de proteínas das frações subcelulares</i>	31
4.3.5.2.3	<i>Atividade enzimática</i>	31
4.3.6	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	33
5.1	EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....	33
5.1.1	Tratamento com cloreto de gadolínio	33
5.1.1.1	Dados clínicos observados.....	33
5.1.1.2	Análises no soro.....	35
5.1.1.3	Análises no fígado.....	37
5.1.2	Tratamento com lipopolissacarídeo	43
5.1.2.1	Dados clínicos observados.....	43
5.2	EXPERIMENTO PRINCIPAL.....	43
5.2.1	Tratamento com cloreto de gadolínio e lipopolissacarídeo	43
5.2.1.1	Dados clínicos observados.....	43
5.2.1.2	Análises no soro.....	44
5.2.1.3	Análises no fígado.....	45
5.2.1.3.1	<i>Histopatologia</i>	45
5.2.1.3.2	<i>Armazenamento de ferro (Fe^{3+})</i>	53
5.2.1.3.3	<i>Atividade da CYP1A</i>	55
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÕES	62
8	PERSPECTIVAS	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

O corpo humano é continuamente exposto a xenobióticos (substâncias estranhas ao organismo), seja por contato intencional ou em virtude da presença destes no meio-ambiente. Os xenobióticos podem ter efeitos benéficos, tóxicos, ou serem simplesmente inócuos dependendo de vários fatores entre os quais a dose a que o indivíduo foi exposto. Para enfrentar essa ameaça química e favorecer a manutenção da homeostasia, os seres vivos desenvolveram ao longo da evolução sistemas enzimáticos que catalisam a transformação de xenobióticos, particularmente aqueles mais lipofílicos, em compostos hidrofílicos o que facilita a eliminação pelos rins e através da bile. A biotransformação de xenobióticos envolve uma seqüência de reações enzimáticas em que há adição de grupos funcionais a molécula (ou exposição de grupos já existentes) o que possibilita as reações de conjugação (*e.g.* conjugação de substratos endógenos). Por serem mais hidrofílicos, os produtos finais (conjugados) são excretados com facilidade em meios aquosos como a urina e bile (Meyer, 1996). Na realidade as enzimas de biotransformação de xenobióticos catalisam não só a metabolização desses compostos estranhos ao organismo mas também a de substratos endógenos ou endobióticos (*e.g.*, hormônios) (Yoko, 2003).

O metabolismo de xenobióticos pode ser esquematicamente dividido em reações de fase 1 e fase 2. Se a reação enzimática catalisa a adição/exposição de grupo funcional é denominada reação de fase 1, enquanto as reações de conjugação deste grupo funcional a um substrato endógeno são conhecidas como reações de fase 2. As reações de fase 1 envolvem a oxidação, redução ou hidrólise de substratos, podendo adicionar ou simplesmente expor um grupo funcional (-OH, -NH₂, -SH, -COOH) pré-existente na molécula. As reações de fase 2, via de regra, envolvem a conjugação dos metabólitos produzidos na fase 1 a substratos endógenos (*i.e.*, reações de acetilação, sulfatação, glicuronidação, conjugação com a glutatona ou com aminoácidos como a glicina). Entretanto, se a molécula não transformada do xenobiótico já exibir grupos funcionais (*e.g.*, fenol) a reação de conjugação (fase 2) pode ocorrer sem ser precedida por reações de fase 1. Há também casos excepcionais em que reações de fase 1 ocorrem após a conjugação da fase 2 (*e.g.*, hidroxilação de esteróides sulfatos).

Como as reações de fase 1 e 2 do metabolismo de xenobióticos transformam moléculas lipofílicas em produtos mais hidrofílicos, elas são essenciais para a eliminação de substâncias com alta afinidade por lipídeos que, não transformadas, tenderiam a permanecer no organismo. A biotransformação acoplada ao sistema de proteínas de transporte

transmembrana desempenha papel chave na desintoxicação do organismo, e na proteção contra a ameaça representada pelo grande número de compostos químicos potencialmente nocivos a que o indivíduo é exposto (Meyer, 1996).

As enzimas de biotransformação são expressas em praticamente todas as células sendo, entretanto, a expressão e a atividade mais significativa em alguns tecidos, particularmente aqueles situados estrategicamente nas portas de entrada no organismo, tais como a pele, o pulmão e o trato respiratório, o esôfago, o fígado, o intestino delgado, os rins, e também no tecido nervoso. Entre todos os órgãos e tecidos, o fígado é aquele com maior abundância e atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos (Watkins, 1992). As enzimas citocromo P450 (CYP), componente importantíssimo do sistema enzimático de oxidação, destacam-se pela versatilidade catalítica, abundância e funções entre as enzimas de fase 1 presentes no fígado e outros órgãos. O sistema citocromo P450 de oxidação, está localizado na membrana do retículo endoplasmático e envolve duas enzimas uma isoforma CYP e uma redutase (NADPH-Citocromo P450 redutase), participando esta última da transferência de um ou dois elétrons para a CYP (Parkinson, 2001). As CYPs, também chamadas de oxidases de função mista, são heme-proteínas, cujo grupamento prostético heme apresenta um núcleo pirrólico com um átomo de ferro. A denominação Citocromo 450 foi sugerida pelos pesquisadores japoneses Omura & Sato em 1964, porque o complexo dessas proteínas com monóxido de carbono exibia um pico de absorção espectrofotométrica no comprimento de onda de 447nm e 452 nm. Todas as demais heme-proteínas que se ligam ao monóxido de carbono apresentam espectro de absorção com máximo a aproximadamente 420 nm (Parkinson, 2001).

Em 1991, Nebert *et. al*, propuseram a nomenclatura atualmente adotada para as CYPs. As enzimas que apresentam mais de 40% de similaridade são agrupadas em uma mesma família, que é indicada por um algarismo arábico (*e.g.*, CYP1, CYP2), enquanto as que possuem mais de 55% de similaridade em suas sequências são agrupadas em uma mesma subfamília, que é representada por uma letra após o número arábico indicativo da família (*e.g.*, CYP1A, CYP1B, CYP2A). Cada membro individual da subfamília (isoenzima) é indicado por outro número arábico que vem em seguida à letra que indica a subfamília (*e.g.*, CYP2A1, CYP2A2). A referência ao gene que codifica a proteína em questão, é feita com a grafia em itálico (*e.g.*, *CYP2A5*).

1.1.1 Regulação dos citocromos P450

No caso de medicamentos e contaminantes ambientais, as reações de biotransformação participam não apenas da eliminação (e desintoxicação), mas podem frequentemente tornar a molécula não transformada inativa em metabólito ativo em termos farmacológicos ou toxicológicos. Quando um fármaco só é ativo farmacologicamente após ser metabolizado no organismo, a molécula não-transformada originalmente administrada é considerado um pró-fármaco que é ativado, ou seja biotransformado em um produto ativo (metabólito ativo) por meio de uma reação de fase 1. Nesses casos, diz-se que a substância administrada é um pró-fármaco que é transformado em fármaco, no organismo em decorrência de reação catalisada por CYPs ou por outras enzimas de fase 1. A expressão - e a atividade - de determinada isoforma CYP pode variar entre os indivíduos de uma mesma população e, em um mesmo indivíduo, pode variar ao longo da vida. A variação inter-individual de atividade (fenótipo) em uma dada população pode ser explicada por diferenças genótípicas (polimorfismo genético de CYPs). As diferenças entre indivíduos com um mesmo genótipo, por outro lado, podem refletir diferenças de expressão/atividade causadas por regulação positiva ou negativa da expressão do gene ou da atividade da proteína expressa, em decorrência de exposição prévia ou concomitante a agentes químicos (*e.g.*, indutores e inibidores), ou da modulação da expressão por condições fisiológicas ou patológicas (*e.g.* estimulação do sistema imunológico) (Morgan, 2001). Medicamentos, poluentes ou contaminantes ambientais (*e.g.*, bifenilaspolicloradas, éteres difenílicos polibromados e outros), dieta, sexo, idade e hormônios são alguns dos fatores que podem influenciar a expressão e atividade de CYPs. Entre as condições patológicas que podem modular a expressão e atividade de CYPs, destacam-se as infecções por diferentes agentes (vírus, bactérias, fungos, parasitas) e estímulos inflamatórios. As doenças e a inflamação podem alterar a atividade e o nível de expressão de diversas isoformas CYPs no fígado e em tecidos extra-hepáticos, como rim e o cérebro, no homem e em animais (Morgan, 1997). Em geral, a estimulação do sistema imunológico resulta em depressão das CYPs (regulação negativa) mas, em alguns casos, as isoformas não são afetadas, e em outros podem ser induzidas (regulação positiva) pela estimulação. A depressão das CYPs pode resultar em eliminação mais lenta, dosagem excessiva e aumento de toxicidade de alguns fármacos (Morgan, 1997).

2REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.REGULAÇÃO DOS CITOCROMOS P450 NA INFLAMAÇÃO

Como anteriormente mencionado, é conhecido que processos inflamatórios podem

modular a expressão e atividade de enzimas CYPs. Não é claro, entretanto, o modo pelo qual estímulos inflamatórios regulam a expressão dessas enzimas. Vários estudos experimentais e clínicos investigaram o modo pelo qual citocinas pró-inflamatórias regulam a expressão e atividade de enzimas de biotransformação de xenobióticos ao nível dos hepatócitos (Sasaki *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1987; Gharavi & El-Kadi, 2007). Por ser modelo experimental mais simples, comparado aos processos infecciosos, a administração do lipopolissacarídeo da parede celular de *Escherichia coli* (LPS) tem sido, desde a década de 1980, o estímulo inflamatório mais empregado para investigar os mecanismos envolvidos na regulação das enzimas metabolizadoras de xenobióticos por infecções e pela inflamação (Renton e Mannering, 1976; Sasaki *et al.*, 1984).

Há pelo menos duas décadas, vários estudos (Sewer *et al.*, 1996, 1997; Renton e Nicholson, 2000; Chen *et al.*, 2003; Kugawa *et al.*, 2014; De-Oliveira *et al.*, 2015) tem investigado como o LPS regula a expressão e atividade das CYPs. Como observado por Stanley *et al.* (1988), a injeção de LPS pode resultar tanto na supressão como na indução de isoformas CYPs, dependendo da CYP investigada e da dose de LPS administrada.

Com o advento das modernas técnicas de qPCR, é possível não apenas quantificar a atividade dessas enzimas, como também medir os níveis dos respectivos mRNAs no tecido, *i.e.*, verificar se há alteração de sua expressão ao nível transcripcional ou de estabilização dos mRNAs. Moryia *et al.* (2014) observaram diferentes padrões de expressão hepática das CYPs (*i.e.*, CYP1A2, CYP2B10, CYP2C29, CYP3A11), após a estimulação com LPS e anafilaxia induzida por ovoalbumina (OVA) em camundongos. Recentemente, De-Oliveira *et al.* (2015) verificaram que o LPS, em doses baixas (0.025-2.0 mg/kg) regulava negativamente a atividade de CYP2A5, efeito esse que não aparecia após doses mais elevadas de LPS (>2 mg/kg), que aumentavam de forma acentuada os níveis de citocinas e óxido nítrico no soro. De-Oliveira *et al.* (2015) também constataram que, embora não alterassem a atividade de CYP2A5, as doses mais elevadas de LPS (>2 mg/kg) deprimiam (*i.e.*, regulavam negativamente) as atividades de outras CYPs (*e.g.*, CYP1A e CYP2B) no fígado de camundongos.

2.2 CÉLULAS DE KUPFFER E CLORETO DE GADOLÍNIO

As células de Kupffer são macrófagos residentes do fígado, e podem constituir de 80 a 90% dos macrófagos teciduais do sistema de fagócitos mononucleares residentes no corpo humano (Kolios *et al.*, 2006).

O gadolínio (Gd) é um lantanídeo de terras raras, e complexos de Gd com ligantes

polissacarídeos são utilizados na clínica médica como agentes de contrastes para tecidos específicos (*e.g.*, cérebro, fígado, estrutura vascular) empregados para obtenção de imagens de ressonância magnética nuclear (Graeppi,1995). Os sais de lantanídeos em sua maioria são hidrolisados, formando hidróxidos que acumulam no corpo, especialmente no baço, fígado e ossos. As vias mais conhecidas de excreção dos íons lantanídeos são a urina e as fezes (Thunus, 1999). O Gd, na forma de cloreto de gadolínio ($GdCl_3$), é conhecido como um inibidor seletivo da função fagocítica das células de Kupffer, podendo contribuir para a morte dessas células (Hardonket *al.*, 1992; Rai, 1996; Palasz, 2000). O mecanismo da ação tóxica do $GdCl_3$ para as células de Kupffer provavelmente envolve o bloqueio dos canais de cálcio do tipo K e competição com o cálcio da membrana, o que comprometeria a capacidade fagocítica e, posteriormente, acarretaria a morte das células. Os efeitos fisiológicos dos sais solúveis dos lantanídeos aparentemente estão relacionados à importância do cálcio no controle dos processos metabólicos (Yang *et al.*, 1989; Palasz&Czekaj, 2000; Thinneset *al.*, 2001).

Após injetar o cloreto de gadolínio (7,5 mg/kg) por via intravenosa (veia lateral da cauda) em ratos *Wistar*, Hardonket *al.*(1992) observaram que ocorria drástica redução da população das células de Kupffer ativas, começando cerca de 12 hs após a injeção. A população de macrófagos residentes no fígado permaneceu reduzida até o 3º dia, iniciando-se o repovoamento do tecido hepático no 4º dia após a injeção. Os autores também notaram uma resistência ao efeito citotóxico de doses adicionais de $GdCl_3$ enquanto o processo de repovoamento ainda estava em curso.

Estas características do efeito citotóxico seletivo do $GdCl_3$ nos macrófagos residentes do fígado possibilitam o seu uso como ferramenta para depletar células de Kupffer em estudos que investigam o papel desses macrófagos residentes em doenças que acometem o órgão. O bloqueio da função fagocítica e/ou destruição das células de Kupffer compromete outras funções desses macrófagos, como a secreção de mediadores (*e.g.*, citocinas, óxido nítrico) que são capazes de definir o fenótipo das demais células de Kupffer e de outras células a sua volta (Yorgani, 2004). A injeção de $GdCl_3$ pode, portanto, influenciar a imunomodulação no ambiente hepático (Hardonket *al.*, 1992).

2.3 CÉLULAS DE KUPFFER E A REGULAÇÃO DAS CYPS

O papel das células de Kupffer na modulação da expressão e atividade de CYPs desencadeada por estímulos inflamatórios, ou pela indução de septicemia, foi investigado por vários autores (Peterson & Renton, 1986; De-Xianget. *al.*, 2004; Lee *et. al.*, 2011; Maruyama *et. al.*,

2015). Alguns estudos mostraram que a regulação negativa das CYPs que ocorre durante a inflamação é atenuada ou desaparece quando é precedida pela administração de substâncias conhecidas por reduzirem drasticamente a população de células de Kupffer (*e.g.*, cloreto de gadolínio e clodronatolipossomal - Bilzeret *al.*, 2006). Os resultados desses estudos envolvendo a depleção de macrófagos residentes sugerem que a modulação das CYPs expressas no hepatócito pela inflamação é mediada pelas células de Kupffer. Badgeret *al.* (1997), propuseram que as células de Kupffer poderiam exercer um papel duplo na regulação dos citocromos P450. Elas modulariam o fenótipo das demais células de Kupffer presentes, capacitando-as a aumentar a produção de mediadores inflamatórios (*e.g.* TNF- α , IL-1, IL-6) que regulariam negativamente a atividade de CYPs, e/ou diminuiriam a produção de citocinas (*e.g.* IL-4) que manteria a atividade das CYPs. Uma terceira hipótese sugere que o Gd³⁺ poderia estar agindo diretamente sobre o hepatócito.

Roseet *al.* (2001), especularam que GdCl₃ estimularia células de Kupffer que sobreviveram a exposição ao GdCl₃ a produzir mais TNF- α . Nesse sentido, Kinoshitaet *al.* (2004), notaram que as células de Kupffer, após a injeção de GdCl₃, foram moduladas fenotipicamente a secretar mais TNF- α , promovendo assim a recuperação do fígado em um camundongo parcialmente hepatectomizado (em comparação ao controle hepatectomizado que não foi tratado com GdCl₃).

Entretanto, essa interpretação de que a célula de Kupffer é intermediário necessário para a depressão de CYPs hepáticos após tratamento com LPS não é consistente com resultados de testes *in vitro*. Experimentos conduzidos no nosso laboratório, por exemplo, constataram que o LPS regula negativamente a expressão de várias isoformas CYPs em culturas de hepatócitos humanos (*e.g.*, HepG2), cultivados sem a presença de células de Kupffer.

Em virtude desses dados e interpretações divergentes, e das diferentes hipóteses sobre o modo pelo qual as células de Kupffer poderiam modular a atividade e expressão dos citocromos P450 nos hepatócitos após a ativação do sistema imunológico, decidimos investigar neste trabalho o papel dos macrófagos residentes na regulação das CYPs hepáticas após estimulação inflamatória (LPS).

Experimentos preliminares foram conduzidos para a escolha do animal (camundongo ou rato) mais adequado, das doses de GdCl₃ e LPS, e do tempo entre as injeções e a eutanásia. Procuramos identificar as doses de cloreto de gadolínio que fossem tóxicas para as células de Kupffer sem causar dano expressivo aos hepatócitos. Para escolher essas doses, medimos a

atividade de enzimas cujo aumento no soro indica possíveis danos aos hepatócitos, como as transaminases: alanina aminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST). Além disso, examinamos as alterações histopatológicas do tecido hepático após o tratamento com cloreto de gadolínio. Procuramos também identificar o intervalo de tempo após a injeção de LPS em que as manifestações do quadro inflamatório eram mais expressivas.

No experimento principal, os ratos previamente tratados com cloreto de gadolínio receberam 36 h depois, uma injeção de LPS, sendo a atividade das transaminases (ALT, AST) e da fosfatase alcalina (ALP) determinadas no soro sanguíneo no tempo de 48 h. Cortes de tecido hepático corados com hematoxilina/eosina foram submetidos a exame histopatológico, sendo feita também a marcação dos cortes para Fe^{3+} , na tentativa de evidenciar o efeito do tratamento com cloreto de gadolínio sobre as células de Kupffer. Por fim, avaliamos também o efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade da CYP1A (EROD) na fração microsomal hepática.

3OBJETIVOS

3.1OBJETIVO GERAL

Investigar o papel das células de Kupffer na regulação da atividade de enzimas hepáticas de biotransformação de xenobióticos (Citocromos P450) após estimulação inflamatória com LPS.

3.2OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Experimentos preliminares:

- Selecionar a espécie e a linhagem de roedor (camundongos SW, C57BL/6 ou ratos fêmeas *Wistar*) mais conveniente para o experimento principal.
- Identificar a dose de cloreto de gadolínio que não causa danos expressivos ao hepatócito, mas que seja capaz de diminuir o quadro inflamatório através da depleção e/ou bloqueio da atividade das células de Kupffer.
- Identificar o intervalo de tempo entre a injeção de LPS e as manifestações mais evidentes do quadro inflamatório.

➤ Experimento Principal:

- Verificar se o tratamento prévio com cloreto de gadolínio altera a modulação da atividade de CYP1A(EROD) por estímulos inflamatórios (LPS) no fígado de ratos.
- Verificar se o tratamento prévio com cloreto de gadolínio interfere com os efeitos do LPS sobre indicadores bioquímicos de dano hepático (ALT, AST eALP) no soro sanguíneo.
- Investigar se o tratamento com cloreto de gadolínio e LPS (isolado e sequencialmente) causa danos ao tecido hepático evidenciáveis por exame histopatológico (hematoxilina e eosina).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Suíços (*Swiss Webster*) e C57BL/6, fêmeas com 8 a 11 semanas de idade, e ratos (*Wistar*) fêmeas com 70 a 90 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Após serem recebidos no laboratório, os camundongos e os ratos foram mantidos em gaiolas de plástico de tamanho padrão para cada espécie. Em ambos os casos, as gaiolas tinham tampa de aço inoxidável e o fundo coberto por maravalha de pinho branco. Os animais foram alojados em grupos de no máximo 5 por gaiola, sendo mantidos no biotério de experimentação com temperatura (19 à 21°C), fotoperíodo (ciclos claro/escuro de doze hs, claro: 7-19 hs) e renovação de ar controlados. Água de torneira filtrada e ração comercial para ratos e camundongos (Nuvilab®) foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais foram fornecidos pelo CECAL após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Instituição. Foram seguidas as diretrizes internacionais de segurança para uso de animais de laboratório.

4.2 ENDOTOXINA E CLORETO DE GADOLÍNIO

O estímulo inflamatório utilizado (endotoxina) foi o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (*E.coli*), com o sorotipo 0127:B8. Utilizamos o cloreto de gadolínio(III) hexahidratado ($GdCl_3 \cdot 6H_2O$) com 99% de pureza. O LPS e o cloreto de gadolínio foram adquiridos da *Sigma Chemical Co. St Louis*, EUA.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Experimentos Preliminares

4.3.1.1 Tratamento com cloreto de gadolínio

O $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ foi injetado por via intravenosa, pela veia lateral da cauda, de acordo com o quadro mostrado a seguir.

Quadro 1 - Doses de GdCl₃ testadas nos experimentos preliminares.

Dose de GdCl ₃	Camundongos fêmeas		Ratos fêmeas
	Suíços (<i>SW</i>)	C57BL/6	<i>Wistar</i>
0,10 mmol/kg	X (n=6)	X (n=6)	X (n=5)
0,20 mmol/kg	X (n=6)	X (n=6)	X (n=5)
0,25 mmol/kg	X (n=5)		
0,30 mmol/kg	X (n=3)	X (n=1)	X (n=5)
0,35 mmol/kg			X (n=3)

Fonte: A autora.

O GdCl₃ · 6H₂O foi diluído em solução salina estéril no momento do uso. Para facilitar a aplicação intravenosa, foram utilizadas caixas de contenção adequadas ao tamanho do animal. A cauda do animal foi esfregada gentilmente com um algodão embebido de água morna para promover vasodilatação facilitando a venopunção. Todos os animais foram eutanasiados 48h após a injeção de GdCl₃. Após o tratamento e durante os dias subsequentes, os animais foram examinados, sendo registrados os sinais clínicos de toxicidade e alterações comportamentais. Para fins de comparação, animais controles (grupo controle) receberam apenas salina estéril, sendo avaliados da mesma forma que os do grupo experimental, e igualmente eutanasiados 48h após a injeção de salina.

4.3.1.2 Administração de lipopolissacarídeo (LPS)

Foi preparada uma solução estoque de 50mg/mL de LPS em salina (NaCl 0,9%) estéril. A solução foi mantida em banho de ultra-som (lavadora ultrasônica modelo USC 1400 - *Unique*®) por trinta min, aliqotada em tubos tipo *eppendorf*, e congelada a -20°C. No momento de uso, a solução estoque foi descongelada e novamente submetida ao banho de ultra-som por trinta min antes da diluição em salina estéril para obter as doses injetadas nos animais.

Os ratos *Wistar* fêmeas foram tratados por via intraperitoneal com a dose de 10 mg/kg do LPS. Grupos de ratos foram eutanasiados em diferentes intervalos pós-tratamento, *i.e.*, 6h (n=5), 12h (n=5) e 24h (n=5) após a injeção de LPS (tempo da eutanásia). Um grupo controle de ratos (eutanasiadas 6h (n=5) após o tratamento) recebeu apenas a injeção de solução salina estéril.

Os animais foram observados após o tratamento e durante o período de tempo subsequente até a eutanásia, sendo registradas as alterações clínicas e comportamentais observadas.

4.3.2 Experimento Principal

4.3.2.1 Tratamento com cloreto de gadolínio e lipopolissacarídeo

A solução de $GdCl_3$ ou salina foi administrada por injeção intravenosa (dose: 0,1mmol/kg), pela veia lateral da cauda, no tempo zero. O $GdCl_3$ foi diluído em solução salina estéril no momento do uso. Para facilitar a sua aplicação, a cauda do rato (fêmea) foi esfregada com um algodão embebido de água morna para promover vasodilatação e facilitar a venopunção.

O LPS (10mg/kg) ou salina estéril foi administrado por via intraperitoneal 36h após a injeção de $GdCl_3$ ou salina (grupo controle).

Quatro grupos diferentes de ratos fêmeas foram tratados como se segue:

Grupo 1 (n=3): recebeu apenas salina estéril no tempo zero por via intravenosa e também 36h depois por via intraperitoneal;

Grupo 2 (n=3): recebeu $GdCl_3$ no tempo zero por via intravenosa e 36 hs depois salina estéril por via intraperitoneal;

Grupo 3 (n=3): recebeu salina estéril no tempo zero por via intravenosa e LPS 36h depois por via intraperitoneal;

Grupo 4 (n=3): recebeu $GdCl_3$ por via intravenosa no tempo zero e LPS 36h depois por via intraperitoneal;

Os animais de todos os grupos foram eutanasiados 48h após o tratamento do tempo zero (como mostrado nos quadros a seguir). O experimento foi replicado três vezes respeitando-se o mesmo horário de administração (totalizando 9 animais por grupo).

Quadro 2: Organização dos diferentes grupos de tratados.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Salina (tempo zero)	GdCl ₃ · 6H ₂ O (tempo zero)	Salina (tempo zero)	GdCl ₃ · 6H ₂ O (tempo zero)
+	+	+	+
Salina (36h)	Salina (36h)	LPS (36h)	LPS (36h)
Eutanásia (48 h)	Eutanásia (48 h)	Eutanásia (48 h)	Eutanásia (48h)

Fonte: A autora.

4.3.3 Eutanásia, coleta de sangue e remoção do fígado

4.3.3.1 Experimentos preliminares e experimento principal

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical sendo em seguida realizada a punção cardíaca. No caso dos ratos, antes da realização da punção cardíaca o animal foi colocado em uma câmara contendo CO₂ até a perda dos reflexos e observar-se o estado de anestesia. Logo após a retirada do sangue foi efetuado o deslocamento cervical com ajuda de uma pinça enquanto a animal ainda estava sob efeito da narcose induzida pelo CO₂. O sangue de cada animal foi coletado em tubo tipo *ependorf* e mantido a temperatura ambiente por 30 min para formação do coágulo e, posteriormente, mantido sob refrigeração (4° à 8°C) até a centrifugação. Para a separação do soro, o sangue coagulado foi centrifugado a 8.000 RPM durante 3min em centrífuga *Minispin*® (*Eppendorf*). O soro obtido foi aliquotado em tubos tipo *ependorf* sendo novamente centrifugado e transferido para tubos de criogenia *Nunc*®. Em seguida os soros foram guardados em nitrogênio líquido até o momento de uso.

4.3.3.2 Experimento preliminar - cloreto de gadolínio

Após a eutanásia e coleta do sangue, foi realizada a laparotomia. Os fígados foram

removidos rapidamente e imersos em solução de *Millonig* modificada (Carson *et. al.*, 1973) em potes individuais de vidro para cada animal, com volume de fixador correspondente a 20x o volume do órgão. Posteriormente, 24h após a fixação em *Millonig* modificado, os órgãos foram clivados em seções de aproximadamente 0,5 cm de espessura, colocados em cassetes devidamente identificados e imersos em uma nova solução de *Millonig* modificado.

4.3.3.3 Experimento principal

Após a eutanásia e coleta do sangue por punção cardíaca, foi feita a laparotomia. Os fígados foram rapidamente removidos e postos em placa de Petri de vidro resfriadas, mantidas sobre gelo em escamas e contidas em caixa de isopor. Em seguida, o fígado foi pesado, sendo separada uma parte correspondente a 50% do órgão que foi acondicionado em papel alumínio (com a identificação do animal) e imediatamente imersa em nitrogênio líquido. Esta secção do órgão foi armazenada em nitrogênio líquido e descongelada apenas para preparação da fração microsomal.

A outra metade do órgão, mantida ainda em placa de Petri resfriada, foi subdividida em fragmentos que foram posteriormente usados para as análises histopatológicas. Os fragmentos de tecido hepático foram imersos em solução de *Millonig* modificada contida em potes de coleta de material biológico, individualizados para cada animal. O volume do fixador correspondeu a 20x o volume dos fragmentos do órgão. A solução de *Millonig* foi renovada 24 hs depois.

Fragmentos do fígado foram armazenados também em solução de OCT (composto para envolver o tecido para cortes congelados) em embalagem de blister, envolta em papel alumínio. Em seguida, as embalagens foram prontamente imersas em nitrogênio líquido ainda durante a eutanásia. Ao final da eutanásia esses fragmentos foram armazenados à -20°C.

Alguns fragmentos hepáticos destinados a análises posteriores de níveis de mRNA foram imersos em solução de *RNAlater*® em tubos tipo *ependorf*. Os tubos foram armazenados durante a noite (*overnight*) em geladeira e no dia seguinte em congelador à -20°C. Pretende-se futuramente utilizá-los para análise de expressão de mRNA hepático.

4.3.4 Análises bioquímicas no soro

O quadro abaixo indica em que animais foram determinados os níveis sanguíneos (soro) de enzimas indicadoras de dano hepático.

Quadro 3 - Análises bioquímicas realizadas.

Tipo de análise	Swiss	C57BL/6	Ratas Wistar
ALT	X	X	X
AST		X	X
ALP*			X

Fonte: A autora.

* Apenas no experimento principal.

4.3.4.1 Quantificação de transaminases e da fosfatase alcalina

Determinação dos níveis de atividade da alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP), foi realizada através da atividade das enzimas no soro de camundongos e ratos utilizando kits comerciais (*Bioclin*®) para a ALT e AST (segundo o método descrito por Reitman e Frankel (1957)) e para a ALP, de acordo como método de Roy modificado. As determinações foram feitas seguindo as instruções do fabricante, exceto pelo fato de que o ensaio foi adaptado para utilização de microplacas (noventa e seis poços).

A leitura de absorbância foi feita a 505nm para a ALT e AST, e 578nm para ALP com o uso de espectrofotômetro para microplacas modelo *Spectramax Plus* (*Molecular Devices*®), empregando o *software SoftmaxPro* versão 4.0 para *Macintosh*® e *Windows*®. As atividades de ALT, AST e ALP foram expressas como unidades internacionais/L (UI/L).

4.3.5 Análises realizadas com o tecido hepático

4.3.5.1 Exame histopatológico

Os fígados dos animais usados nos experimentos preliminares (com diferentes doses de $GdCl_3$) e no experimento principal ($GdCl_3 + LPS$) foram submetidos ao exame histopatológico.

O processamento do tecido e a avaliação histopatológica com coloração por hematoxilina e eosina e coloração de *Perls* (esta última feita apenas no experimento principal) foram realizados no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz da FIOCRUZ sob a supervisão do Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado.

Após a fixação, os cassetes foram lavados por cerca de 1 h em água corrente e

processados. O processamento automático foi realizado no processador de tecido do tipo transferência de fluidos, modelo *Excelsior ES (ThermoScientific)*. Álcool etílico em concentrações crescentes (50%, 70%, 95% e absoluto) foi usado para desidratação, xilol para clarificação, e cera de parafina para infiltração. Concluído o processamento, os cassetes foram transferidos para a central de inclusão modelo *Histocentre2 (Shandon)* onde foram preparados os blocos de parafina, que - após resfriamento - foram retirados das formas. Posteriormente, foi realizada a microtomia dos blocos (*Leica RM2125 RT, LeicaBiosystemsNusslochGmbH*) e a preparação das lâminas.

4.3.5.1.1 *Coloração por Hematoxilina e Eosina*

A coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) foi realizada para análise da morfologia do tecido hepático. As lâminas foram desparafinizadas com auxílio de xilol (três banhos de 3 min cada) e gradualmente hidratadas com álcool etílico em concentrações decrescentes (100%, 90%, 70% - 3 min cada) até a água destilada. Em seguida, as lâminas foram imersas em hematoxilina de *Mayer* por 20 min e lavadas em água corrente por 25 min. Em seguida, foi iniciada a desidratação em álcool a 70% por 3 min, e, logo depois, as lâminas foram imersas em eosina-floxina por 2 min. As lâminas foram lavadas em álcool etílico em concentrações crescentes e em xilol, para desidratar e clarificar novamente, e em seguida foram montadas.

As lâminas foram analisadas com auxílio de Microscópio *Axiomager A2 (Zeiss)* e as imagens foram captadas utilizando a câmera *AxiocamHRm (Zeiss)* e o software *Axionvision Release 4.8.2 (Zeiss)*.

4.3.5.1.2 *Coloração de Perls*

Esta método e análise foram realizados apenas com tecido hepático dos animais usados no experimento principal. A coloração de Perls é utilizada para a identificação de ferro intracelular, sendo este na forma de ferritina ou hemossiderina.

Para efetuar a coloração de *Perls*, as lâminas foram desparafinizadas com auxílio de xilol e gradualmente hidratadas com álcool etílico em concentrações decrescentes até a água destilada. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de trabalho recentemente preparada de ferrocianeto de potássio-ácido clorídrico, sendo mantidas à temperatura ambiente por 30 min. Foram então enxaguadas em água destilada, e em seguida foram contra coradas com a solução de *Nuclear Fastred* por 5 min. As lâminas foram então lavadas completamente em água corrente de torneira por 2 min, para depois serem desidratadas e

clarificadas com uso de etanol a 95%, etanol absoluto e xileno, com duas trocas de dois min cada. Em seguida as lâminas foram montadas.

As lâminas foram analisadas com o auxílio de Microscópio *Axiomager A2* (Zeiss) e as imagens foram captadas utilizando a câmera *AxiocamHRm* (Zeiss) e o software *Axionvision Release 4.8.2* (Zeiss).

4.3.5.2 Preparação e análises de atividade enzimática em fração microssomal hepática.

4.3.5.2.1 Preparação da fração microssomal.

A fração microssomal hepática foi preparada como descrito em detalhes por De-Oliveira *et al.*(1997). Os fígados foram retirados do nitrogênio líquido e descongelados em banho de gelo. Em seguida, os órgãos foram pesados, lavados com uma solução de sacarose 250 mM, secos com papel de filtro e levados a um homogeneizador do tipo *Potter-Elvehjem* com capacidade para 30 mL. O tecido foi homogeneizado em solução tampão Tris 100 mM com KCl 150 mM pH 7,4, em volume correspondente a quatro vezes o peso do órgão, a uma velocidade de 1.200 rpm. Após a completa homogeneização do órgão, o homogeneizado foi filtrado em gaze, transferido para tubos de centrifuga e foi centrifugado em ultracentrífuga *Sorvall WX ULTRA SERIES®* a 9.000 X g por 30min a 4 °C. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 X g por uma h a 4 °C em ultracentrífuga *Sorvall WX ULTRA SERIES®*.

Após a ultracentrifugação, o sedimento obtido foi suspenso em solução tampão fosfato de potássio dibásico 100mM com 20% de glicerol e EDTA 1mM pH 7,4. Em seguida, para a completa re-suspensão do sedimento, este foi homogeneizado com homogeneizador de vidro do tipo *Potter-Elvehjem*, mas agora com capacidade de 15mL, ea velocidade de 600RPM. Em seguida, as amostras foram alíquotadas, transferidas para tubos para criogenia e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

4.3.5.2.2 Determinação da concentração de proteína na fração microssomal

A quantificação do teor total de proteínas das frações microssomais foi realizada segundo o método descrito por *Bradford* (1976). Albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão e a solução tampão usada foi a de fosfato de potássio monobásico 50 mM e NaCl 150 mM pH 7,2. O método foi adaptado para leitora de microplacas (em espectrofotômetro), seguindo as informações do fabricante do corante azul de Coomassie usado no ensaio (Reagente de *Bradford*, *Sigma Chemical Co*, *St Louis*, *EUA*).

A leitura de absorvância foi realizada a 595 nm no espectrofotômetro para microplaca modelo *Spectramax Plus (Molecular Devices®)*, usando o *software SoftmaxPro* versão 4.0 para *Macintosh®* e *Windows®*.

4.3.5.2.3 Atividade enzimática

➤ Etoxiresorufina-O-desetilase: EROD (CYP1A)

Preparação do substrato:

A etoxiresorufina foi pesada (2 mg) em balança de quatro casas decimais. As soluções estoque do substrato foram feitas em capela química. Foram adicionados 2mL de clorofórmio ao recipiente contendo o substrato. A solução foi distribuída em frascos de vidro com capacidade para 1mL (os frascos foram recobertos individualmente com folha de papel laminado para mantê-los ao abrigo da luz), de modo a obter em cada frasco 60,35µg de etoxiresorufina. Após o clorofórmio evaporar, os tubos foram fechados e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

No momento de uso, foram adicionados ao frasco contendo o substrato, 250 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) para obter uma solução 1mM. A solução foi agitada em vortex para que obtivéssemos uma solução completamente homogênea.

A atividade da etoxiresorufina-O-desetilase (EROD) foi determinada na fração microsomal hepática dos ratos, essencialmente como descrito por Burke (1985), exceto pelo emprego de sistema regenerador de NADPH.

A solução tampão para o ensaio foi K_2HPO_4 100mM pH 7,8 e o sistema regenerador de NADPH usado para desencadear a reação foi constituído de β-NADP, glicose-6-fosfato, glicose-6-fosfato desidrogenase e cloreto de magnésio, com as seguintes concentrações finais: 0,25 mM, 5 mM, 1U/10 uL e 2,5 mM respectivamente.

O ensaio foi realizado à 37°C com auxílio de banho-maria acoplado a câmara do espectrofluorímetro contendo a cubeta. O acúmulo de resorufina foi registrado ao longo de seis min após adição do sistema regenerador de NADPH. A adição do sistema regenerador, por sua vez, foi precedida de pré-incubação por três min apenas com o tampão da reação (K_2HPO_4 100mM pH 7,8) e dois min com o tampão, amostra e substrato. O acúmulo de resorufina foi registrada com ajuda de software RF-5301PC, para *Macintosh®* e *Windows®*, durante setenta segundos, fazendo leituras de dez em dez segundos. Foram fixados os seguintes parâmetros: excitação 550 nm, emissão 582nm e precisão normal. A curva padrão com a resorufina (produto da reação) foi repetida a cada ensaio. Para a construção da curva

padrão e nos ensaios das amostras o volume final da cubeta foi de 2mL e as medidas sempre feitas no mínimo em triplicata. O espectrofluorímetro utilizado foi o modelo RF-5301 PC (*Shimadzu*®). As atividades de EROD foram expressas como picomoles de resorufina/min/miligrama de proteína.

4.3.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela ANOVA e teste de *Dunnett*, utilizando-se o programa de computador *GraphPadPrism* v. 6.01 (*GraphPad Software, Inc. USA, ©1992-2012*) para *Windows*®.

5 RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

5.1.1 Tratamento com cloreto de gadolínio

5.1.1.1 Dados clínicos observados

Tabela 1 - *Swiss Webster*

Comportamento	Doses de GdCl ₃ (mmol/kg)			
	0,1	0,2	0,25	0,3*
Prostração logo após a injeção		x	x	
Prostração 3h após a injeção		x	x	
Prostração 24h após a injeção		x	x	
Prostração 48h (eutanásia)				
Reação muscular aguda (espasmos?)			x (1/4)	

Fonte: A autora.

*A dose de 0,3 mmol/kg resultou em morte logo após o término da injeção.

Animais que receberam a dose de 0,25 mmol/kg: Os animais ficaram muito prostrados logo após a injeção, e 25% deles, menos de um minuto após a injeção começaram a apresentar uma reação muscular, semelhante a espasmos musculares. Os animais estenderam os membros inferiores e superiores e mantendo-os estendidos por alguns minutos. Em seguida os membros foram flexionados, e estendidos novamente. Decorridos alguns minutos os animais ficaram parados, completamente prostrados, apresentando taquipneia. Durante os espasmos, não foi observada taquipnéia. Entre 3 e 24h após a injeção os animais exibiam intensa prostração. Após 24 horas os sintomas desaparecem e, no momento da eutanásia (48h), os animais não apresentavam comportamento aparentemente normal sem sinais de prostração.

Tabela 2 - *C57BL/6*

Comportamento	Doses de GdCl ₃ (mmol/kg)		
	0,1	0,2	0,3**
Prostração logo após a injeção		x	x
Prostração 3h após a injeção			
Prostração 24h após a injeção			
Prostração 48h (eutanásia)			
Reação muscular aguda (espasmos?)			x

Fonte: A autora.

**apenas 1 animal recebeu esta dose.

O animal tratado com a dose de 0,3 mmol/kg exibiu a mesma reação muscular que os camundongos *SW* (dose de 0,25 mmol/kg) apresentaram, ficando, após os espasmos, muito

prostrado e com taquipneia durante vinte minutos até voltar a ter comportamento aparentemente normal. Em virtude do quadro clínico e da limitada disponibilidade de animais, e também porque o objetivo desse experimento era determinar a dose de cloreto de gadolínio que causa menos dano possível no hepatócito, esta dose não administrada a outros camundongos.

No momento da eutanásia os animais de todos os grupos apresentaram comportamento aparentemente normal.

Tabela 3 - Ratos *Wistar* fêmeas

Comportamento	Doses de GdCl ₃ (mmol/kg)			
	0,1	0,2	0,3	0,35***
Prostração logo após a injeção		x	x	
Prostração 48h (eutanásia)				
Comportamento atípico 20h após a injeção			x	
Comportamento atípico em 48h (eutanásia)			x	

Fonte: A autora.

***A dose de 0,35 mmol/kg causou a morte do rato imediatamente após o término da injeção.

Animais que receberam a dose de 0,3 mmol/kg: Entre os animais tratados com 0,3 mmol/kg, 1/3 ficaram prostrados recuperando-se em poucos minutos. Os demais apresentaram comportamento aparentemente normal em seguida ao tratamento. Quase 20 horas após o tratamento, porém, as fêmeas que receberam essa dose estavam muito machucadas, com comportamento muito agitado. Essas fêmeas estavam agressivas brigando com as outras tratadas com a mesma dose (0,3 mmol/kg) e que ocupavam a mesma gaiola o que nos obrigou a separá-las alojando apenas uma por caixa. Em virtude as brigas, uma das fêmeas teve um pedaço de mais ou menos 3cm da cauda arrancada.

No momento da eutanásia, 48h após a injeção inicial, as fêmeas do grupo que recebeu a dose de 0,3 mmol/kg ainda estavam muito agitadas, enquanto as dos demais grupos (dose 0,1 e 0,2 mmol/kg) apresentavam comportamento aparentemente normal.

5.1.1.2 Análises no soro

Transaminases:

No experimento preliminar de tratamento de camundongos com $GdCl_3$ os níveis de ALT e AST foram determinados no soro do sangue coletado no momento da eutanásia.

Entre os camundongos *SW*, apenas a análise de ALT foi realizada, sendo observado um aumento, discreto mas detectado pela teste estatístico ($p < 0,05$), em relação ao controle apenas no grupo que recebeu a menor dose de 0,1 mmol/kg (Figura 1).

Nos camundongos *C57BL/6*, não constatamos aumento de ALT ou de AST. Os níveis de AST de um dos animais que receberam a dose mais baixa (0,1 mmol/kg) estava elevado em relação ao registrado nos animais controles. Neste caso particular, porém, o aumento poderia ser explicado pelo fato do soro apresentar um certo grau de hemólise (Figura 2).

Nos ratos *Wistar* fêmeas, tratados com a dose mais baixa (0,1 mmol/kg) de $GdCl_3$ não houve alteração de ALT em relação ao grupo controle. Entre os que receberam a dose de 0,2 mmol/kg, porém, houve uma diminuição significativamente atividade de ALT ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. No grupo tratado com a dose de 0,3 mmol/kg ocorreu uma ampla dispersão dos valores de ALT medidos, mas a média do grupo não diferiu significativamente em relação ao grupo controle. Entre as fêmeas tratadas com as doses de 0,1 e 0,2 mmol/kg houve uma diminuição significativa dos níveis da AST em relação ao grupo controle. O grupo que recebeu a dose de 0,3 mmol/kg, entretanto, exibiu a tendência no sentido oposto (i.e., aumento), a análise estatística porém não detectou diferença em relação ao grupo controle (Figura 3).

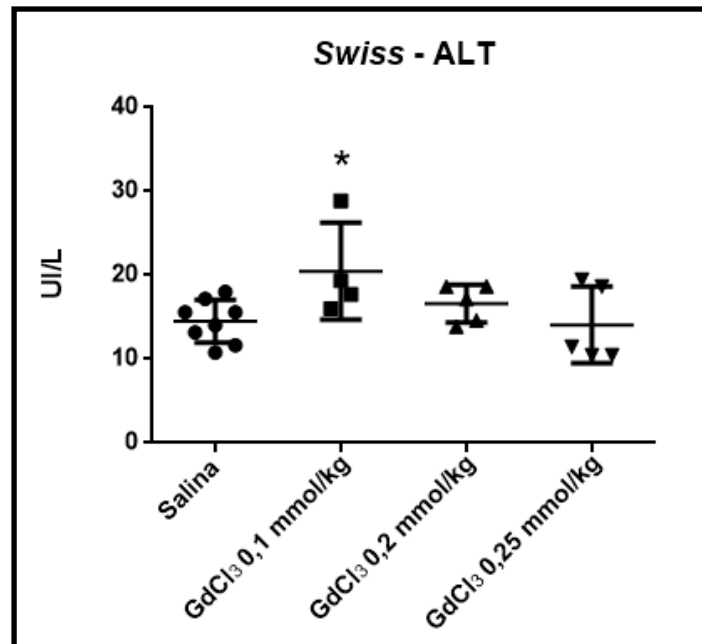


Figura 1 - Níveis de atividade de ALT (UI/L) no soro de camundongos *SW*. Os animais foram tratados com salina (n=8) ou com GdCl₃ nas doses de 0,1 mmol/kg (n=4), 0,2 mmol/kg (n=5), ou 0,25 mmol/kg (n=5). Os traços horizontais em cada grupo representam média \pm desvio padrão dos valores determinados para cada camundongo. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de *Dunnnett*. As médias dos grupos que diferem ($p < 0,05$) daquela do grupo controle são indicadas por um asterisco (*).

Fonte: A autora.

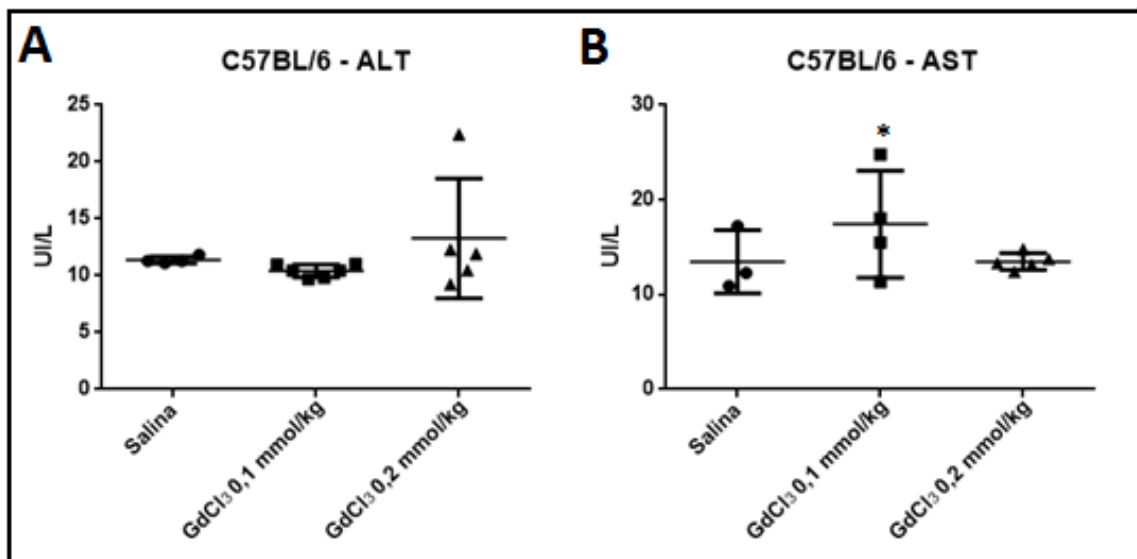


Figura 2 - Níveis de atividade (UI/L) de ALT(A) e AST(B) no soro de camundongos C57BL/6.

Os animais foram tratados com salina (A, n=5; B, n=3) ou com GdCl₃ nas doses de 0,1 mmol/kg (A, n=6; B, n=4) ou 0,2 mmol/kg (A, n=5; B, n=5). Os traços horizontais em cada grupo representam média \pm desvio padrão dos valores determinados para cada camundongo. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de *Dunnnett*. As médias dos grupos que diferem ($p < 0,05$) daquela do grupo controle são indicadas por um asterisco (*).

Fonte: A autora.

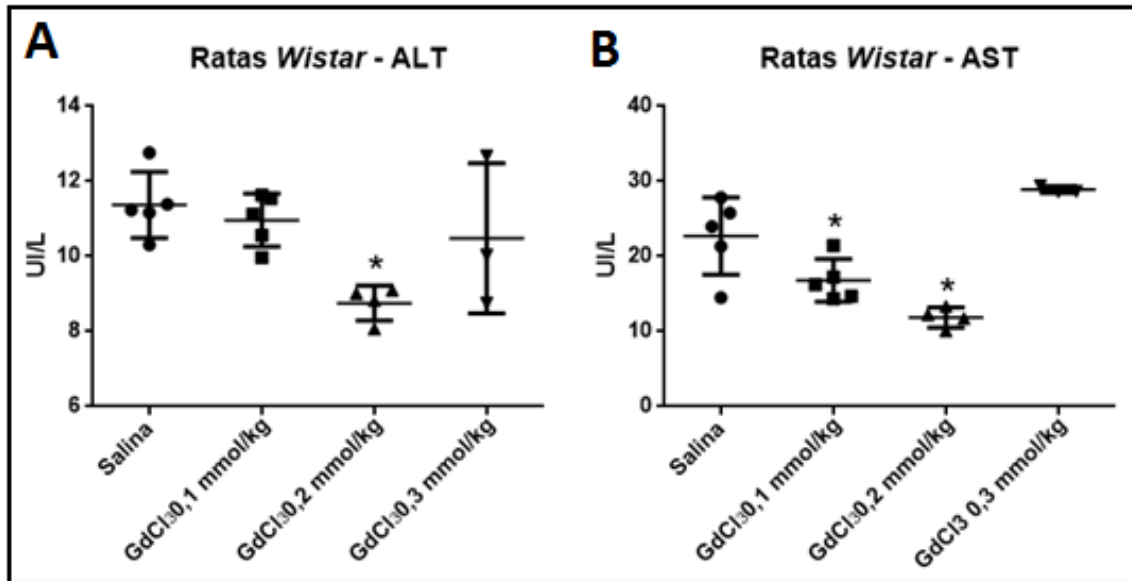


Figura 3 - Níveis de atividade (UI/L) de ALT(A) e AST(B) de ratos Wistar fêmeas. Os animais foram tratados com salina (A, n=5; B, n=5) ou com GdCl₃ nas doses de 0,1 mmol/kg (A, n=5; B, n=5), 0,2 mmol/kg (A, n=4; B, n=4) ou 0,3 mmol/kg (A, n=3; B, n=3). Os traços horizontais em cada grupo representam média \pm desvio padrão dos valores determinados para cada rato. Os dados foram analisados pela ANOVA e teste de *Dunnnett*. As médias dos grupos que diferem ($p < 0,05$) daquela do grupo controle são indicadas por um asterisco (*).

Fonte: A autora.

5.1.1.3 Análises no fígado

Histopatologia:

O exame histopatológico do fígado foi realizado em cortes do tecido corados com hematoxilina e eosina. Nos camundongos *SW* foi encontrada vacuolização segmentar, infiltrados inflamatórios e atipias nucleares. Em alguns animais foram observadas balonizações pericentrais e extensa balonização homogênea. Não foi possível avaliar a presença/ausência ou diminuição das células de Kupffer pois o tecido hepático apresentava

um aspecto estrutural diferente do que seria esperado em condições normais, por toda extensão dos lóbulos hepáticos desses animais. Essas alterações foram observadas em todos os camundongos *SW*, incluindo os que receberam as diferentes doses de $GdCl_3$ e os controles tratados apenas com salina. Não foi possível também observar um padrão de alterações que diferenciasse o grupo controle do que recebeu gadolínio. A imagem do tecido hepático de um camundongo controle é apresentada na Figura 4.

Entre os camundongos C57BL/6, 44% apresentavam o tecido hepático sem anormalidades aparentes incluindo os animais que receberam $GdCl_3$ nas doses de 0,1 e 0,2 mmol/kg de. Os 56% restantes, incluindo os que receberam $GdCl_3$ e todos os tratados com salina apresentavam aspecto estrutural desordenado, semelhante ao que havia sido notado nos *SW*, *i.e.*, tecido com muitas balonizações e atípicas nucleares, por toda a extensão dos lóbulos hepáticos. A foto do tecido hepático de um *SW* do grupo controle é apresentada na Figura 5.

O exame histopatológico do fígado de ratos *Wistar fêmeas* não revelou anormalidades nos animais do grupo controle. Embora a morfologia do tecido estivesse de um modo geral íntegra, alguns animais que receberam a dose de 0,1 e 0,2 mmol/kg de $GdCl_3$ exibiam regiões do lóbulo hepático com um alto grau de mitose e alguma hepatocelular ductal. Entretanto não foi possível caracterizar o que teria dado origem a essas mitoses. Examinando a morfologia do tecido, que pela localização dos hepatócitos representa os cordões hepáticos, foi possível observar muitas mitoses em um mesmo campo, o que não havia sido constatado anteriormente nos camundongos possivelmente devido ao aspecto confuso da estrutura tecidual. A histopatologia hepática típica de um rato controle é apresentada na Figura 6. O tecido hepático de um rato que recebeu 0,1 mmol/kg de $GdCl_3$, em que podem ser vistas múltiplas mitoses em um mesmo campo é apresentado na Figura 7.

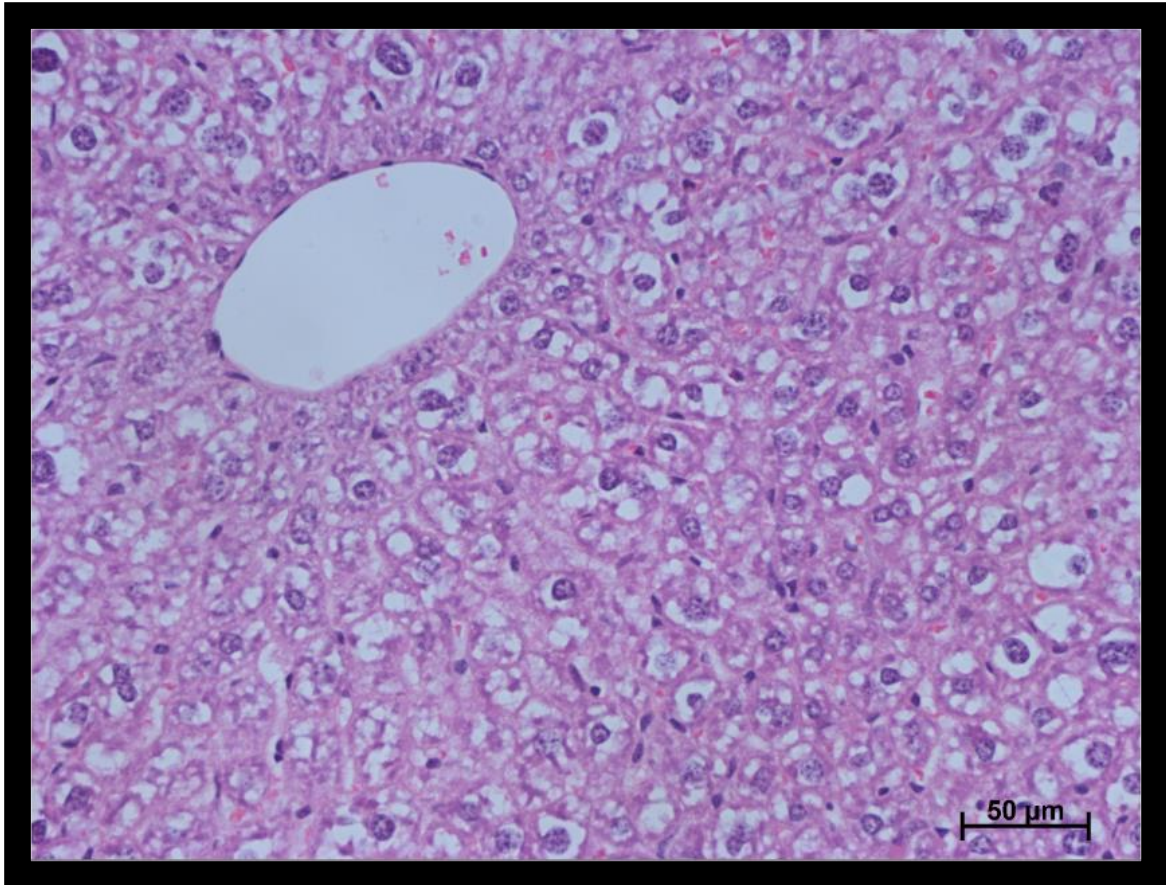


Figura 4 - Imagem de corte histológico do fígado de camundongo *SW* do grupo controle (tratado apenas com salina) corado com hematoxilina e eosina. O tecido apresenta morfologia e aspecto estrutural desordenado, com hepatócitos apresentando extensas balonizações próximo a veia central do lóbulo hepático.

Fonte: A autora.

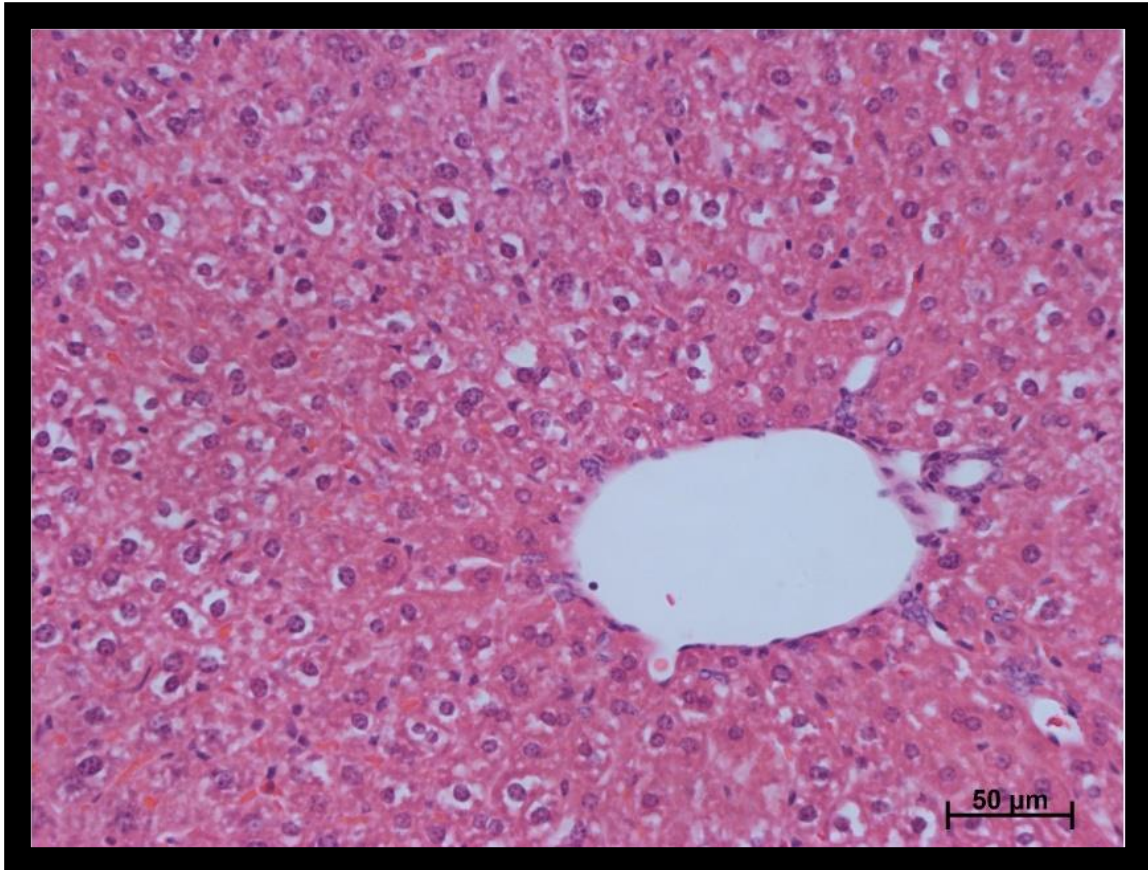


Figura 5 - Imagem de corte histológico do fígado de camundongo C57BL/6 do grupo controle (tratado apenas com salina) corado com hematoxilina e eosina. O tecido apresenta morfologia e aspecto estrutural desordenado. Hepatócitos com balonizações podem ser vistos próximo ao espaço porta.

Fonte: A autora.

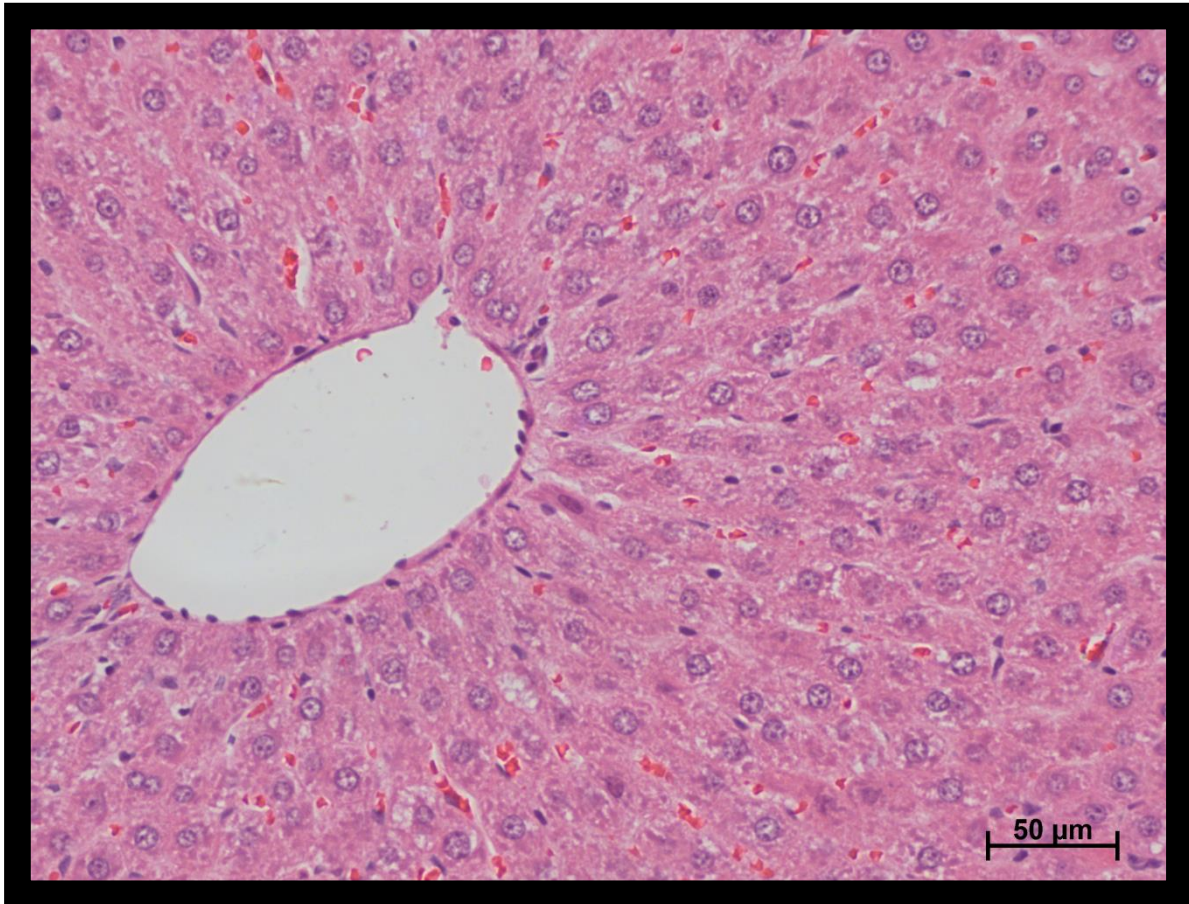


Figura 6 - Imagem de corte histológico do fígado de ratos fêmeas *Wistar* do grupo controle (tratado apenas com salina) corado com hematoxilina e eosina. Morfologia tecidual e celular com aspecto normal, com os cordões hepáticos nítidos próximos à veia central do lóbulo hepático.

Fonte: A autora.

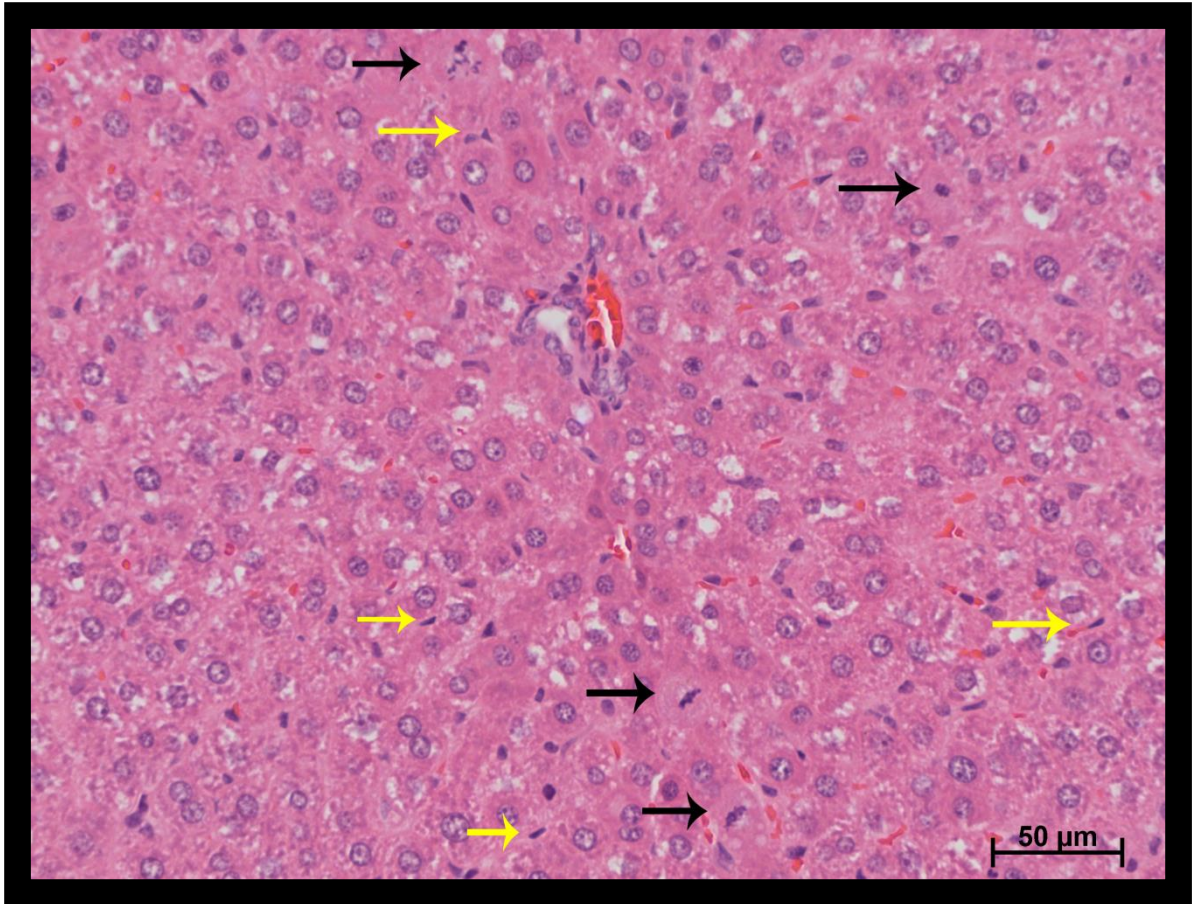


Figura 7 - Imagem de corte histológico do fígado de ratos fêmeas Wistar do tratado com GdCl_3 0,1 mmol/kg. Células em mitose (indicadas por setas pretas) e imagens sugestivas de células de Kupffer (assinaladas por setas amarelas) podem ser vistas próximas ao espaço porta do lóbulo hepático.

Fonte: A autora.

5.1.2 Tratamento com lipopolissacarídeo (LPS)

5.1.2.1 Alterações clínicas observadas

Alterações clínicas notadas em ratos *Wistar* fêmeas tratadas apenas com LPS (experimento preliminar) em diferentes intervalos de tempo pós-tratamento (momento que antecedeu a eutanásia) estão sumarizadas no quadro que se segue.

Tabela 4 - Alterações clínicas após tratamento com LPS em ratos *Wistar* fêmeas

Clínica	Eutanásia		
	6h	12h	24h
Pouca piloereção e prostração	2/5		
Muita piloereção e prostração	3/5	5/5	
Taquipneia		3/5	
Olhos inflamados/fechados		3/5	
Quietos c/olhos fechados			2/5
Aparentemente normal			3/5

Fonte: A autora.

5.2 EXPERIMENTO PRINCIPAL

5.2.1 Tratamento com cloreto de gadolínio e lipopolissacarídeo (LPS)

Em virtude das anormalidades constatadas no exame histopatológico do fígado de camundongos SW e C57BL/6 tratados apenas com salina (controles), o experimento principal foi conduzido apenas com ratos *Wistar* fêmeas.

5.2.1.1 Alterações clínicas observadas

Logo após a administração intravenosa de 0,1 mmol/kg de $GdCl_3$, os ratos fêmeas ficaram hipoativos mas, em menos de 5 min, retornaram a atividade normal. Entretanto, depois de transcorridos 1 h e 30 min do tratamento, os animais apresentavam acentuada prostração. Os ratos que receberam LPS (10 mg/kg) por via intraperitoneal não apresentaram anormalidades clínicas e/ou de comportamento imediatamente após a injeção, mas 2 hs depois exibiam prostração e piloereção. Os animais que receberam salina (controles) por via intravenosa (tempo zero) e intraperitoneal (36h) foram observados durante 2 hs após as injeções não exibindo alterações de comportamento dignas de registro.

No momento da eutanásia, o grupo de ratos que recebeu apenas salina (zero e 36h), não apresentou anormalidades clínicas e de comportamento. Da mesma forma, o grupo que

recebeu $GdCl_3$ (tempo zero) e em seguida salina (36h) também não exibiu alterações de comportamento normal. O grupo que recebeu salina (tempo zero) e LPS (36h) teve intensa piloereção, prostração e taquipneia. Esses animais apresentavam também olhos avermelhados que eram quase sempre mantidos fechados. O grupo que recebeu $GdCl_3$ (tempo zero) e LPS (36h) também apresentou intensa piloereção, prostração e taquipneia, e alguns animais apresentavam olhos avermelhados que permaneciam fechados.

5.2.1.2 Análises do soro

Transaminases:

Os ratos fêmeas que receberam $GdCl_3$ + salina e $GdCl_3$ + LPS não exibiram alterações das atividades das duas transaminases séricas (ALT e AST) em relação à atividade medida no soro do grupo controle (salina + salina). O grupo tratado com salina + LPS, entretanto, exibiu aumento dos níveis de ALT e AST em comparação com a atividade registrada nos controles (Figura 8).

Fosfatase alcalina:

Os grupos de ratos fêmeas que receberam $GdCl_3$ + salina e salina + LPS não diferiram do grupo controle (salina + salina). O grupo de ratos que recebeu $GdCl_3$ + LPS, entretanto, teve níveis elevados de atividade de ALP cuja média diferiu da registrada no grupo controle (Figura 9).

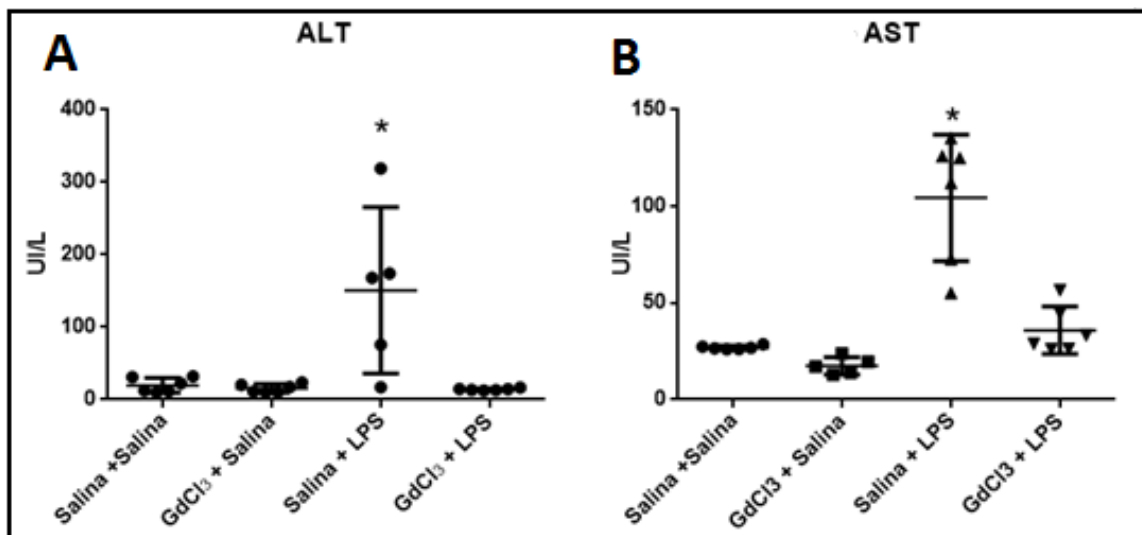


Figura 8 - Níveis de atividade (UI/L) de ALT(A) e AST(B) registrados no soro de ratos *Wistar* fêmeas. Os ratos foram tratados com salina + salina (A, n=6; B, n=6), $GdCl_3$ + salina (A, n=6; B, n=5), salina + LPS (A, n=5; B, n=5), $GdCl_3$ + LPS (A, n=6; B, n=6). A atividade

de ALT e AST no soro de ratos do grupo salina + LPS estava elevada em relação aos demais grupos. As diferenças (ANOVA e teste de *Dunnett*.) em relação ao controle ($p < 0,05$) são indicadas por um asterisco (*).

Fonte: A autora.

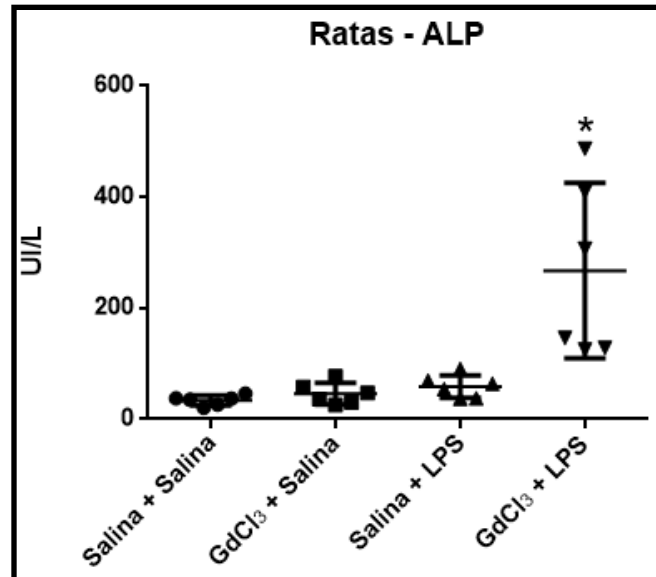


Figura 9 - Níveis de atividade (UI/L) de ALP no soro de ratos *Wistar* fêmeas. Os ratos foram tratados com salina + salina (n=6), GdCl₃ + salina (n=5), salina + LPS (n=6), GdCl₃ + LPS (n=6). A atividade de ALP no soro de ratos do grupo GdCl₃ + LPS estava aumentada em relação aos demais grupos. A diferença (ANOVA e teste de *Dunnett*) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) é assinalada por um asterisco (*).

Fonte: A autora.

5.2.1.3 Análises histopatológicas do fígado

5.2.1.3.1 Histopatologia

Nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina anormalidades do tecido hepático de ratos do grupo que recebeu salina + salina (controle). Fotografias de cortes histológicos (sem anormalidades aparentes) de rato do grupo controle são mostradas na Figura 10 – painéis **A** e **B**, sendo **A** uma área perto de um espaço porta, e **B** uma área perto da veia central.

Nos cortes histológicos do fígado de ratos que receberam GdCl₃ + salina, é possível notar congestão e áreas com muitas mitoses hepáticas, próximas umas das outras. Houve pouca variação da quantidade dessas mitoses entre diferentes animais. Fotografias de cortes histológicos do fígado de um animal desse grupo são mostradas na Figura 10 - painéis **C** e **D**,

em que aparecem áreas próximas dos espaços porta e é possível visualizar sítios com mitoses de hepatócitos.

O exame macroscópico do fígado de ratos do grupo que recebeu salina + LPS evidenciou alterações (sugestivas de necrose) que aparecem como pontos brancos dispersos no órgão (Figura 11 e 12). Quando foi realizada a análise histopatológica por microscopia óptica, foi constatado que esses animais apresentavam intensa congestão e os pontos brancos observados a olho nu parecem ser realmente sítios de necrose hepática (Figura 13, 14 e 15), com células e infiltrados inflamatórios próximos a esses locais. A histopatologia hepática de um rato representativo desse grupo é mostrada na Figura 10 - painéis **E** e **F**, em que **E** mostra um sítio de necrose com células e infiltrados inflamatórios, e **F** apresenta uma área com sítio de necrose próxima ao espaço porta.

A histopatologia do fígado de ratos que receberam GdCl₃ + LPS mostrou áreas com congestão e áreas com um número claramente aumentado de mitoses hepáticas, porém sem nenhum sítio de necrose ou células inflamatórias infiltradas. Fotografias de cortes histológicos do fígado de um rato deste grupo é apresentado na Figura 10, painéis **G** e **H**, em que podemos observar diversas mitoses hepatocitárias próximas ao espaço porta.

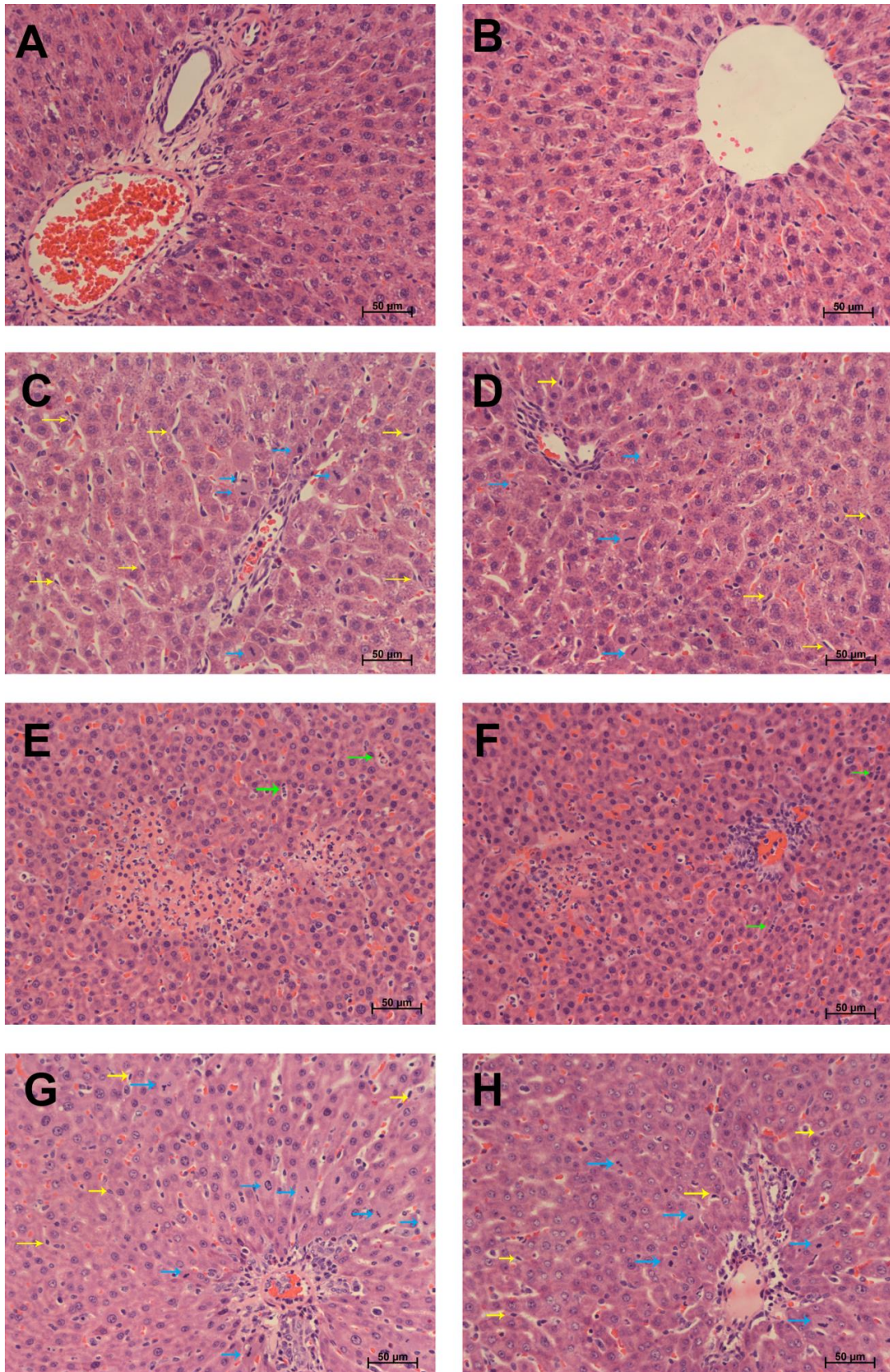


Figura 10 - Imagens de cortes histológicos do fígado de ratos *Wistar* fêmeas corados por

hematoxilina e eosina (microscopia ótica). Estão representados os grupos que receberam os seguintes tratamentos: 1) salina + salina: tecido e células normais, células próximas ao espaço porta (A), células próximas a veia central (B); 2) GdCl₃ + salina: nota-se alguma congestão e mitoses hepatocitárias (setas azuis) e prováveis células de Kupffer (setas amarelas) em áreas próximas aos espaços porta (C,D); 3) salina + LPS: podem ser vistos sítios de necrose hepática, infiltrados inflamatórios (setas verdes) e muita congestão (E), em área próxima a um espaço porta com um sítio menor de necroses hepáticas (F) e 4) GdCl₃ + LPS: é possível visualizar alguma congestão e mitoses hepatocitárias (setas azuis) e prováveis células de Kupffer (setas amarelas), em áreas próximas aos espaços porta (G, H).

Fonte: A autora.

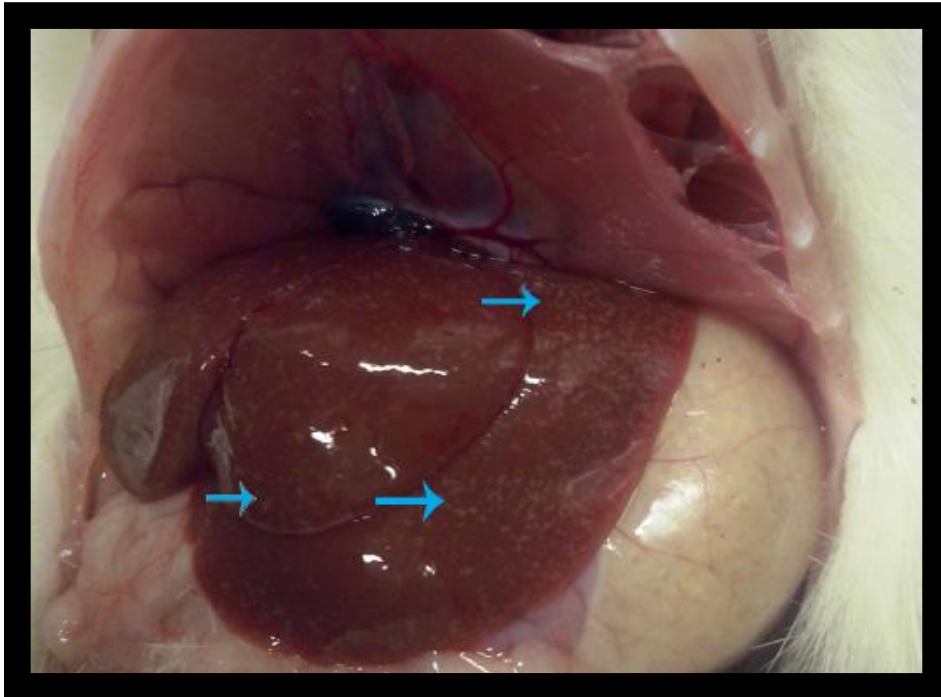


Figura 11 –Fotografia do fígado de rato *Wistar* fêmeas que recebeu salina + LPS durante a necrópsia. É possível visualizar macroscopicamente os prováveis sítios de necrose vistos com pontos brancos em focos dispersos no órgão (seta azul).

Fonte: A autora.

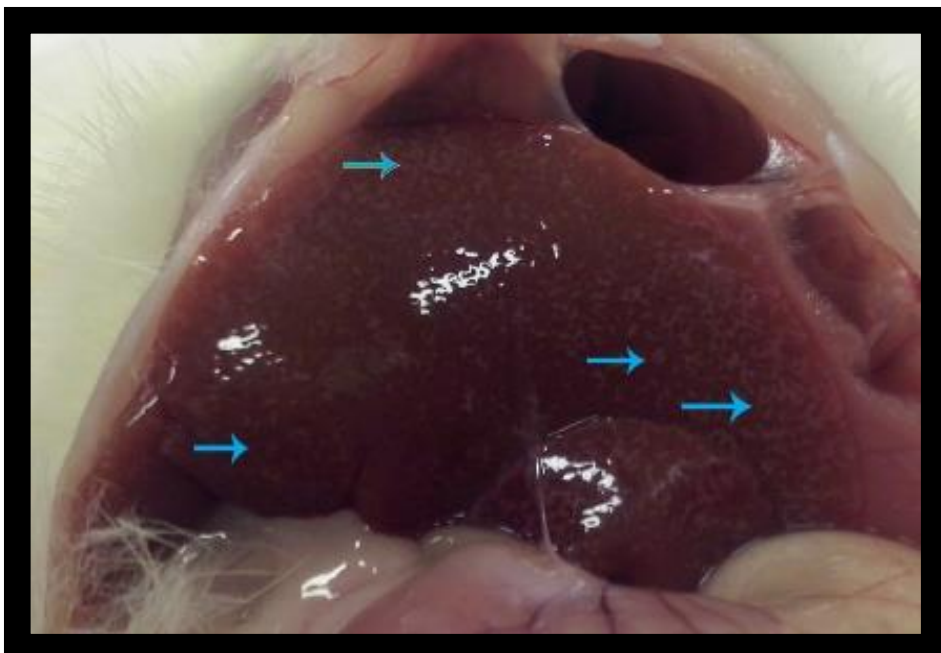


Figura 12 –Fotografia do fígado de rato fêmea *Wistar* que recebeu salina + LPS no momento da necrópsia. É possível visualizar macroscopicamente os prováveis sítios de necrose vistos com pontos brancos em focos dispersos no órgão (seta azul).Fonte: A autora.

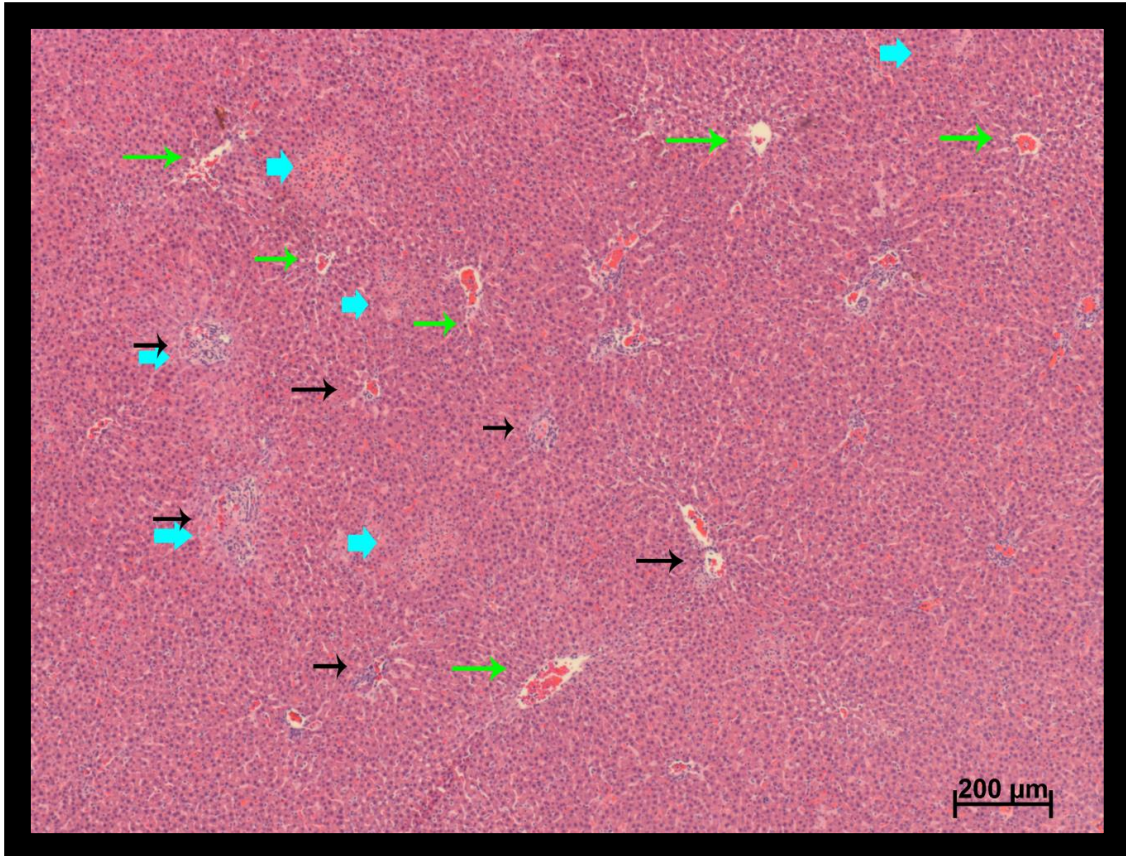


Figura 13 - Imagem de corte histológico do fígado de rato *Wistar fêmea* corado com hematoxilina e eosina. Esta fotografia ilustra o que foi observado em ratos do grupo que recebeu salina + LPS. É possível visualizar sítios de necroses (setas azuis), próximos a ou em espaços porta (setas pretas) e sítios de necrose próximos à veia central (setas verdes).

Fonte: A autora.

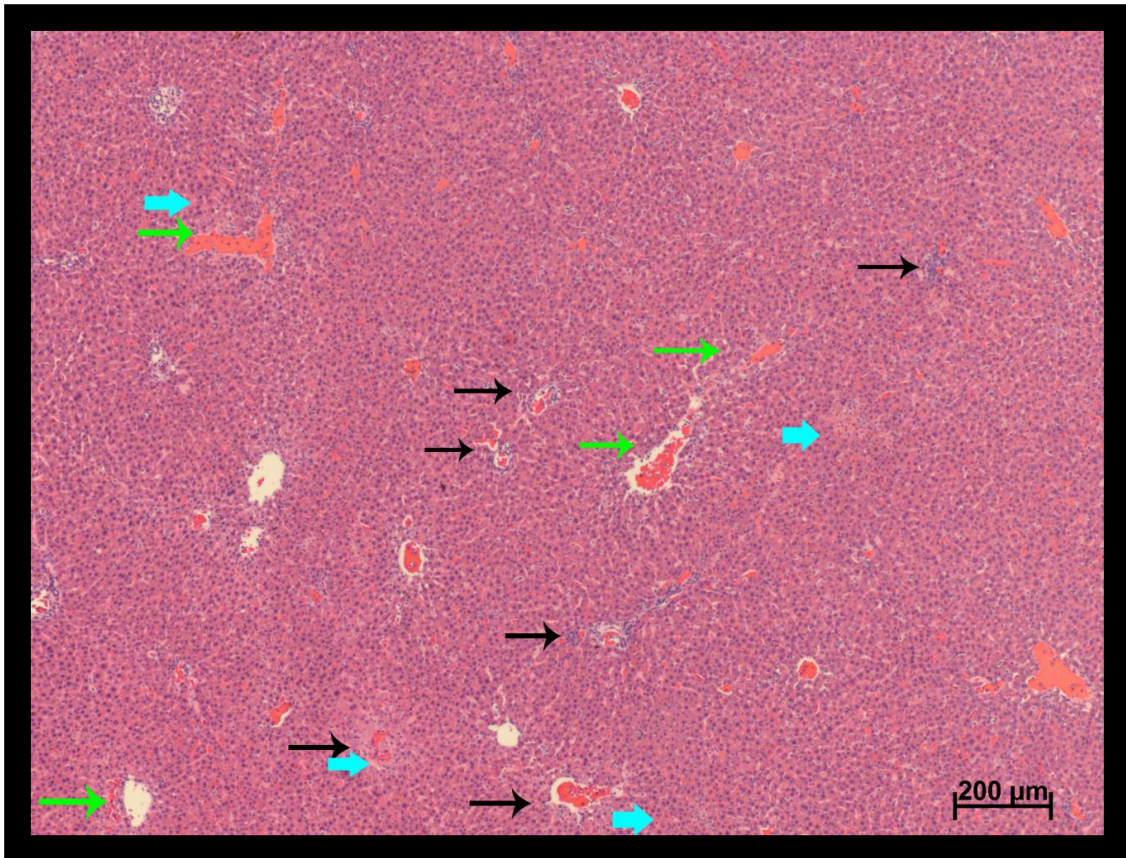


Figura 14 - Imagem de corte histológico do fígado de rato *Wistarfêmea* corado com hematoxilina e eosina (microscopia ótica). Esta fotografia ilustra o que foi observado em ratos do grupo que recebeu salina + LPS. É possível visualizar sítios de necroses (setas azuis), próximos a ou em espaços porta (setas pretas) e sítios de necrose próximos à veia central (setas verdes).

Fonte: A autora.

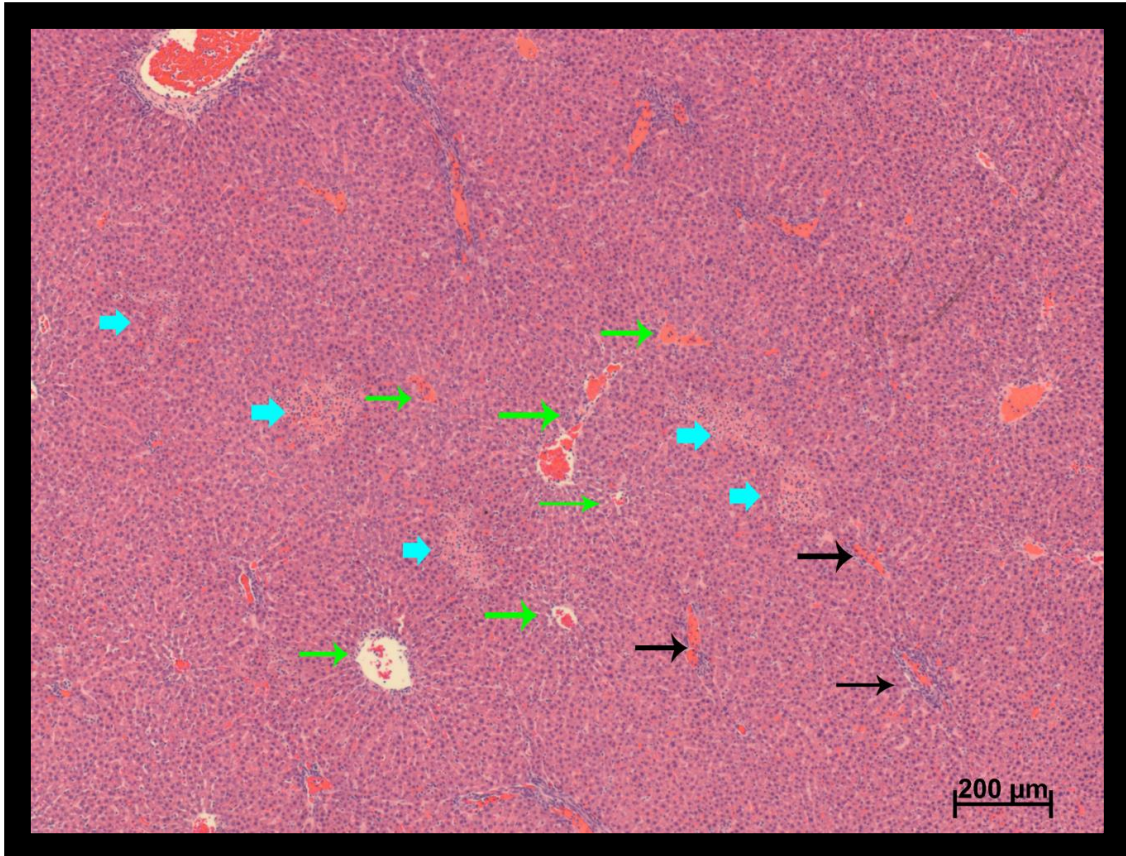


Figura 15 - Imagem de corte histológico do fígado de rato *Wistar fêmea* corado com hematoxilina e eosina. Esta fotografia ilustra o que foi observado em ratos do grupo que recebeu salina + LPS. É possível visualizar sítios de necroses (setas azuis), próximos a ou em espaços porta (setas pretas) e sítios de necrose próximos à veia central (setas verdes).

Fonte: A autora.

5.2.1.3.2 *Armazenamento de ferro (Fe^{3+})*

Nos ratos(fêmeas) do grupo que recebeu salina + salina (Figura 16, letra **A**) foi observado depósito de ferro nos hepatócitos (setas laranjas) pouco expressivo, não sendo observadas células de Kupffer com esta reserva de ferro (coloração de Perls).

Os ratos que receberam $GdCl_3$ + salina (Figura 16, letra **B**) apresentavam alguns depósitos de ferro nos hepatócitos (indicados por setas laranjas), sendo possível visualizar algumas células de Kupffer com depósitos de ferro (setas amarelas).

No grupo que recebeu salina + LPS (Figura 16, letra **C**) foram observados hepatócitos com acentuado depósito de ferro(setas laranja), ao redor de pontos com necrose ou sem necrose.Na área com muitas necroses(no centro da figura 5.1, letra **C**), é possível notar a presença de marcação de ferro que aparentemente ficou diluída após o rompimento dos hepatócitos.

Entre os ratos do grupo que recebeu $GdCl_3$ + LPS (Figura 16, letra **D**) foi observada imagem semelhante à registrada no grupo que recebeu $GdCl_3$ + salina, porém com um depósito de ferro um pouco mais acentuado nos hepatócitos (setas laranjas), assim como nas células de Kupffer (setas amarelas).

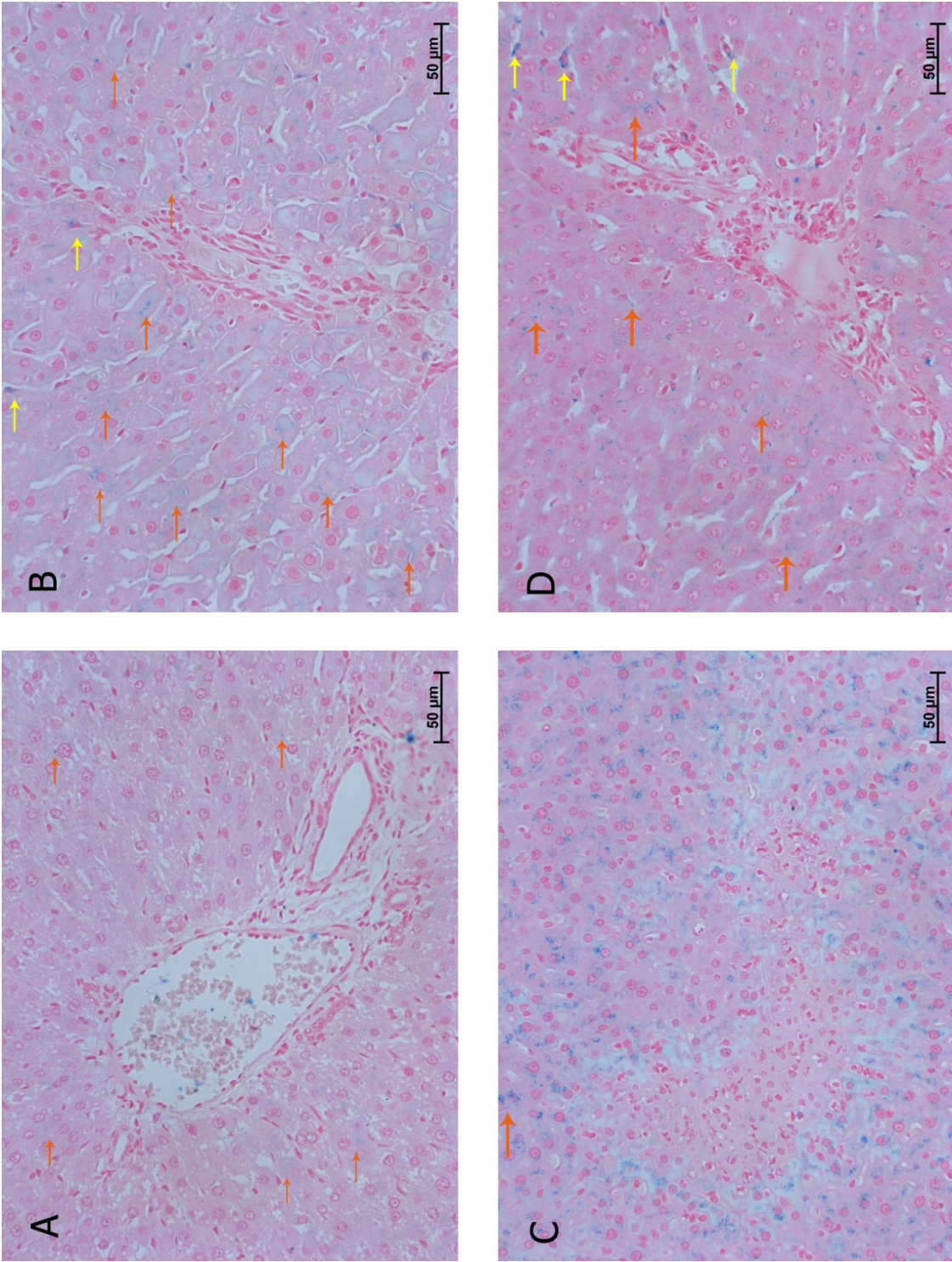


Figura 16 - Imagens de tecidos hepáticos de ratos *Wistar* por microscopia deluz, pela coloração de *Perls*. Após os tratamentos: salina + salina (A); poucos hepatócitos com depósito de ferro (setas laranjas); $GdCl_3$ + salina (B); hepatócitos depósitos de ferro presentes (setas laranjas), células de Kupffer com depósito de ferro (setas amarelas); salina + LPS (C); hepatócitos com muito depósito de ferro (e.g. seta laranja) envolta de sítio necrótico e $GdCl_3$ + LPS; hepatócitos com depósito de ferro (setas laranjas) e células de Kupffer com depósito de ferro (setas amarelas).
Fonte: A autora.

5.2.1.3.3 Atividade da CYP1A1/2 no fígado

Foi observada uma diminuição significativa da atividade da CYP1A1/2 (EROD) em relação ao controle que recebeu apenas salina em todos os grupos tratados com cloreto de gadolínio e/ou LPS. No grupo que recebeu $GdCl_3$ +salina, alguns animais apresentaram discreta diminuição de atividade da CYP1A mas a média da atividade de EROD foi menor ($p<0,05$) do que a registrada nos controles. Os grupos que receberam LPS (salina + LPS e $GdCl_3$ + LPS), também exibiram redução semelhante da atividade de CYP1A1/2. As atividades de CYP1A1/2 (EROD) em microsomas hepáticos de todos esses grupos estão representadas na Figura 17.

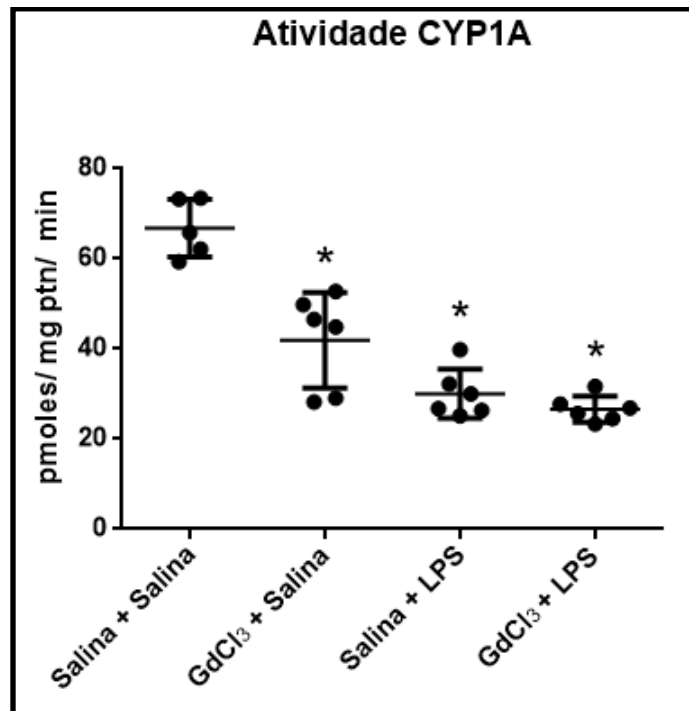


Figura 17 - Atividades da CYP1A (reação de etoxiresorufina-O-desetilase) de ratos fêmeas *Wistar*. Atividade é expressa como picomoles de resorufina por miligrama de proteína por minuto. Os ratos foram tratados com salina + salina (n=5), $GdCl_3$ + salina (n=6), salina + LPS (n=6), $GdCl_3$ + LPS (n=6). Como indicado no gráfico, todos os grupos apresentaram uma diminuição na atividade em relação ao grupo controle ($p<0,001$; ANOVA e teste de *Dunnett*) sendo as diferenças encontradas indicadas por um asterisco (*).

Fonte: A autora.

6DISCUSSÃO

Como mencionado na parte inicial da presente dissertação, o objetivo principal deste trabalho foi investigar o papel desempenhado pelas células de Kupffer na regulação da atividade de enzimas hepáticas de biotransformação de xenobióticos (Citocromos P450) no processo inflamatório. A estratégia adotada para alcançar esse objetivo envolveu a destruição “seletiva” das células de Kupffer com a administração de cloreto de gadolínio e, na vigência da inibição da atividade e/ou redução da população desses macrófagos residentes, desafiar o animal com estímulo inflamatório (LPS). A comparação entre a regulação da atividade e expressão de isoformas CYP, na presença de células de Kupffer plenamente funcionais, e a modulação após depleção/inibição parcial destas células poderia indicar em que medida os macrófagos residentes participam da resposta do fígado a estímulos inflamatórios/infecciosos.

Experimentos preliminares foram realizados para a escolha da espécie / linhagem (camundongo ou rato) e das doses de $GdCl_3$ e LPS mais adequadas, e do intervalo de tempo entre os tratamentos e a eutanásia dos animais. Entre os animais tratados com gadolínio, apesar das diferentes doses não terem elevado os níveis de ALT e AST no soro, foram observadas alterações de comportamento em doses potencialmente letais. Aproximadamente 25% dos camundongos *SW* tratados com 0,25 mmol/kg de $GdCl_3$ exibiram reações em curto intervalo de tempo pós-injeção (i.v.), enquanto os ratos que receberam 0,3 mmol/kg apresentaram reações em intervalos mais longos.

O que determinou a escolha do rato para o experimento principal foram os resultados do exame histopatológico. O tecido hepático dos camundongos do grupo controle (não tratado) recebidos do biotério central da FIOCRUZ apresentou morfologia e aspecto estrutural desordenado e com registro de algumas atipias, cuja etiologia (alimentação, raça?) não foi possível esclarecer. O tecido hepático de ratos controles, por outro lado, apresentou a morfologia hepática esperada.

Em relação à depleção das células de Kupffer, face a impossibilidade de estimar a extensão da depleção com o uso de marcadores específicos, foi escolhida a menor dose administrada de $GdCl_3$ (0,1 mmol/kg). O tempo ideal (redução máxima da população - Hardonket *al.*, 1992) para maior depleção sem causar danos significativos aos hepatócitos (Spencer, 1996 e 1997) também foi escolhido com base em informações da literatura. Quanto ao LPS, selecionamos a dose de 10 mg/kg do sorotipo utilizado e o intervalo de tempo de 12 h pós-administração época em que ocorrem as manifestações mais expressivas do quadro

inflamatório, em comparação aos intervalos de 6 h e 24 h.

O experimento principal, conduzido com ratos, testou a hipótese de que a regulação da atividade de CYPs hepáticas por estímulos inflamatórios dependeria da presença de células de Kupffer funcionais, ou melhor, que a modulação da atividade das CYPs, localizadas predominantemente nos hepatócitos, seria mediada pela ativação dos macrófagos residentes e, conseqüentemente, pela liberação de mediadores (incluindo citocinas) em resposta ao estímulo. A atuação desses mediadores sobre o hepatócito desencadearia eventos que resultariam na regulação negativa (mais freqüentemente observada) ou positiva da expressão e atividade de isoformas CYP. Como vimos nos resultados, a administração de LPS regulou negativamente a atividade de EROD/CYP1A (que no fígado é catalisada predominantemente por CYP1A2) mas não foi possível discernir qualquer diferença de resposta entre ratos tratados com GdCl₃ e controles quanto à magnitude da depressão da atividade de CYP1A causada pelo LPS. Em outras palavras, os resultados desse experimento não permitiram rejeitar a hipótese de nulidade, *i.e.*, os dados indicaram que a regulação negativa da CYP1A hepática por estímulos inflamatórios (LPS) não seria mediada necessariamente pela ativação das células de Kupffer. Essa conclusão depende, entretanto, da procedência ou não de um pressuposto básico do desenho do estudo: o tratamento com GdCl₃ (na dose e no intervalo de tempo escolhidos) reduziu “seletivamente” a população (e/ou inibiu a função) das células de Kupffer.

A literatura é, de um modo geral, consistente quanto à observação de que a administração do GdCl₃ por via intravenosa destrói preferencialmente as células de Kupffer (Hardonket *al.*, 1992; Rai, 1996; Palasz, 2000), mas há também inconsistências quanto à extensão da redução da população de macrófagos residentes (Koopet *al.*, 1997; Kono *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2013). Notamos também que outros trabalhos assumem que o tratamento com GdCl₃ destrói seletivamente as células de Kupffer sem verificar o que de fato ocorreu no estudo, ou seja, sem incluir no estudo um controle da magnitude do efeito do GdCl₃ sobre a população de macrófagos residentes (Kim, 1998; Lazaret *al.*, 1998; Dinget *al.*, 2004).

Por limitação de tempo e recursos materiais, não foi possível no âmbito da presente dissertação verificar diretamente o efeito do tratamento com GdCl₃ sobre a população de células de Kupffer no momento da administração de LPS aos ratos. Todavia, o material foi preservado para posteriores análises por imunohistoquímica/fluorescência com anticorpos específicos (*e.g.*, CD68) para a marcação de células de Kupffer, e/ou qPCR para quantificação de transcritos (mRNAs) cuja expressão marca seletivamente essas células no tecido hepático. A

marcação de Fe^{3+} foi uma tentativa de utilizar um parâmetro para identificar se houve depleção nas células de Kupffer. Entretanto, não foi possível avaliar este efeito pois o modelo animal utilizado não armazenou preferencialmente o ferro nas células de Kupffer. Em virtude deste fato não foi possível usar esse parâmetro para estimar a redução da população de macrófagos residentes.

Notamos, porém, a marcação de algumas poucas células de Kupffer com ferro, principalmente nos animais que receberam GdCl_3 + salina e GdCl_3 + LPS. Nos animais que receberam salina + salina, havia pouco ferro armazenado, mas este acumulava-se quase exclusivamente nos hepatócitos. No grupo salina + LPS, houve um expressivo depósito de ferro nos hepatócitos, comparado ao controle (salina + salina). Isto, porém, não é surpreendente, visto que a ferritina, a forma em que o Fe^{3+} é armazenado no interior da célula, é um conhecido marcador de inflamação ou infecção. O acúmulo, portanto, não resulta apenas da sobrecarga de ferro (Kell&Pretorius, 2014). Apesar da marcação de Fe^{3+} não ter sido útil como parâmetro para investigação da depleção das células de Kupffer durante o tratamento com GdCl_3 , essa marcação forneceu mais uma evidência da diminuição da inflamação causada pela endotoxina. Nos animais tratados previamente com GdCl_3 e estimulados com endotoxina (LPS) houve menor depósito de ferro do que o observado nos animais apenas tratados com endotoxina.

Entretanto, os resultados da investigação dos efeitos do GdCl_3 , do LPS e da combinação dos dois tratamentos sobre o dano hepático – através da análise histopatológica e elevação de transaminases no soro (ALT/AST) – são consistentes com a interpretação de que houve de fato alguma destruição e/ou inibição funcional importante das células de Kupffer após a administração do GdCl_3 . Como vimos, o tratamento apenas com LPS (mas não o tratamento apenas com GdCl_3), causou significativo dano hepático, evidente tanto pela elevação das transaminases séricas (ALT e AST) quanto pelo exame histopatológico do fígado.

Apesar de não ter sido observado aumento de ALP nos grupos que receberam apenas GdCl_3 e nos grupos que receberam apenas LPS, foi observado um expressivo aumento de ALP nos animais que receberam ambos os tratamentos. No entanto, ainda não é claro porque esse aumento estaria ocorrendo, já que o exame histopatológico também não revelou alterações (*e.g.*, ectasia) nos ductos e canalículos biliares. Há relatos na literatura (Spencer, 1997) indicando que altas doses de GdCl_3 (0,35 mmol/kg) podem causar aumento de ALP em ratos (sem quadro inflamatório). Neste trabalho, porém, observamos que o estímulo inflamatório

(LPS), que em ratos que não foram previamente tratados com $GdCl_3$ não alterou a ALP, resultou em elevação da ALP sérica quando os animais haviam sido anteriormente tratados com a dose de 0,1 mmol/kg de $GdCl_3$. Como a dose de 0,1 mmol/kg de $GdCl_3$ é insuficiente para elevar a ALP na ausência do tratamento adjuvante com LPS, os resultados sugerem que o LPS administrado após $GdCl_3$ teria atuado sinergicamente. Por outro lado, é importante lembrar que a ALP não está presente apenas nas células de revestimento dos ductos e canalículos biliares no fígado, mas também nas células da mucosa intestinal, ossos, rins e leucócitos maduros (*Butterworth, 1983*).

O dano hepático evidenciado pela elevação de transaminases e histopatologia, porém, não ocorreu no caso do tratamento combinado sequencial, *i.e.*, a administração de LPS 36 h após a injeção de $GdCl_3$ não causou danos aos hepatócitos. Embora o hepatócito expresse TLR-4 (Toll-like receptor 4) aos quais se liga o LPS (Soares *et al.*, 2010), vários estudos (Koo *et al.*, 1999; Koilose *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010) relatam achados consistentes com a interpretação de que o dano hepático produzido por um quadro de inflamação exacerbada, podendo levar a sepse, resultaria em grande parte da liberação em massa de citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios ao nível do órgão, em decorrência da super-ativação das células de Kupffer. Se esse é o caso, o dano não ocorreria ou seria minimizado após a depleção e/ou inibição funcional dos macrófagos residentes no momento do desafio com LPS, o que é consistente com o que observamos.

Baseado em um conjunto de estudos, acredita-se que as células de Kupffer e os mediadores por elas liberados tenham um papel duplo em relação à proteção aos hepatócitos. Imuno-estimulações leves e moderadas e liberações limitadas de mediadores poderiam ter um papel essencialmente protetor em relação a diferentes agravos (incluindo algumas hepatotoxinas) enquanto a super-estimulação e liberação em massa de mediadores pró-inflamatórios (que ocorre por exemplo na sepse) teria o efeito oposto resultando em dano hepático. Em relação aos efeitos do tratamento com $GdCl_3$ no fígado, há hipóteses (Badger, 1996) que sugerem que as células de Kupffer na presença do Gd^{3+} poderiam ser estimuladas a secretar citocinas (*e.g.*, TNF-alfa, IL-1, IL-6) pró-inflamatórias que, de um modo geral, são descritas como inibidoras da atividade das isoformas CYP, e/ou poderiam diminuir a produção de citocinas que são conhecidas por não alterar a atividade das CYPs (*e.g.*, IL-4). Alguns estudos ainda sugerem que o Gd^{3+} poderia agir diretamente no hepatócito, modulando a atividade dos citocromos P450 (Badger, 1996; Kim *et al.*, 1998; Palasz & PiotrCzekaj, 2000).

Por fim, a regulação negativa da atividade de CYP1A (EROD) após tratamento com

LPS, e o fato da mesma não ter sido alterada pelo tratamento com $GdCl_3$, indica que caso tenha ocorrido de fato a redução da população/inibição funcional das células de Kupffer, esta regulação não é necessariamente mediada pela ativação de macrófagos residentes e liberação em massa de mediadores pró-inflamatórios no tecido hepático. Como salientamos, os hepatócitos expressam TLR-4 que tem o LPS como ligante. A resposta ao LPS ao nível da regulação da expressão e atividade de CYP1A poderia ser mediada por eventos desencadeados em sequência a esta ligação com TLR-4 ou por outra via presente no hepatócito que seja ativada por ação direta do lipopolissacarídeo, e não indiretamente através da ativação das células de Kupffer ou por mediadores pró-inflamatórios liberados pela endotoxina.

Destacamos por fim que os resultados desse trabalho são consistentes com a hipótese de que a ativação das células de Kupffer não seria evento necessário para desencadear a regulação negativa da atividade de CYP1A. Não se pode excluir, entretanto, a possibilidade de redundância, ou seja a ação direta no hepatócito e a liberação de mediadores pró-inflamatórios em massa pelas células de Kupffer poderiam concorrer para o mesmo fim. Afinal, há abundantes relatos na literatura (Abdel-Razzaket *et al.*, 1993; Morgan, 2000; Kellet *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2011) indicando que citocinas pró-inflamatórias *per se* (e.g. TNF-alfa) são capazes de regular negativamente a expressão e atividade de CYPs hepáticos. Diferente dos nossos achados, o estudo de Lee *et al.*, 2011, apesar de ter utilizado um modelo de indução de sepse por cirurgia de CLP (ligação e perfuração cecal), observou que nos grupos de animais que receberam $GdCl_3$ + CLP não houve uma extensa supressão da atividade tanto da CYP1A, quanto da CYP2E, como ocorreu com os animais do grupo com CLP apenas. Usando procedimento diferente do que empregamos para produzir endotoxemia, Lee *et al.*, concluíram de forma divergente do que constatamos, que a depleção das células de Kupffer pelo tratamento com $GdCl_3$ protegeria o hepatócito quanto ao efeito depressor da inflamação sobre a atividade de CYPs. Em outras palavras, de acordo com os resultados de Lee *et al.*, as células de Kupffer seriam mediadores necessários da regulação negativa de CYPs hepáticas pela inflamação/infecção.

Outro aspecto a destacar é a intensidade do estímulo (LPS) testado. A nossa conclusão prende-se obviamente às condições do experimento (dose alta de LPS à semelhança do que ocorre na sepse). No caso da hipótese de que há redundância (ação direta no hepatócito e mediada por células de Kupffer) ser válida, poder-se-ia esperar que o papel das células de Kupffer fosse mais importante (e “necessário”) no caso da regulação da expressão de CYPs por estímulos fracos ou moderados.

7 CONCLUSÕES

Embora não tenhamos realizado a marcação direta das células de Kupffer, a inibição do efeito hepatóxico da imunoestimulação com LPS no grupo tratado previamente com $GdCl_3$ (*i.e.*, ausência de necrose e infiltrados inflamatórios, baixa reserva de ferritina, e reversão do aumento de AST e ALT no soro) sugere que nesse grupo a população das células de Kupffer foi depletada e/ou teve sua atividade diminuída. Esta interpretação apoia-se em resultados de diversos estudos experimentais que indicam que o dano hepático produzido pelo LPS seria mediado pela ativação das células de Kupffer.

O $GdCl_3$ (0,1 mmol/kg iv) *per se* causou uma discreta, porém significativa redução da atividade da CYP1A hepática nos ratos *Wistar fêmeas*.

O tratamento prévio com $GdCl_3$ (0,1 mmol/kg i.v.) não alterou a regulação negativa da CYP1A hepática causada pela administração de LPS (10 mg/kg i.p.) aos ratos *Wistar fêmeas*.

8 PERSPECTIVAS

Possíveis desdobramentos do trabalho realizado no âmbito dessa dissertação de mestrado incluem a investigação em maior profundidade do papel das células de Kupffer na modulação de CYPs por estímulos inflamatórios e/ou infecções, e do modo pelo qual o macrófago residente interage com o hepatócito em resposta a imuno-estimulação.

Citamos a seguir algumas das investigações que pretendemos realizar com as amostras já obtidas durante o presente trabalho e que foram armazenadas para posterior análise:

- Confirmar se está ocorrendo de fato a depleção das células de Kupffer com a dose de $GdCl_3$ testada e estimar quantitativamente a extensão dessa depleção. Pretendemos realizar marcações com anticorpos específicos para células de Kupffer de ratos, como o CD68. Essa confirmação poderá também ser feita com a quantificação dos níveis de mRNA de proteínas marcadoras expressas especificamente por essa população celular.
- Quantificar a expressão de mRNA da CYP1A e outras CYPs como a CYP2E1.
- Quantificar níveis de óxido nítrico no soro.
- Caracterizar se os níveis de mRNA e a atividade das CYPs (incluindo CYP2E1) estão relacionadas.

Perspectivas envolvendo futuros experimentos:

- Investigar o modo pelo qual o tratamento com $GdCl_3$ causou aumento da frequência de mitoses dos hepatócitos sem aparente indícios de necrose, i.e., proliferação regenerativa. Neste sentido pretende-se realizar experimentos com intervalos inferiores a 48 h entre o tratamento com $GdCl_3$ e a eutanásia.
- Quantificar níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no soro de todos os grupos estudados e uso de bloqueadores farmacológicos (e.g., pentoxifilina). Investigar a relação entre esta resposta (elevação de mediadores inflamatórios) mediada pela ativação das células de Kupffer e a regulação negativa e/ou positiva da expressão e atividade de CYPs.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, 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.
- Ahmad N, Gardner CR, Yurkow EJ. Inhibition of macrophages with gadolinium chloride alters intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver during acute endotoxemia in rats. *Hepatology* 1990; 29:728–736.
- Aitken AE, Richardson TA, Morgan ET. Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46:123-149
- Asaka S, Shibayama Y, Nakata K. Pathogenesis of focal and random hepatocellular necrosis in endotoxemia: microscopic observation in vivo. *Liver* 1996;16(3):183-7.
- Badger DA, Kuester RK, Sauer JM, Sipes IG. Gadolinium chloride reduces cytochrome P450: relevance to chemical-induced hepatotoxicity. *Toxicology* 1997; 121(2):143-53.
- Benet LZ, Sheiner LB. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e eliminação das drogas. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1987.
- Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. 2006; 26(10):1175-86.
- 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.
- Butterworth PJ. Chapter: Biochemistry of mammalian alkaline phosphatases in *Cell Biochemistry and Function Vol 1*. 1983. pages 66–70.
- Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 1973; 59: 365-375.
- Carvalho RS, Friedrich K, De-Oliveira AC, Suarez-Kurtz G, Paumgarten FJ. Malaria downmodulates mRNA expression and catalytic activities of CYP1A2, 2E1 and 3A11 in mouse liver. *Eur J Pharmacol* 2009; 616:265-269.
- Cheng PY, Wang M, Morgan ET. Rapid transcriptional suppression of rat Cytochrome P450 genes by endotoxin treatment and its inhibition by curcumin. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307(3):1205-12.
- De-Oliveira AC, Carvalho RS, Paixão FH, Tavares HS, Gueiros LS et al. Up- and downmodulation of liver cytochrome P450 activities and associated events in two murine malaria models. *Malar J* 2010; 22(9):81.
- De-Oliveira AC, Da-Matta AC, Paumgarten FJ. *Plasmodium berghei* (ANKA): infection

induces CYP2A5 and 2E1 while depressing other CYP isoforms in the mouse liver. *Exp Parasitol* 2006; 113(4): 256– 261.

De-Oliveira ACAX, Poça KS, Totino PRR, Paumgarten FJR. Modulation of Cytochrome P450 2A5 Activity by Lipopolysaccharide: Low-Dose Effects and Non-Monotonic Dose-Response Relationship. *PLoS ONE* 2015; 10(1):42.

De-Oliveira AC, Modulação da atividade das enzimas de biotransformação de xenobióticos na malária murina letal e não-letal. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2007.

Ermakov YA, Averbakh AZ, Yusipovich AI, Sukharev S. Dipole Potentials Indicate Restructuring of the Membrane Interface Induced by Gadolinium and Beryllium Ions. *Bioph J* 2001; (80)1851–1862.

Erwin N. Chapter: Immunogenicity of Endotoxin in Beneficial Effects of Endotoxins. New York: Plenum Press 1983; pp 91-109.

Graepi N, Powell DH, Laurencyet. al., Coordination equilibria and water exchange kinetics of lanthanide(III) propylenediaminetetraacetates and other MRI related complexes. *Inorg Chim Acta* 1995; 235:311-326.

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.

Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 296–302.

Jeschke MG, Rensing H, Klein D, et al. Insulin prevents liver damage and preserves liver function in lipopolysaccharide -induced endotoxemic rats *journal of hepatology. J Hepatol* 2005; 42(6):870-9.

Jones C, Badger SA, Hoper M, Parks RW, Diamond T, Taylor MA. Hepatic cytokine response can be modulated using the Kupffer cell blocker gadolinium chloride in obstructive jaundice. *Int J Surgery* 2011; 11:(1) 46 - 51

Kao ES, Hsu JD, Wang CJ, et al. Polyphenols extracted from *Hibiscus sabdariffa* L. inhibited lipopolysaccharide-induced inflammation by improving antioxidative conditions and regulating cyclooxygenase-2 expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73(2):385-90.

Ke S, Rabson AB, Germino JF, et al. Mechanism of Suppression of Cytochrome P-450 1A1 Expression by Tumor Necrosis Factor and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2001; (276):43. pp 39638–39644.

Kell DB, Pretorius E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics* 2014; 6(4):748-73.

- Kinoshita M, Uchida T, Nakashima H, Ono S, Seki S, Hiraide H. Opposite effects of enhanced tumor necrosis factor- α production from Kupffer cells by gadolinium chloride on liver injury/mortality in endotoxemia of normal and partially hepatectomized mice. *Shock* 2005;23(1):65-72.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastr* 2006; 12(46): 7413-7420.
- Koo DJ, Chaudry IH, Wang P. Kupffer Cells Are Responsible for Producing Inflammatory Cytokines and Hepatocellular Dysfunction during Early Sepsis. *J Surg Res* 1999; 151–157.
- Koop DR, Klopfenstein B, Iimuro Y, Thurman RG. Gadolinium Chloride Blocks Alcohol-Dependent Liver Toxicity in Rats Treated Chronically with Intragastric Alcohol Despite the Induction of CYP2E1. *Mol Pharmacol* 1997; 51(6):944-50.
- 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.
- Lee SH, Clemens MG, Lee SM. Role of Kupffer cells in vascular stress genes during trauma and sepsis. *J Surg Res.* 2010;158(1):104-11.
- Meyer, U. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996; 24: 449-459.
- Milosevic N, Schawalder H, Maier P. Kupffer cell-mediated differential down-regulation of cytochrome P450 metabolism in rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 1999; 368:75-87
- Morgan ET. Regulation of cytochrome P450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* 2001; 29(3):207-11.
- Morgan ET. Regulation of cytochromes P 450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 1997; 29(4):1129-88.
- 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.
- Moriya N, Kataoka H, Fujino H, Nishikawa J, Kugawa F. Different expression patterns of hepatic cytochrome P450 s during anaphylactic or lipopolysaccharide-induced inflammation. *Pharmazie* 2014;69(2):142-7.
- Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, et. al., The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA and Cell Biol* 1991; 10: 1- 14.
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1964; 239:2.370-2.378.
- Palasz A, Czekaj P. Toxicological and cytophysiological aspects of lanthanides action. *Acta Biochim Pol* 2000; 47:1107–1114

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.

Peterson TC, Renton KW. Kupffer cell factor mediated depression of hepatic parenchymal cell cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:1491-7.

Rai RM., Yang SQ, McClain C. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *American Journal of Physiology: Gastric Liver Physiology* 1996; 270:G909– G918.

Renton KW. Hepatic drug metabolism and immunostimulation. *Toxicol* 2000; 142:173-78.

Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50(4):571-81.

Rose ML, Bradford BU, Germolec DR, Lin M, Tsukamoto H, Thurman RG. Gadolinium chloride-induced hepatocyte proliferation is prevented by antibodies to tumor necrosis factor α . *Toxicol. Appl Pharmacol* 2001; 170:39–45.

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.

Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J.* 2003; 17(6):660-7.

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

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

Shibayama Y, Urano T, Asaka S, et al. Pathogenesis of centrilobular necrosis following congestion of the liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8(6):530-4.

Spencer AJ, Wilson SA, Harpur E, et al. Gadolinium chloride toxicity in the Rat. *Toxicol Pathol* 1997; 25(3):245-55.

Spencer AJ, Wilson SA, Harpur E, et al. Gadolinium chloride toxicity in the mouse. *Hum Exp Toxicol* 1998; 17: 633–7.

Soares JB, Nunes PP, Albuquerque RR, Moreira AL. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int* 2010; 4:659–672.

Song M, Schuschke DA, Zhou Z, et al. Kupffer cell depletion protects against the steatosis,

but not the liver damage, induced by marginal-copper, high-fructose diet in male rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308(11):934-45.

Stanley LA, Adams DJ, Lindsay R, Meehan RR, Liao W, Wolf CR. Potentiation and depression of mouse liver cytochrome P-450 isozymes during the acute-phase response induced by bacterial endotoxin. *Eur J Biochem* 1988; 174:31-36.

Sun-mee L, Tae-Hoon K, Sang-Ho L. Role of Kupffer cells in pathogenesis of sepsis-induced drug metabolizing dysfunction. *FEBS J* 2011; 278:2307-2317.

Taylor MA, Jones C, Badger SA, Hoper M, Parks RW, Diamond T. Hepatic cytokine response can be modulated using the Kupffer cell blocker gadolinium chloride in obstructive jaundice. *Surg* 2013; 11:46-51

Thinnes FP, Walter G, Hellmann KP, Hellmann T. Gadolinium as an opener of the outwardly rectifying Cl⁻ channel (ORCC). Is there relevance for cystic fibrosis therapy? *Pflügers Arch* 2001; 443 Suppl 1:S111-6.

Thunus, L.; Lejeune, R. Overview of transition metal and lanthanide complexes as diagnostic tools. *Coord. Chem Rev* 1999; (184):125-155.

Uhl k, Grace JM, Kocisko DA, Jennings BT, Michell AL, Brewer TG. Effects of *Plasmodium berghei* infection on cytochromes P-450 2E1 and 3A2. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1999; 24:169-176.

Watkins PB. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterology Clin North Am* 1992; 21:511-526.

Yang XC, Sachs F. Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* 1989; 1068-71.

Sachs F. Stretch-Activated Ion Channels: What Are They? *Physiology* 2010; 25(1): 50–56.

Yorgani K, Baykal A, Kologlu M, Saribas Z, Hascelik G, Sayek I. Endotoxin challenge causes a proinflammatory state in obstructive jaundice. *J Invest Surg* 2004; 17:119e26